

**VALQUÍRIA JOANA MEDINA PINHEIRO**

**VIA METABÓLICA DOS FLAVONÓIS EM GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES  
AO ATAQUE DE INSETOS PRAGAS**

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

Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos

Coorientadora: Maria Goreti de Almeida  
Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

P654v  
2024

Pinheiro, Valquíria Joana Medina, 1989-  
Via metabólica dos flavonóis em genótipos de soja  
resistentes ao ataque de insetos / Valquíria Joana Medina  
Pinheiro. – Viçosa, MG, 2024.  
1 tese eletrônica (77 f): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

Referências bibliográficas: f. 63-73.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.533>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soja - Resistência à doenças e pragas - Aspectos  
genéticos. 2. Insetos nocivos - Controle. 3. Soja - Metabolismo.  
4. Proteômica. 5. Flavonóides. 6. Regulação de expressão gênica.  
I. Ramos, Humberto Josué de Oliveira, 1969-. II. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia  
Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 632.7

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317


**VALQUÍRIA JOANA MEDINA PINHEIRO**

**VIA METABÓLICA DOS FLAVONÓIS EM GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES  
AO ATAQUE DE INSETOS PRAGAS**

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: 29 de maio de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 VALQUÍRIA JOANA MEDINA PINHEIRO  
Data: 27/08/2024 19:15:20-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Valquíria Joana Medina Pinheiro  
(Autora)

Documento assinado digitalmente  
 HUMBERTO JOSUE DE OLIVEIRA RAMOS  
Data: 27/08/2024 20:13:21-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Humberto Josué de Oliveira Ramos  
(Orientador)

*À todas mulheres cientistas e à minha querida mãe.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o Início, Meio e Fim, por ter me capacitado, me sustentado e colocado em minha vida tudo que precisei para concluir mais esta etapa.

Ao meu orientador, professor e amigo Humberto Ramos, por todos ensinamentos, incentivos, pela paciência e compreensão e à sua esposa Ju, por sempre me acolherem com carinho.

À toda minha família, especialmente minha mãe Magna, companheira, meu suporte emocional, por ter acreditado em mim desde o início, por me apoiar nesta jornada, por me ajudar e me incentivar a buscar o que ninguém pode tirar de mim: conhecimento. Agradeço ao meu pai e meus irmãos. Ao Vinícius, meu parceiro de profissão, por reascender todas as luzes que precisei, pelo companheirismo e por agir como o irmão mais velho às vezes. À minha cunhada e amiga Larissa e aos meus sobrinhos Anabelle, Nicole e Mateus que, muitas vezes, foram minha motivação.

Agradeço imensamente a todas as pessoas que conheci em Viçosa e marcaram presença nestes meus 11 anos de estudos, deixando a vida mais leve. Companheiras e companheiros de curso, da música, das festas, dos estudos, de moradia e amizades que transcendem tempo e espaço. Agradeço aos amigos de 2018, do G.R.E.T.A., especialmente à Letícia Soares, Heitor, Gabriel e Carol, Rômulo cantador e Raquel Mendes: obrigada por estarem incondicionalmente comigo nas alegrias e nas tristezas. Ao Lucas carioca e Eulálio por serem grande fonte de inspiração.

Ao coral Voix-là e à professora Gracia Regina, pelos 10 anos no melhor grupo de convivência que já participei, por todos os aprendizados como musicista, mas, principalmente como pessoa e a tantas pessoas lindas e carinhosas que pude conhecer e que ficarão no meu coração eternamente, meu MUITO OBRIGADA!

Como parte da jornada, agradeço à equipe de médicos que mudou minha vida, pelo atendimento solícito e humanizado, Vitor Kelles, Gerson Matedi e Thomaz Protti. À mais especial e mais linda, “minha” psicóloga Giselle, que me fez ver a vida por outros olhos, me ajudou a recuperar minha identidade, me ensinou conviver com o transtorno bipolar e me ensinou voltar a ser feliz! Gratidão!

Obrigada, minhas amigas e amigos de infância, do CNEC e de Ubaporanga. A esta cidade, por me acolher tão bem e me dar o sentimento de pertencimento.

Agradeço a todos e todas colegas de trabalho e parceiros de laboratório, como quem aprendi e pude contar, que participaram de cada projeto e cada vitória minha. Gostaria de

agradecer especialmente às professoras Maria Goreti e Beth Fontes, ao professor Maxmiller e aos servidores da casa de vegetação Cal e Naldo, estes que foram de ajuda essencial para obtenção das minhas plantinhas. À minha amiga, “minha estagiária” e parceira de profissão Anna Carolina Henriques, faltam palavras para agradecer pelo início destes 4 anos, muito obrigada!

Ao ser mais importante de toda minha vida, MEU ANJINHO, que veio só para mudar tudo pra melhor e me dar forças para concluir este trabalho. Você nunca será esquecido!

Ao Presidente Lula, ao Ministério de Educação e à Associação Nacional dos Pós-graduandos, por melhorarem nossas condições de vida como estudantes bolsistas. Finalmente vou ter o nome de uma autoridade que aprecio e me orgulha em um dos meus diplomas.

Agradeço o Departamento de Bioquímica e Biologia celular, a todos e todas professoras e técnicos que me formaram na graduação, mestrado e doutorado; ao querido secretário Eduardo pela paciência e pelo sorriso sempre presente no rosto que pode ser visto até nos e-mails trocados.

À mais linda do Brasil, Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de fazer graduação e pós-graduação. Por toda a vida que transborda além dos estudos. Agradeço pela oportunidade de formação, pela Nicolopes, pelo Vijazz, pelo Recanto das cigarras, pela piscina do DCE, pela paisagem maravilhosa que alivia todos os olhos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Bioagro e Nubiomol.

E por último, mas não menos importante, agradeço a mim mesma, pelo grande feito, por ter trabalhado incansavelmente, pela dedicação e por não ter desistido de realizar este sonho!

*“Para tudo há uma ocasião certa;  
há um tempo certo para cada propósito  
debaixo do céu:  
Tempo de nascer e tempo de morrer,  
tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou,  
tempo de matar e tempo de curar,  
tempo de derrubar e tempo de construir,  
tempo de chorar e tempo de rir,  
tempo de prantear e tempo de dançar,  
tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-las,  
tempo de abraçar e tempo de se conter,  
tempo de procurar e tempo de desistir,  
tempo de guardar e tempo de jogar fora,  
tempo de rasgar e tempo de costurar,  
tempo de calar e tempo de falar,  
tempo de amar e tempo de odiar,  
tempo de lutar e tempo de viver em paz.”*

(Eclesiastes 3:1-8, Bíblia Sagrada)

## RESUMO

PINHEIRO, Valquíria Joana Medina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2024. **Via metabólica dos flavonóis em genótipos de soja resistentes ao ataque de insetos pragas.** Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos. Coorientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

O Brasil é o maior produtor mundial de soja e a cultura é uma das contribuintes mais importantes para a economia. As plantações de soja frequentemente sofrem danos causados por pragas de insetos, como a *Anticarsia gemmatalis*, que também ataca outras culturas. Os genótipos de soja têm sido usados para decifrar os mecanismos de resistência, avaliando a atividade de compostos de defesa como inibidores de proteases (PIs) e flavonóis. No entanto, os determinantes genéticos da resistência ainda não foram investigados minuciosamente. Este estudo utilizou a resposta de genótipos resistentes e suscetíveis de soja para avaliar genes e proteínas responsivos ao ataque de lagartas e envolvidos na biossíntese de flavonóis metilados e glicosilados. Rutina e isoramnetina rutosídeo foram produzidas constitutivamente nos genótipos resistentes IAC 17 e IAC 100. Após o ataque de insetos, genes que codificam a sintase de flavonóis e metiltransferases foram altamente regulados em IAC 17. Algumas respostas de defesa contra herbivoria parecem ser constitutivas, enquanto outras foram induzidas ou independentes de JA, como verificado nos níveis de flavonóis. Os níveis de ácido salicílico foram mais altos em IAC 17 e IAC 100. Proteínas ainda não caracterizadas por seu envolvimento em interações planta-inseto, como receptores transmembrana e fatores de transcrição, foram reguladas positivamente no genótipo resistente IAC 17. Parece que a biossíntese constitutiva de flavonóis em ambos IAC 17 e IAC 100 foi herdada do genitor PI229358, tornando os dois genótipos boas fontes genéticas para estudar a biossíntese de flavonóis e sua relação com a resistência a insetos.

Palavras-chave: Pragas de insetos. Resistência. Análise proteômica. Análise metabolômica.

## ABSTRACT

PINHEIRO, Valquíria Joana Medina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2024.  
**Metabolic pathway of flavonols in soybean genotypes resistant to insect pests attack.**  
Adviser: Humberto Josué de Oliveira Ramos. Co-adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira

Brazil is the world's largest producer of soybeans, and the crop is one of the most important contributors to the economy. Soybeans often suffer damage from insect pests, such as *Anticarsia gemmatalis*, which also attacks other crops. Genotypes of soybeans have been used to decipher the resistance mechanisms by evaluating the activity of defense compounds such as protease inhibitors (PIs) and flavonols. However, the genetic determinants of resistance have not been thoroughly investigated. This study used the response of resistant and susceptible genotypes of soybean to evaluate genes and proteins responsive to caterpillar attack and involved in the biosynthesis of methylated and glycosylated flavonols. Rutin and isorhamnetin rutinoside were produced constitutively in the resistant genotypes IAC 17 and IAC 100. Following insect attack, genes encoding flavonol synthase and methyltransferases were highly upregulated in IAC 17. Some herbivory defense responses appear constitutive, while others were induced or JA-independent, as verified for flavonol levels. Salicylic acid levels were higher in IAC 17 and IAC 100. Proteins not yet characterized for their involvement in plant–insect interactions, such as transmembrane receptors and transcription factors, were upregulated in the resistant genotype IAC 17. It appears constitutive flavonol biosynthesis in both IAC 17 and IAC 100 was inherited from the PI229358 parent, making the two genotypes good genetic sources to study flavonol biosynthesis and their relationship with insect resistance.

Keywords: Insect pests. Resistance. Proteomic analysis. Metabolomic analysis.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Objetivos.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Justificativas.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Cultura de soja.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Melhoramento genético de soja e linhagens resistentes .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Mecanismos de defesa de soja contra insetos.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5 Análises ômicas .....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Cultivo da soja e tratamentos.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Extração e fracionamento de proteínas com PEG 15% .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 Separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2DE) .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4 Digestão de proteínas em gel e espectrometria de massa.....</b>	<b>29</b>
<b>3.5 Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão por qRT-PCR.....</b>	<b>30</b>
<b>3.6 Determinação da atividade de lipoxigenases e inibidores de protease totais .....</b>	<b>30</b>
<b>3.7 Extração de fitohormônios e metabólitos secundários por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS) .....</b>	<b>31</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Análises de perfis metabólitos secundários em genótipos de IAC17 e UFV105, infestadas e não infestadas por <i>A. gemmatalis</i>. .....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Análise da expressão gênica em folhas de soja contrastantes para a resistência ao ataque de insetos pragas .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3 Via de biossíntese de flavonóis em genótipos de soja resistente ao ataque de insetos pragas.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4 Perfis de flavonóis em raízes, folhas, flores e vagens de genótipos contrastantes para resistência à <i>A. gemmatalis</i>: IAC 17, IAC 24, IAC 100 (resistentes), UFV 105, Embrapa 48 e BR 16 (suscetíveis). .....</b>	<b>47</b>
<b>4.5 Perfil de compostos fenólicos em raízes, folhas, flores e vagens de genótipos contrastantes para resistência à <i>A. gemmatalis</i>: IAC 17, IAC 24, IAC 100 (resistentes), UFV 105, Embrapa 48 e BR 16 (suscetíveis) .....</b>	<b>49</b>
<b>4.6 Análises de fito-hormônios em genótipos de soja .....</b>	<b>55</b>

<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE A – TABELAS SUPLEMENTARES .....</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICE B – FIGURAS SUPLEMENTARES .....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A soja é um grão de grande importância econômica e social devido ao seu alto valor nutricional com aproximadamente 20% de óleo e 40% de proteína, tornando-a ideal para ser utilizada como matéria prima para produção de óleos e outros derivados (Agrawal *et al.*, 2008). A produção de soja tem crescido nas últimas décadas e, desde 2020 o Brasil ocupa a posição de maior produtor e exportador mundial desse cultivo (EMBRAPA, 2020). No entanto, fatores bióticos e abióticos ainda podem afetar as lavouras, causando prejuízos nas colheitas. Um desses fatores é o ataque de insetos-praga, principalmente lagartas desfolhadoras, que podem atacar as plantas de soja em qualquer etapa do ciclo vegetativo-reprodutivo (Sinclair; Kogan; Mcglamery *et al.*, 1997).

As pragas desfolhadoras têm o potencial de destruir uma grande parte da superfície foliar, consequentemente reduzindo a produtividade das plantas (Singh, 2010). Entre essas pragas, *Anticarsia gemmatalis*, conhecida como lagarta-da-soja, é a principal desfolhadora de soja no Brasil e pode causar desfolhamento de até 100%, resultando em grandes perdas econômicas nas lavouras (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000). Apesar dos avanços tecnológicos nas práticas de combate a essa praga, o meio mais comum de controle nas lavouras de soja ainda é o uso de agrotóxicos, os quais podem causar danos ambientais e à saúde humana (Moscardi *et al.*, 2012).

Além da melhoria das qualidades nutricionais das plantas, tem sido importante obter genótipos resistentes a pragas, seja por meio do melhoramento genético convencional ou pelo desenvolvimento de plantas transgênicas (Auclair, 1989). No Brasil, o Instituto Agrônomo de Campinas destaca-se no melhoramento genético, trabalhando na obtenção de cultivares resistentes a diversos herbívoros, como *A. gemmatalis*. No programa de melhoramento, são utilizadas fontes de resistência múltipla a insetos em cruzamentos, seguido pela seleção de linhagens em condições de campo, em diversos ambientes, visando obter cultivares com boas características agrônomicas e resistência a insetos (Lourenção *et al.*, 1989; Miranda *et al.*, 2003). Por exemplo, os genótipos "L 1-1-01", "IAC 23" e "IAC 74-2832" são resistentes a *Piezodorus guildinii* (bicho verde); os genótipos "IAC 19" e "Conquista" são resistentes à *Bemisia tabaci* (mosca branca), e o genótipo "IAC 17" é resistente a *Euschistus heros* (percevejo marrom) e *Bemisia tabaci* (SOUZA *et al.*, 2015). Um grau variável de resistência à sucção e insetos desfolhadores também foi relatado por Lourenção *et al.* (1989) nas cepas PI 274453, IAC73-2218, IAC78-2318, IAC80-596-2 e IAC80-4228. Resistência a *A. gemmatalis* foi demonstrada em alguns genótipos de soja, como "IAC 17" e "IAC 24" (Fugi *et al.*, 2005;

Gómez *et al.*, 2018; Gómez *et al.*, 2020). No entanto, estudos relacionando o perfil de expressão gênica da soja e mecanismos de defesa contra a herbivoria por *A. gemmatilis* ainda são insuficientes para determinar a resistência (Zavala *et al.*, 2001; Matos, *et al.*, 2002; Fugi *et al.*, 2005).

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra o ataque de insetos como resultado da necessidade de sobrevivência ao longo da evolução. Esses mecanismos envolvem o reconhecimento de moléculas ativadas pelos invasores e a ativação de vias de transdução de sinal que resultam na expressão de genes de defesa (Rojo *et al.*, 2003). Diversos mecanismos de defesa foram descritos na literatura. Estudos indicam que, inicialmente, o reconhecimento do invasor pela planta induz a resistência pela produção de compostos voláteis após o ataque herbívoro, que funcionam como sinalizadores celulares (Moraes *et al.*, 2005) e também têm efeito na interação planta-planta, preparando as plantas vizinhas para um possível ataque futuro (Ton *et al.*, 2005). As vias de transdução de sinal são reguladas pelos hormônios ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (SA), etileno (ET), ácido abscísico (ABA), auxinas, giberelinas e brassinosteroides (Gill *et al.*, 2010; Shivaji *et al.*, 2010). Esses fitohormônios podem agir individualmente, sinergicamente ou de forma antagonista, dependendo do tipo de ataque, proporcionando à planta regulação e rápida adaptação aos estímulos ambientais (Verhage *et al.*, 2010). As vias de defesa também resultam na produção de metabólitos secundários em resposta à herbivoria, como flavonóis e isoflavonas, que protegem a planta contra o estresse oxidativo causado por patógenos, pragas e fatores abióticos (Dakora; Phillips, 1996).

A ativação de vias de defesa regula a expressão gênica e a síntese de compostos tóxicos ou repelentes para os insetos (War *et al.*, 2012). O resultado da modulação do metabolismo pode ser classificado como defesa direta, que afeta o comportamento ou a morfologia do inseto, ou defesa indireta, por meio da produção de compostos que atraem os predadores do predador (Arimura *et al.*, 2009). A resistência das plantas a artrópodes pode ser classificada em três tipos: antixenose (não-preferência), antibiose e tolerância (Painter, 1951; Smith, 2005). A antixenose é caracterizada pela presença de fatores químicos ou morfológicos que afetam negativamente o comportamento do inseto que tenta colonizar a planta. Na antibiose, a planta afeta negativamente a biologia do inseto que tenta utilizá-la como alimento. Tanto a antixenose quanto a antibiose podem exercer pressão seletiva sobre o inseto-praga, potencialmente levando ao desenvolvimento de biótipos. A tolerância é a habilidade da planta de se recuperar de uma injúria causada pelo inseto sem afetar sua biologia e seu comportamento, enquanto recupera as perdas na produtividade (Cannasa *et al.*, 2017).

Os principais fatores associados à defesa de soja contra *A. gemmatalis* incluem proteínas e enzimas, fatores de transcrição, receptores celulares, flavonoides, compostos fenólicos e hormônios vegetais. Entre esses, destacam-se proteínas de defesa, inibidores de protease do tipo Kunitz (SKTI) e do tipo Bowman–Birk (BBI) (Bode; Huber, 1992), que prejudicam a absorção de proteínas no intestino da lagarta causando perda de aminoácidos essenciais e deficiência nutricional (Azzouz *et al.*, 2005). Dentre os flavonoides identificados como prejudiciais a herbívoros estão rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) (Piubelli *et al.*, 2005; Hoffmann-Campo *et al.*, 2006), genisteína (PIUBELLI *et al.*, 2005), metilquercetina, kaempferol e outros compostos O-metilados e glicosilados (Gomez *et al.*, 2018; Gomez *et al.*, 2020). A ativação das vias de defesa nas plantas pode ocorrer de forma induzida pelo ataque da praga ou estar presentes de forma constitutiva em genótipos resistentes, ou seja, as vias podem permanecer ativas durante todo o desenvolvimento da planta mesmo, na ausência da herbivoria (Walters *et al.*, 2007).

Os avanços em biotecnologias como o sequenciamento de genomas trouxeram o surgimento de novas ciências ômicas como a transcriptômica, proteômica e metabolômica, com o objetivo de isolar e caracterizar o RNA, as proteínas e os metabólitos presentes nas plantas em determinadas condições (Espíndola, *et al.*, 2010). A integração das vias de defesa identificadas por meio das ômicas permite a caracterização dos tipos de resistência e mecanismos de defesa das plantas contra pragas.

Atualmente, os principais estudos sobre soja e sua resistência contra *A. gemmatalis* envolvem experimentos de indução de defesa e análise de sobrevivência da lagarta alimentada por extratos vegetais visando identificar genótipos resistentes a *A. gemmatalis* (Gomez, 2020; Ongaratto *et al.*, 2021). Neste trabalho foram avaliados os determinantes genéticos nas cascatas de resistência, por meio da comparação de linhagens utilizadas em cruzamentos para transferência de marcadores de resistência, com progenitores resistentes e suscetíveis à herbivoria. Foram realizadas comparações dos perfis de proteínas, enzimas, metabólitos secundários e expressão gênica de enzimas e promotores específicos em genótipos de soja infestados e não infestados pela lagarta, para a avaliação de determinantes genéticos constitutivos. Esses determinantes genéticos podem ser aplicados no melhoramento genético da soja e na busca por compostos naturais de plantas que possam funcionar como alternativa aos agrotóxicos utilizados nas lavouras.

## 1.1 Objetivos

- Comparação perfis genéticos de genótipos brasileiros de soja contrastantes para resistência à *A. gemmatalis*;
- Identificação dos íons diferencialmente abundantes, por LC/MS, alinhamento de cromatogramas e comparação com bibliotecas de metabólitos secundários, em folhas dos genótipos IAC 17 (resistente) e UFV 105 AP (suscetível), infestados e não infestados pela lagarta de *A. gemmatalis*;
- Identificação e quantificação relativa de proteínas, por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, em folhas dos genótipos IAC 17 (resistente) e UFV 105 AP (suscetível), infestados e não infestados pela lagarta de *A. gemmatalis*;
- Quantificação de expressão gênica de fatores de transcrição, proteínas de defesa e enzimas da via de biossíntese de flavonóis, por qRT-PCR, em folhas dos genótipos IAC 17 (resistente) e UFV 105 AP (suscetível), infestados e não infestados pela lagarta de *A. gemmatalis*;
- Comparação da via biossíntese de flavonóis e isoflavonas, por LC/MS, em folhas dos genótipos IAC 17, IAC 100, IAC 24 (resistentes), BR 16, EMBRAPA 48 e UFV 105 AP (suscetíveis), infestados e não infestados pela lagarta de *A. gemmatalis*;
- Quantificação de flavonoides e compostos fenólicos, por LC/MS, em raízes, folhas, flores e vagens verdes dos genótipos de soja IAC 17, IAC 100, IAC 24 (resistentes), BR 16, EMBRAPA 48 e UFV 105 AP (suscetíveis) cultivadas na ausência de herbivoria;
- Quantificação relativa dos hormônios ácido salicílico e ácido jasmônico, por LC/MS, em folhas dos genótipos IAC 17, IAC 100, IAC 24 (resistentes), BR 16, EMBRAPA 48 e UFV 105 AP (suscetíveis), infestados e não infestados pela lagarta de *A. gemmatalis*.

## 1.2 Justificativas

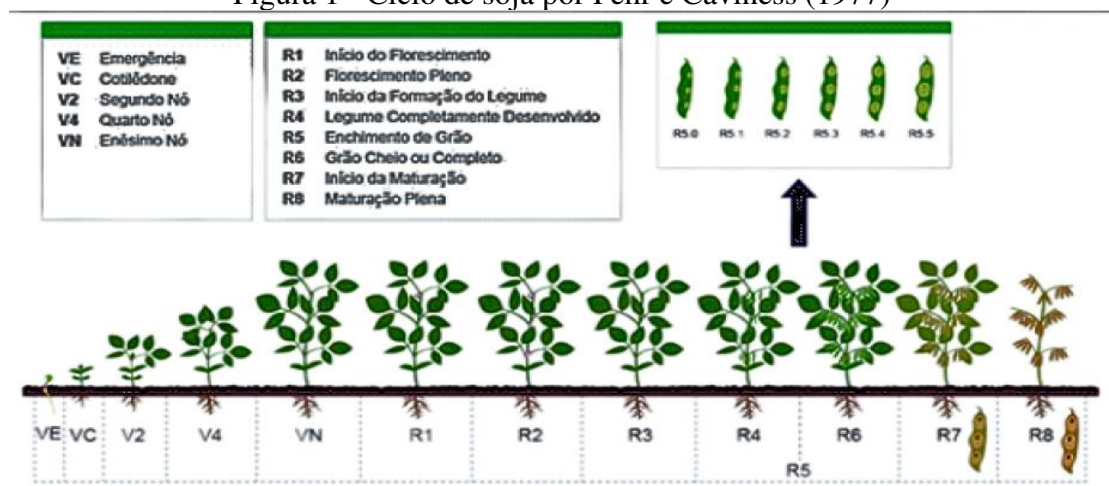
O uso de agrotóxicos ainda é a principal forma de combate a pragas em plantações. Determinantes genéticos de resistência podem sugerir compostos naturais de defesa para serem utilizados no melhoramento genético e/ou produção de pesticidas naturais para lavouras de soja.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cultura de soja

A soja é classificada dentro do reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae (Papilionoideae), e pertence ao gênero *Glycine*. A espécie de soja cultivada é a *Glycine max* (L.) Merrill (Costa, 1996; Sedyama, 2009). As variedades comerciais podem diferir na ramificação do caule e no tamanho, influenciadas pela exposição à luminosidade que varia de acordo com a época do plantio (Borém, 2005). A raiz da soja possui um eixo principal com várias ramificações, enquanto as folhas são geralmente trifoliadas (com exceção do primeiro par de folhas, que é simples). As flores podem apresentar cores variadas, como branco, roxo ou intermediário, e os grãos se desenvolvem em vagens (legumes) que passam por diferentes tonalidades de verde para amarelo-pálido, marrom-claro, marrom ou cinza. As sementes são lisas, elípticas ou globosas, com tegumento amarelo-pálido e hilo preto, marrom ou amarelo-palha (Sedyama, 2009). Fehr e Caviness (1977) dividiram o ciclo de vida da soja em vegetativo (V) e reprodutivo (R), sendo que o primeiro é subdividido de acordo com a quantidade de nós e o segundo de acordo com o desenvolvimento das flores e legumes.

Figura 1 - Ciclo de soja por Fehr e Caviness (1977)



Fonte: Tejo e Fernandes (2019).

Algumas características fenotípicas da soja, como altura da planta e floração, são influenciadas pelo ambiente e pela variedade (cultivar). A estatura ideal das plantas de soja para as lavouras geralmente varia entre 60 e 110 cm, o que facilita a colheita mecânica e reduz o risco de acamamento. A floração da soja é influenciada pelo fotoperíodo, ou seja, pelo

comprimento do período noturno. A soja é considerada uma planta de dias curtos, pois sob dias longos, ela tende a atrasar sua floração e prolongar seu ciclo de crescimento. No Brasil, as cultivares de soja são classificadas em precoce, semiprecoce, semitardia e tardia, dependendo da região de plantio (AGEITEC, 2020).

A soja é uma leguminosa amplamente utilizada na alimentação humana e animal devido ao seu alto teor de proteínas e óleo, com cerca de 20% de óleo e 40% de proteína (Hartman *et al.*, 2011). Representando aproximadamente 6% da área cultivada globalmente (Hartman *et al.*, 2011), a soja é uma das plantas mais importantes em termos de fornecimento de alimentos para humanos, proteína para alimentação animal, óleo para uso culinário (Ribeiro *et al.*, 2009), fitoestrógenos (Shahidi, 2009) e biodiesel. Nas últimas décadas, o cultivo de soja tornou-se de grande relevância na agricultura mundial, com o Brasil destacando-se como um dos principais produtores, especialmente nos estados do Mato Grosso e em outras regiões do Centro-Oeste ao Sul (CONAB, 2023). O Brasil ocupa a posição de maior produtor e exportador mundial de soja, com a maior parte da produção destinada à exportação para ser utilizada na fabricação de alimentos e rações (EMBRAPA, 2023; Agrawal *et al.*, 2008).

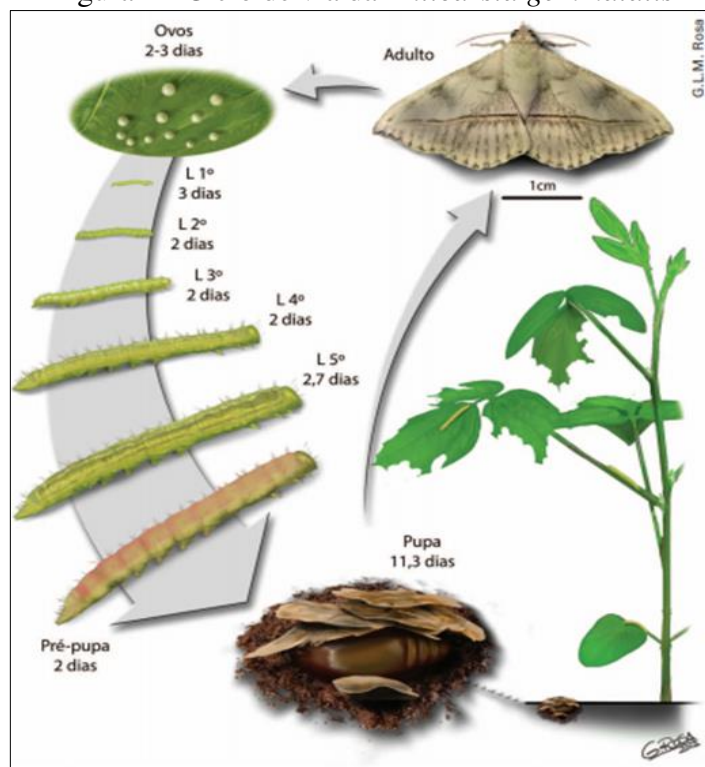
Apesar das condições favoráveis de solo e clima para o cultivo de soja, as lavouras enfrentam diversos prejuízos causados por fatores bióticos e abióticos, que podem variar desde a degradação do solo até a redução da produtividade (Wang *et al.*, 2003). Os fatores abióticos incluem condições climáticas, como temperatura e disponibilidade de água (Tang *et al.*, 2021), bem como práticas de adubação. Entre os fatores bióticos estão fungos, bactérias vírus e, destacam-se os insetos-praga, como a *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), que utilizam as plantas de soja ao longo de seu ciclo de vida para oviposição e alimentação (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000).

A defesa natural de soja contra insetos praga como *A. gemmatalis*, mais conhecida como lagarta-da-soja, pode ser direta ou indireta. As defesas diretas são mediadas pelas características das plantas que prejudicam o ciclo de desenvolvimento da praga, como espinhas e folhas grossas com pelos que atrapalham a oviposição (Howe; Jander, *et al.* 2008; Dudareva *et al.*, 2006; Arimura *et al.*, 2009), e/ou pela produção de compostos tóxicos, como metabólitos secundários e proteínas (peptídeos, inibidores de proteases), terpenóides, alcalóides, antocianinas, fenóis e quinonas (Smith; Clement, 2012). Esses compostos podem ter efeito tóxico, repelente e causar deficiência nutricional nos herbívoros (War *et al.*, 2012), prejudicando o desenvolvimento e até causando a morte (Usha; Jyothsna, 2010; War *et al.*, 2011a; 2011b). As defesas indiretas consistem na produção de compostos voláteis que podem atrair os predadores naturais dos herbívoros (Arimura *et al.*, 2009).

## 2.2 *Anticarsia gemmatalis*

*Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto da ordem Lepidoptera, sendo o adulto uma mariposa de coloração geralmente marrom e hábito noturno. Frequentemente encontradas durante o dia em locais sombreados, principalmente na base das plantas (Pratissoli, 2002). No entanto, todo o processo reprodutivo ocorre durante o período noturno, e os ovos são depositados de forma agrupada ou isolada nos caules, ramos, pecíolos e na face axial das folhas (Schmidt *et al.*, 2001). As lagartas apresentam coloração verde com estrias brancas, que assumem a cor preta, mantendo as estrias. Podem apresentar cinco ou seis instares larvais e medirem até 4-5 centímetros, alimentando-se das folhas em todos os instares (Gazzoni *et al.*, 1998).

Figura 2 - Ciclo de via da *Anticarsia gemmatalis*



Fonte: Hoffmann-Campo *et al.* (2012).

*A. gemmatalis*, também conhecida como lagarta-da-soja, é a principal praga da soja, mas também afeta lavouras de outros grãos e leguminosas (Pratissoli, 2002). Esta praga representa um grande risco à produção e qualidade dos cultivos de soja, pois acomete todas as áreas de produção no Brasil e, sendo uma mastigadora, pode levar a 100% de desfolhamento da planta (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000), diminuindo a taxa de fotossíntese e a produtividade da lavoura (Silva *et al.*, 2002). O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, devido à

diminuição da área foliar responsável pela fotossíntese, com consequente redução da produção de grãos. Quando se alimentam, além de remover os tecidos vegetais que contêm nutrientes, as lagartas injetam toxinas nas plantas (Silva *et al.*, 2002). A forma comum para controlar as infestações por esta praga tem sido o uso de agrotóxicos (Vieira, 2003), sendo a lagarta-da-soja responsável pelo grande percentual de aplicações inseticidas aplicadas nas lavouras de soja (Moscardi *et al.*, 2012).

### **2.3 Melhoramento genético de soja e linhagens resistentes**

Como mencionado anteriormente, várias características da soja estão sujeitas às condições ambientais do plantio, o que também influencia a produtividade das lavouras, tendo impactos significativos no setor econômico. Mesmo em solos e climas favoráveis ao cultivo, as plantações podem enfrentar estresses bióticos e abióticos, como períodos de seca ou chuva intensa (Cera *et al.*, 2016). Neste ano, por exemplo, as chuvas intensas no estado do Rio Grande do Sul elevaram a umidade dos grãos colhidos, demandando maior consumo de energia nos processos de secagem, nos postos de recebimento, além de aumentar o nível de impureza dos grãos e muitas lavouras apresentaram perdas por ficarem submersas (EMATER, 2024). Dentre os fatores bióticos estão infestações de fungos, vírus, bactérias e, principalmente, ataques de insetos-praga que se alimentam das plantas, resultando em perdas na produtividade. O controle de pragas pode ser realizado por meio de diversas práticas que exigem monitoramento constante das lavouras para evitar a disseminação dos insetos.

Uma das técnicas de controle é o controle biológico, que consiste na regulação populacional, seja de plantas ou animais, por inimigos naturais, que são os agentes bióticos de mortalidade. Envolve o mecanismo da densidade recíproca (ou densidade-dependente), o qual atua de tal forma que uma população é regulada por outra população (Parra *et al.*, 2002). Outra abordagem mais abrangente é o Manejo Integrado de Pragas, que se baseia na amostragem das pragas e no monitoramento das lavouras, utilizando métodos de controle apenas quando a praga atinge um nível considerado prejudicial (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000).

No entanto, o método mais amplamente utilizado atualmente ainda é o uso de inseticidas, que podem causar danos tanto ao meio ambiente quanto à saúde humana. Portanto, é necessário obter novas substâncias para o controle de pragas, especialmente em decorrência da capacidade adaptativa dos insetos, e que sejam condizentes com as exigências da sociedade. Além disso precisam estar em conformidade com a sustentabilidade ambiental (Boiça Júnior *et al.*, 2015).

A produtividade de uma lavoura reflete a resistência (termo utilizado para pragas e doenças) e/ou tolerância (tipo de resistência para insetos praga e estresses abióticos) que a planta apresenta, portanto, desde os anos 80 procura-se por genótipos que sejam resistentes ou tolerantes para alcançar maior rendimento por meio de técnicas de melhoramento genético (Carter *et al.*, 2004). Para combater o ataque de insetos por meios alternativos aos pesticidas, muitos pesquisadores têm buscado compreender a defesa natural da soja e determinar os fatores de resistência em diferentes genótipos. Esses fatores podem ser aplicados no melhoramento genético para obter espécies resistentes a determinadas pragas e, também, no desenvolvimento de pesticidas de origem vegetal (Fugi *et al.*, 2005; Hoffmann-Campo *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2018; Gómez *et al.*, 2018)

A transformação genética de plantas (transgênicas) avança chamando a atenção de programas de melhoramento da soja, levando à produção de materiais vegetais novos e geneticamente variados, com marcadores de resistências para estresses bióticos e abióticos. As plantas transgênicas também representam uma ferramenta inestimável para fins estudos moleculares, genéticos, bioquímicos e fisiológicos por superexpressão ou silenciamento de genes, mutagênese baseada em transposon, localização subcelular de proteína e / ou caracterização de promotores (Homrich *et al.*, 2012). O método convencional bastante utilizado para obtenção de genótipos resistentes ou tolerante consiste em selecionar os cultivares com as características desejadas e realizar vários cruzamentos até se obter um genótipo que atende às expectativas, principalmente com fase de maturação rápida e alta produtividade (Ferreira Júnior *et al.*, 2015).

No Brasil, dentre os programas de melhoramento genético destaca-se o Instituto Agrônomo de Campinas que tem trabalhado na produção de cultivares resistentes a diferentes tipos de insetos-praga que podem afetar a cultura da soja. O programa tem como principal objetivo a obtenção de cultivares resistentes a insetos, utilizando como fontes de resistência germoplasma descendente das introduções PI 171451, PI 227687, PI 229358, e PI 274454 (Lourenção *et al.*, 1989) (Tabela Suplementar 1). Esses genótipos selvagens passam por vários ciclos de seleção para a obtenção de cultivares resistentes comercializáveis (Miranda *et al.*, 2003). Por exemplo, os genótipos "L 1-1-01", "IAC 23" e "IAC 74-2832" são resistentes a *Piezodorus guildinii* (bicho verde); os genótipos "IAC 19" e "Conquista" são resistentes à *Bemisia tabaci* (mosca branca), e o genótipo "IAC 17" é resistente a *Euschistus heros* (percevejo marrom) e *Bemisia tabaci* (Souza *et al.*, 2015). Um grau variável de resistência à sucção e insetos desfolhadores também foi relatado por Lourenção *et al.* (1989) nas cepas PI 274453, IAC73-2218, IAC78-2318, IAC80-596-2 e IAC80-4228. Resistência a *A. gemmatalis*

foi demonstrada em alguns genótipos de soja, como "IAC 17" e "IAC 24" (FUGI *et al.*, 2005; GÓMEZ *et al.*, 2018; GÓMEZ *et al.*, 2020). Dessa maneira tem sido desenvolvida uma grande variedade de plantas de soja de diferentes ciclos que têm resistência a diferentes pragas ao longo do tempo.

#### **2.4 Mecanismos de defesa de soja contra insetos**

A resistência da planta contra os insetos é definida pela sua capacidade de se recuperar do ataque por emissão de novos perfilhos, ou seja, novas vagens, compensando assim as perdas de produção, além da capacidade de prejudicar a atividade do herbívoro em seus tecidos (Goodman *et al.*, 1986). Para isto, as plantas contam com várias vias de defesa natural, que funcionam orquestradamente. A própria morfologia da planta constitui um tipo de defesa que é direta pois, impede os insetos de se alocarem na planta, se alimentarem ou depositar seus ovos (por exemplo, presença de pelos, tricomas, espinhos e folhas espessas e cerosas) (Arimura *et al.*, 2009). A defesa direta conta ainda com a produção de compostos tóxicos que podem ter efeito antinutritivos para o inseto ou agir como repelentes (War *et al.*, 2012). A defesa indireta constitui na liberação de compostos voláteis para atrair inimigos naturais dos herbívoros. Assim, a planta oferece abrigo e alimento para o predador, enquanto ele a protege contra as pragas (Arimura *et al.*, 2009).

Quanto à resistência, as categorias de defesa podem ser classificadas como tolerância, antibiose ou antixenose. A tolerância é o meio de resistência no qual a planta é capaz de suportar e compensar as injúrias causadas por um inseto, aumentando a fotossíntese e a produção de mais folhas e flores, permitindo que seu índice de produtividade seja igual ao de outras plantas não atacadas (Smith; Clement, 2012). A antixenose ou não-preferência é uma defesa que afeta o comportamento dos insetos, já que as características biofísicas e/ou bioquímicas da planta hospedeira faz com que ela seja não preferida para alimentação, oviposição ou abrigo. E a antibiose é a defesa que afeta a biologia dos insetos, com efeitos de mortalidade na fase imatura, menor crescimento e peso, deformações e aumento no ciclo de vida (Boiça-Júnior *et al.*, 2015).

Em estudos com soja, a defesa contra herbívoros tem sido associada a vários tipos de moléculas como proteínas, metabólitos secundários, fatores de transcrição e outros. Dentre as proteínas de defesa, os inibidores de protease (IP) são importantes contra os insetos porque prejudicam sua absorção de proteínas no intestino ao inibir a atividade e causando deficiência nutricional (Azzouz *et al.*, 2005). O grupo de inibidores de proteinases serínicas está entre os genes de defesa mais expressos em resposta a herbivoria e inclui os inibidores do tipo Kunitz

(SKTI) e do tipo Bowman–Birk (BBI) (BODE e HUBER, 1992). A produção dos genes de defesa que codificam os inibidores de protease está associada ao aumento de ácido jasmônico (AJ) produzido pela via das lipoxigenases (LOX). Porém, recentes experimentos ainda indicam que para o cultivar IAC 17 (resistente a *A. gemmatalis*) a produção dos inibidores de protease não depende da via do ácido jasmônico e LOX (Gomez *et al.*, 2018; Pinheiro *et al.*, 2024). Em um estudo no qual lagartas de *A. gemmatalis* foram alimentadas com os inibidores SKTI e BBI, o efeito da inibição proteolítica nas lagartas só foi observado em determinado momento do ciclo, causando atraso no desenvolvimento e perda de peso. Mas após contínua exposição, as lagartas mostraram aumento da produção de tripsina e outras proteases, sem ter sua sobrevivência afetada (Mendonça *et al.*, 2019). Lagartas de *Helicoverpa armígera* também alimentadas com SKTI não tiveram atraso no seu desenvolvimento, pois compensaram a inibição da tripsina com a indução de produção de quimiotripsina, que é insuscetível ao inibidor SKTI. Por outro lado, o efeito do inibidor afetou a expressão de genes do metabolismo de carboidratos e de defesa imune (Kuwar *et al.*, 2015).

Os flavonoides são uma classe importante de produtos naturais; em particular, pertencem a uma classe de metabolitos secundários das plantas, com estrutura polifenólica, pertencendo à família dos Polifenóis e são amplamente encontrados em frutas, vegetais e certas bebidas (Burak; Imen, 1999). Com base em sua estrutura, os flavonoides podem ser divididos em seis grupos: flavonas, flavonóis, flavan-3-óis, flavanonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas, que diferem no padrão de seu anel pirano heterocíclico central da estrutura básica dos flavonoides (Panche *et al.*, 2016).

Os flavonóis e isoflavonas são alvos de estudos de resistência em soja devido à sua capacidade de proteger as plantas contra pragas, influenciando o comportamento, crescimento e desenvolvimento dos insetos, por atixenose e/ou antibiose (Simmonds, 2003). O mecanismo de toxicidade de polifenóis para insetos herbívoros foi elucidado no início da década de 2000, definido por causar danos oxidativos no intestino médio por meio do mecanismo de ligação aos tióis, reduzindo assim os tióis não proteicos e o ácido ascórbico tanto nas plantas quanto no tecido epitelial do intestino médio dos herbívoros quando estes consomem polifenóis durante a alimentação, como observado durante a alimentação foliar em soja por *H. zea*. O efeito da ligação dos polifenóis com as enzimas digestivas dos insetos é refletido pelo atraso no desenvolvimento, na muda e, conseqüentemente, pela redução na aptidão dos herbívoros insetos (Harborne, 2000).

Na natureza, os compostos flavonoides são produtos extraídos de plantas e são encontrados em várias partes das plantas sendo usados para crescimento e defesa contra pragas.

Pertencem a uma classe de compostos fenólicos de baixo peso molecular que estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Muitos flavonoides são facilmente reconhecidos como pigmentos de flores na maioria das famílias de angiospermas (Havsteen, 2002). Esses compostos apresentam uma grande variedade estrutural devido a modificações químicas no grupo hidroxila. Por exemplo, a O-metilação de flavonóis reduz sua reatividade e aumenta sua atividade, enquanto a glicosilação aumenta sua solubilidade e estabilidade (Kim *et al.*, 2006). A O-metilação de flavonóis é catalisada pelas enzimas O-metiltransferases (OMTs). Estudos realizados por Piubelli *et al.* (2005) com lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com extratos de plantas resistentes mostraram maior taxa de mortalidade em extratos com alta concentração de rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) e genisteína. Em outro experimento semelhante, a rutina afetou negativamente o crescimento das lagartas, inibindo sua alimentação de forma proporcional às concentrações do flavonol na dieta e interações pós-digestivas, resultando na redução da conversão de alimentos em biomassa (Hoffmann-Campo *et al.*, 2006). Flavonóis como quercetina e kaempferol estão associados a propriedades antioxidantes na soja (O'Neill *et al.*, 2010). Recentemente, metilquercetina e kaempferol foram identificados em altas concentrações no genótipo IAC 17 de forma constitutiva, e lagartas alimentadas com folhas dessa linhagem apresentaram baixas taxas de sobrevivência, além de malformações intestinais (Gomez *et al.*, 2020). Em um estudo similar, a inserção de quercetina na dieta artificial de larvas de *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae), prolongou significativamente a duração do desenvolvimento das larvas de *H. cunea* e inibiu seu crescimento. A análise dos índices nutricionais indicou que a quercetina afetou significativamente o uso dos nutrientes, incluindo efeitos na digestibilidade aproximada, índice de consumo, taxa de crescimento relativa e eficiência na conversão do alimento ingerido em substância corporal. Além disso, os resultados revelaram que a quercetina reduziu o conteúdo de carboxilesterases e aumentou a atividade ou o conteúdo de glutathione S-transferases, UDP-glucuronosiltransferases e transportadores de caixa de ATP nas larvas de *H. cunea* (Gao *et al.*, 2022). Quercetina e Luteolina inseridos na dieta de pulgões do feijão preto (*Aphis Fabae*) levaram a inibição da alimentação, principalmente em altas concentrações, a luteolina levou a inibição total da ingestão de alimento dos pulgões (Golawska *et al.*, 2024).

Muitos hormônios também têm sido associados à resposta de defesa à herbivoria, na comunicação celular e/ou entre plantas (War *et al.*, 2011). Fito-hormônios como ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (AS) e etileno (ET) atuam mediando vias de transdução de sinais (Gill *et al.*, 2010; Shivaji *et al.*, 2010). Estes hormônios podem agir individualmente, sinergicamente ou antagonicamente, de acordo com o tipo de ataque, proporcionando à planta

um alto potencial de regulação e pronta adaptação aos estímulos ambientais (Verhage *et al.*, 2010). Hormônios como ácido abscísico (ABA), auxinas, giberelinas e brassinosteróides também têm emergido como focos na luta contra as pragas, podendo agir sinergicamente com AS-AJ-ET no sistema de sinalização de defesa das plantas (Howe; Jander, 2008; Vleesschauwer *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016).

O ácido jasmônico é a molécula mais importante na regulação dos compostos voláteis induzidos após o ataque de herbívoros e está conectado à preparação das plantas a futuros ataques (Ton *et al.*, 2005), ativando as vias de defesa diretas e indiretas (Usha *et al.*, 2010; Shivaji *et al.*, 2010; War *et al.*, 2011).

Todas as plantas possuem um sistema natural de defesa contra pragas, que conta com aspectos estruturais e bioquímicos. Estes aspectos podem ser pré-formados ou pós-formados na tentativa de ataque do inseto, ou seja, podem ser características de genes constitutivos ou resultado de indução de defesa que se iniciam com o reconhecimento, da planta, de sinais exógenos provenientes do invasor, que leva a mecanismos de transdução desses sinais e resulta em extensa reprogramação do metabolismo celular vegetal, envolvendo mudanças na atividade gênica (Walters *et al.*, 2007). Alguns estudos mostraram que o reconhecimento do herbívoro pela planta leva à indução de resistência a partir da produção de compostos voláteis e formas voláteis de fitohormônios após o ataque herbívoro, que funcionam como sinalizadores celulares (Moraes *et al.*, 2005). Por outro lado, experimentos com genótipos conhecidos como resistentes expostos à herbivoria mostraram que alguns compostos de defesa são produzidos mesmo na ausência da herbivoria, ou seja, constitutivamente, podendo representar marcas de resistência provenientes da segregação de genes no cruzamento de genótipos resistentes (Fugi *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2020)

Em experimentos prévios à realização deste, linhagens contrastantes de soja quanto a resistência a *A. gemmatilis* serviram de alimento à lagarta e uma análise do perfil proteico foi realizada nas folhas coletadas com e sem alimentação da lagarta para comparação das respostas induzidas e constitutivas (Gomez *et al.*, 2020). Algumas dessas proteínas presentes no genótipo resistente foram selecionadas para a construção de primers que foram utilizados neste estudo para avaliação da expressão de genes de defesa presentes constitutivamente na soja. Dentre essas proteínas, destacam-se algumas proteínas de defesa, alguns receptores e transdutores de sinal, fatores de transcrição e enzimas envolvidas nas vias de biossíntese de flavonoides.

## 2.5 Análises ômicas

Os avanços no sequenciamento de genomas têm transformado significativamente os estudos bioquímicos. A integração de várias áreas do conhecimento tem possibilitado progressos significativos em genômica, transcriptômica e proteômica. A compreensão dos processos de transcrição da informação genética, bem como a análise do conjunto de produtos gênicos por meio da proteômica, têm sido aprimoradas com a disponibilidade de dados genômicos.

O advento do sequenciamento do genoma humano, no início desta década, marcou o início de uma nova era na biologia, conhecida como "era pós-genômica". Nesse contexto, houve um impulso no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que permitem avanços nessas novas ciências ômicas, como a transcriptômica, proteômica e metabolômica. O objetivo principal dessas abordagens é isolar e caracterizar o RNA, proteínas e metabólitos presentes nas plantas em condições específicas (Espíndola *et al.*, 2010). A proteômica é uma abordagem que visa caracterizar as proteínas presentes em um determinado contexto biológico, seja pela sua abundância, atividade, modificações pós-traducionais ou interações entre as proteínas (Wright *et al.*, 2012). Essa técnica tem se mostrado uma ferramenta valiosa para identificar diferenças na abundância proteica em plantas de soja sujeitas a diversos tipos de estresse, tanto biótico quanto abiótico (De Vos *et al.*, 2007; Nakabayashi; Saito, 2013; Schauer; Fernie 2006).

As proteínas que apresentam diferenças de abundância podem ser separadas por técnicas como cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) ou gel 2D-PAGE e, em seguida, identificadas por espectrometria de massas. Além de fornecer informações sobre as massas moleculares das proteínas analisadas, a espectrometria de massas permite determinar o padrão de massas moleculares dos peptídeos trípticos gerados a partir das proteínas de interesse (Barah; Bones, 2015). Para identificar as proteínas, o conjunto de massas moleculares obtidas pode ser comparado com bancos de dados de sequências de genes para proteínas traduzidas e clivadas *in silico*, ou então comparado com bancos de dados peptídicos disponíveis mundialmente por meio de métodos de similaridade, como o *mass fingerprinting*.

A metabolômica é definida como o estudo de todos os compostos químicos de baixa massa molecular presentes em um organismo, os quais representam os produtos finais das funções celulares (Fiehn, 2002). Esses níveis metabólicos podem ser influenciados por respostas dos sistemas biológicos a alterações ambientais ou genéticas. Apesar dos desafios experimentais e interpretativos envolvidos na análise da integração metabólica, a combinação

de técnicas de espectrometria de massas oferece uma alternativa robusta e viável para examinar as complexas respostas metabólicas às pressões ambientais (Scherling, 2010).

A integração da metabolômica com outras tecnologias ômicas permite a aplicação de ferramentas que facilitam a identificação de relações de causa e efeito, fornecendo assim valiosas informações sobre as respostas biológicas a diferentes tipos de estresse em plantas (Jorge *et al.*, 2015). Essa abordagem integrada contribui significativamente para uma compreensão mais abrangente dos processos metabólicos e dos mecanismos subjacentes às respostas adaptativas das plantas a condições adversas.

A transcriptômica refere-se ao conjunto completo de transcritos, que incluem RNAs mensageiros, ribossomais, transportadores e microRNAs, de um organismo, órgão, tecido ou linhagem celular. Essa área de estudo permite a quantificação do nível de expressão dos genes utilizando técnicas capazes de analisar milhares de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) simultaneamente (Morozova; Hirst; Marra, 2009). Atualmente, as pesquisas em transcriptômica visam investigar perfis gênicos que possam elucidar os mecanismos celulares envolvidos na defesa e desenvolvimento.

Uma das técnicas amplamente utilizadas para análise do transcriptoma é o PCR quantitativo em tempo real (PCR qRT-PCR - Polymerase Chain Reaction quantitative real time). Essa técnica emprega a detecção de fluorescência para monitorar a amplificação de uma sequência de ácido nucleico durante o processo de PCR. Aumentos na intensidade do sinal fluorescente, gerados por corantes intercalantes ou pela quebra de sondas marcadas com fluoróforos, são utilizados para detectar a presença, ausência ou quantidade de ácidos nucleicos. O número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja um limiar discernível acima do ruído de fundo é chamado de valor de CT. Em comparação entre duas amostras, uma diminuição no valor de CT ( $\Delta$ CT) de um ciclo representa uma duplicação na quantidade do transcrito de interesse (Stephenson, 2016).

As técnicas de cromatografia acoplada a espectrometria de massas também permitem identificar os produtos de reações enzimáticas específicas em amostras vegetais. Ensaio de reações enzimáticas são frequentemente realizados quando se deseja avaliar a presença da enzima na amostra, pela conversão de produto em substrato em determinado tempo (Eisenthal; Danson, 2002). A análise das atividades enzimáticas específicas é uma abordagem importante para compreender os mecanismos envolvidos na produção de compostos em plantas. No entanto, é crucial garantir que os métodos de análise sejam adequados para evitar interferências e obter resultados precisos e confiáveis. O uso de material vegetal bruto pode introduzir variáveis que comprometem a validade dos resultados. Para realização de ensaios de atividades

enzimáticas específicas de forma eficaz, geralmente são utilizadas enzimas purificadas e/ou há necessidade de uma prévia quantificação dos substratos presentes naturalmente nas amostras de extratos vegetais pois, isso ajuda a minimizar potenciais interferências que podem afetar a interpretação dos resultados. Por isso, neste estudo, foram realizadas análises de atividades de enzimas que atuam na conversão de compostos específicos da via de biossíntese de flavonoides, mas, os resultados não foram considerados.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo da soja e tratamentos

Os cultivares de soja foram disponibilizados pela Universidade Federal de Viçosa e pelo Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, Brasil. São eles: IAC 24, IAC 100, IAC 17 (resistentes), Embrapa 48, BR 16 e UFV 105 AP (suscetíveis). As sementes foram colocadas em sementeiras com substrato até a germinação. Em seguida foram transferidas para vasos de 2L com o solo previamente misturado com areia e substrato na proporção 3:1:3. As plantas foram mantidas em casa de vegetação em condições de temperatura de  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  e umidade  $70 \pm 10\%$ , sem uso de defensivos agrícolas e regadas diariamente até atingirem o V4 para análises de folhas e R4 para análises de flores e vagens (Fehr; Caviness, 1977). Foram utilizadas 4 repetições de cada planta para o controle e 4 para o tratamento. Para análises de respostas induzidas pela praga, foram depositadas duas lagartas no terceiro instar de desenvolvimento na quarta e quinta folha de cada planta e o conjunto foi envolto por sacos de tecido de organza e mantido por 90 horas para análises proteômicas, e, 48 horas para análises de metabolômica. As folhas, raízes, flores e vagens foram coletadas e colocadas diretamente em nitrogênio líquido e então armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento dos experimentos. Como controle foram usadas replicatas das plantas sem as lagartas. Assim, os tratamentos foram I (infestado) e NI (não infestado).

#### 3.2 Extração e fracionamento de proteínas com PEG 15%

As proteínas das folhas de soja foram extraídas seguindo o método descrito por Aryal *et al.*, (2012), com algumas modificações (LIMA *et al.*, 2019). As folhas foram trituradas em nitrogênio líquido até a obtenção do pó. Foram pesados 3 g de pó para cada alíquota e adicionados 10 ml de tampão de extração [Tris-HCl 0,5M (pH 8,0), MgCl<sub>2</sub> 20mM, 2% Triton X-100 e 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol, coquetel de inibidor de protease 0,2% (P-9599, Sigma Aldrich), coquetel de inibidor de fosfatase (P-0044, Sigma Aldrich) 1%]. As amostras foram agitadas em vórtex por 30s, em seguida a solução foi filtrada e o filtrado coletado. Posteriormente, 10 ml de polietilenoglicol a 30% contendo tampão de extração PEG 4000 foi adicionado ao filtrado. Esta solução foi agitada em vórtex por 30s, mantida em gelo por 30 min e centrifugada 3200 x g por 20 min a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante obtido contendo as proteínas de baixa densidade foi coletado e precipitado com um volume de ácido tricloroacético a 20% em

acetona durante 16 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A solução foi centrifugada novamente a  $6.000 \times g$  por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspenso e lavado duas vezes com acetona 80% em gelo e centrifugado a  $6000 \times g$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Por fim, o pellet foi lavado com etanol 70% e deixado em repouso para secar à temperatura ambiente. O extrato proteico obtido foi solubilizado em tampão de solubilização composto por ureia 7M, tiourea 2M e CHAPS a 2%. A solução foi solubilizada usando o Processador UltraSonic (Modelo GE 50) por ciclos de 5 a 10 s até completar a solubilização e as amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A concentração de proteína nas amostras foi determinada utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão e as análises foram realizadas em 595 nm (Bradford, 1976).

### **3.3 Separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2DE)**

A focalização isoeétrica (IEF) foi realizada em uma fita IPG de 24 cm com pH 3-10 (GE Healthcare). As fitas foram previamente reidratadas por 14-20 horas com 450  $\mu\text{l}$  de tampão de reidratação (7M ureia, 2M tiourea, 2% CHAPS, azul de bromofenol 0,002%, 2% tampão IPG, 0,2% DTT) com a adição de reagente DeStreak 50% (GE Healthcare). A quantidade de proteína em cada amostra foi de 1,3 mg. As proteínas foram separadas na primeira dimensão usando o sistema de focalização IPGphor3 (GE Healthcare).

Após a focalização, o tampão de equilíbrio (6M ureia, 50mM Tris – HCl (pH 8,8), 30% glicerol e 4% SDS) foi adicionado às fitas, inicialmente contendo 1% (p/v) de DTT por 15 minutos, seguido por 2,5% (p/v) de iodoacetamida por 15 minutos à temperatura ambiente. As fitas IPG foram colocadas em gel de poliacrilamida a 12% e seladas com agarose a 0,5%. A eletroforese foi realizada no sistema EthanDalt Six (GE Healthcare) a 20 mA / gel por 10 horas. Ao final da eletroforese, os géis foram fixados por 16 horas em solução de 40% de etanol e 10% de ácido acético.

Para visualizar os pontos de proteína, os géis foram submersos em solução de azul brilhante de Coomassie por 24-48 horas e foram lavados com água ultrapura para eliminar o excesso de solução colorante. Os géis foram armazenados em solução de ácido acético a 5% e foram digitalizados com ImageScanner III (GE Healthcare), com calibração de imagem pelo software Labscan (GE Healthcare). O perfil proteico de genótipos de soja infestados e não infestados foram comparados pelo software ImageMaster2D Platinum 7 (GE Healthcare) para determinar a abundância de proteínas nos pontos. Pontos que tiveram valores de razão acima de 1,0 e ANOVA com valores de p abaixo de 0,05 foram considerados como diferencialmente abundantes. Três replicatas biológicas foram usadas para cada tratamento. A abundância

diferencial de proteínas nos pontos usando os critérios acima foi convertida em fold-change e classificada como regulada positiva ou negativamente.

### 3.4 Digestão de proteínas em gel e espectrometria de massa

Os pontos de proteína dos géis 2DE foram excisados e descoloridos em solução de bicarbonato de amônia 50 mM/50% de metanol. A digestão proteolítica foi realizada conforme descrito por Coutinho *et al.* (2019) com solução de tripsina a 20 ng/ $\mu$ L por 20 h a 37 °C, utilizando o tampão de extração (50% acetonitrila, 5% ácido fórmico). Os peptídeos foram dissolvidos em ácido fórmico 0,1% (v/v) e analisados por LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa) usando um sistema nano-UHPLC (nanoACQUITY-Waters) contendo uma coluna capilar C18 BEH130 1,7  $\mu$ M -100 nm  $\times$  100 mm, operando a uma vazão de 0,5  $\mu$ L/min. Os peptídeos eluídos do UHPLC foram automaticamente injetados em um espectrômetro de massa ION TRAP (Amazon-Bruker), usando uma agulha de ionização nanoESI. A espectrometria de massa foi realizada conforme descrito por Lima *et al.* (2019) e Coutinho *et al.* (2019).

Os espectros foram analisados usando o programa PEAKS 7.0 com um banco de dados de proteínas de soja do Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), contendo todas as proteínas anotadas. As buscas no banco de dados incluíram oxidação de metionina como modificação variável e carbamidação de cisteína como modificação fixa, uma clivagem perdida, estados de carga de 2+, 3+, 4+, enzima de clivagem semelhante à tripsina e erro de massa de 0,15 Da. Apenas os resultados das identificações de proteínas foram considerados, com uma taxa de descoberta falsa (FDR) inferior a 1,0% e pelo menos três peptídeos únicos.

Após a identificação, as proteínas foram agrupadas de acordo com o processo biológico usando o ClueGo 2.5.4 com os seguintes parâmetros: organismo *Arabidopsis thaliana*; GO\_BiologicalProcess-Custom6 GOA\_27.03.2019; nível de especificidade 3–8 com um mínimo de três genes/termo; pontuação *kappa* de 0,4; opções estatísticas foram teste hipergeométrico bidirecional; e agrupamento de termos GO com termo de grupo líder com base na maior significância. Finalmente, esses resultados foram confirmados usando a plataforma STRING 11.0 (<https://string-db.org/>) com configurações para *Arabidopsis thaliana* como padrão.

### 3.5 Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão por qRT-PCR

As folhas dos genótipos IAC 17 e UFV 105 AP foram trituradas com nitrogênio líquido e maceradas. O RNA total foi extraído de tecidos foliares de plantas controle e infestadas usando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada em gel de agarose corado com brometo de etídio (EtBr) a 0,1 µg/mL e quantificado usando NanoDrop 2000c da Thermo Scientific. Um total de 4 µg de RNA foi usado para a síntese de cDNA com o kit SuperScript III (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A expressão gênica foi avaliada usando um termociclador rápido ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e Fast Master SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific). As reações de amplificação foram realizadas com as seguintes condições de ciclagem: 15 s a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C por 3 s; 30 s a 60 °C e desnaturação final a 95 °C por 20 s, seguida por uma curva de fusão. Os primers específicos para RT-qPCR foram projetados usando o software Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), com temperatura de fusão (T) de 59 a 61 °C, comprimento de 18 a 23 pb, tamanho do produto de amplificação de 120 a 150 pb e conteúdo de GC de 40 a 60%. Três repetições biológicas e três técnicas foram realizadas para cada gene. A expressão gênica foi quantificada usando o método  $\Delta\text{CT}$  e os níveis de expressão foram calculados como  $2^{(-\Delta\text{CT})}$ , (indicativo dos níveis de RNAm). O gene de referência usado para normalização foi UNK-2 (MELO *et al.*, 2018).

### 3.6 Determinação da atividade de lipoxigenases e inibidores de protease totais

Para os ensaios de atividade da lipoxigenase, 1,0 g de folhas trituradas foi homogenizado com 5 mL de solução contendo tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), 1% polivinilpirrolidona (PVPP) e fuoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM (PMSF). Os extratos foram centrifugados a 17.200 G por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado. A análise das atividades de lipoxigenases foi realizada utilizando ácido linoleico como substrato, segundo Da Silva *et al.*, (2007), utilizando o coeficiente de absorvidade molar de 25.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Axelrod *et al.* 1981). A atividade da lipoxigenase sobre o ácido linoleico foi medida pela formação do sistema de ligação dupla conjugada de hidroperóxido, detectado a 234 nm. A mistura para as reações consistia de 10 µL do sobrenadante (extrato vegetal), 4 µL de 10 mM de linoleato de sódio e 1000 µL de tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5. A atividade foi medida após 2 minutos de reação a 234 nm.

Para os ensaios de inibição de protease, 1,0 g de folhas trituradas foi homogeneizado com 5 mL de solução contendo tampão de extração 0,1 M Tris-HCl (pH 8,2) e 20 mM de CaCl<sub>2</sub>, seguido de centrifugação a 17.200 G para 30 min, a 4 °C. As atividades de inibição de protease foram determinadas medindo a inibição da atividade da tripsina purificada quando misturada com o sobrenadante (extrato vegetal) e usando 1,2 mM de L-BApNA como substrato, conforme descrito por Gómez *et al.*, 2020. Foram utilizados dois controles para determinar a atividade inibidora total: (1). controle de tripsina com de 50 µL de tripsina 4,7 x 10<sup>-5</sup> M, 300 µL de substrato e 500 µL de tampão de extração; (2). o controle de substrato com de 50 µL de extrato vegetal, 300 µL de substrato e 500 µL de tampão de extração. A absorbância (410 nm) foi medida após 2,5 minutos. Os tubos de ensaio teste com 50 µL de tripsina, 50 µL de extrato vegetal e 450 µL de tampão de extração foram incubados em temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida, 300 µL de substrato foram adicionados e a absorbância (410 nm) foi medida após 30 segundos. A atividade inibidora foi calculada adicionando os controles de tripsina e substrato e subtraindo a absorbância do tubo de ensaio teste desse valor. Os resultados foram convertidos para mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com a equação  $A \times B / (C \times 1000 \times P)$ , onde: A é a absorbância a 410 nm do teste calculada como descrito; B é a diluição da amostra; P é a concentração de proteína dos extratos vegetais (g.mL<sup>-1</sup>); e C é o fator de tripsina, ou seja, o produto da ação de 1 µg de tripsina ativa usando L-BApNA como substrato resultará em absorbância de 0,019 a 410 nm (Kakade et al., 1974). A concentração de proteína das folhas foi determinada utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão e as análises foram realizadas a 595 nm (Bradford, 1976). Quatro replicatas biológicas e três repetições técnicas foram utilizadas para cada análise. Os dados de atividade de lipoxigenases e inibidores de protease foram submetidos ao teste t de *Student* com significância de 5% (p<0,05). O software GraphPad Prism 6.0 foi usado para a análise estatística.

### **3.7 Extração de fitohormônios e metabólitos secundários por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS)**

Para identificação de íons totais presentes em IAC 17 e UFV 105 AP, foram utilizados 150 mg de tecido fresco triturado em grau de pó e adicionou-se 600 µL do solvente de extração (metanol: álcool isopropílico: ácido acético 20:79:1). As amostras foram submetidas ao vórtex e centrifugadas a 14.000 G por 30 min a 4°C e então foram mantidas em gelo por 30 min. O sobrenadante foi coletado, e o procedimento repetido duas vezes. Os extratos metanólicos foram armazenados a -80°C até a análise. Alíquotas de 5,0 µL foram injetadas no sistema LC/MS no

NuBioMol (Centro de Análise de Biomoléculas-UFV, Brasil). As análises foram realizadas utilizando um sistema UHPLC acoplado a um espectrômetro de massas de triplo quadrupolo (QqQ, Agilent), operado no modo positivo e a amostra foi escaneada pelo Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), conforme descrito por Gomez *et al.* (2020). Os espectros de massa gerados foram processados usando o software Skyline para obter cromatogramas de cada transição íons extraídos (XIC) e após o alinhamento dos cromatogramas por XCMS foram identificados os valores de  $m/z$  dos íons e tempo de retenção. A identificação de moléculas não alvo pela similaridade de fragmentos foi realizada utilizando as bibliotecas NIST e MassBank.

Para quantificação dos fitohormônios ácido jasmônico e ácido salicílico 5,0  $\mu\text{L}$  dos extratos foram injetados no sistema LC/MS pertencente ao NuBioMol. Utilizou-se uma coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8  $\mu\text{m}$ , 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. 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.

Os metabólitos secundários foram extraídos das folhas dos genótipos de soja resistentes (IAC 17, IAC 100 e IAC 24) e dos genótipos suscetíveis UFV 105, BR 16 e Embrapa 48. Para a análise por LC/MS, curvas padrão dos flavonoides (quercetina, apigenina, genisteína, naringenina e kaempferol), gliconjugados (isoquercetina, rutina, isorhamnetina, isorhamnetina 3-glucosídeo e isorhamnetina 3-rutinosídeo) e compostos fenólicos foram usadas para converter os valores de área de pico em  $\mu\text{g/g}$  de tecido vegetal. Todas as análises por LC/MS foram realizadas em quatro replicatas biológicas.

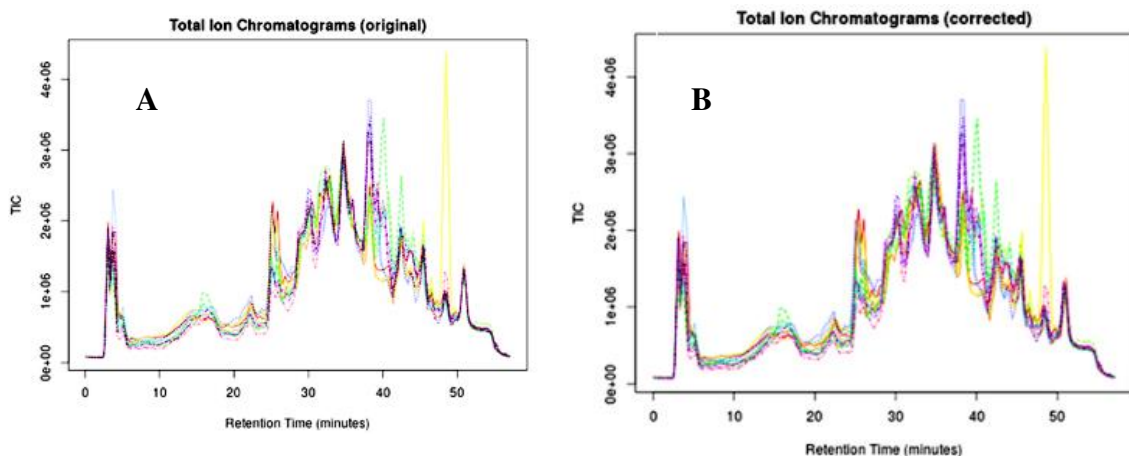
Para visualizar os compostos com abundâncias diferenciais, análises de variância (ANOVA, valor de  $p < 0,05$ ) e agrupamento por *box plot* e *Heatmaps* foram realizadas usando a plataforma MetaboAnalyst.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análises de perfis metabólitos secundários em genótipos de IAC17 e UFV105, infestadas e não infestadas por *A. gemmatalis*.

Foi observado por Gomez *et al.*, 2018 e 2020 que na ausência de ataque de insetos pragas o genótipo de soja IAC17 produzia compostos presentes em extratos foliares suplementados na dieta artificial, que reduziam a sobrevivência das lagartas de *A. gemmatalis*. Para verificar quais compostos estavam sendo produzidos no genótipo resistente IAC 17 e no suscetível UFV 105 na presença (I) e na ausência (NI) da herbivoria por *A. gemmatalis*, os extratos metabólicos das folhas de soja foram analisados por LC/MS e os perfis foram alinhados na plataforma XCMS (Figura 3).

Figura 3 - Alinhamentos dos cromatogramas dos perfis de LC/MS pelo pacote computacional XCMS

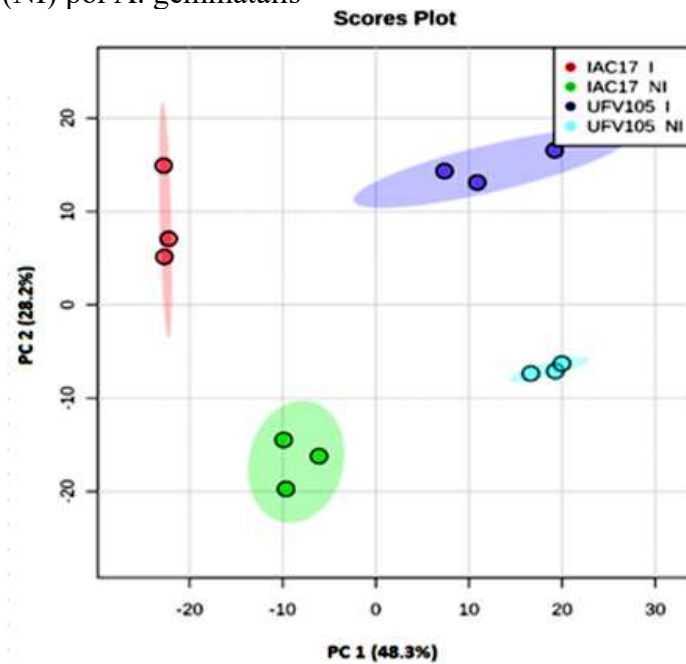


Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Legenda: Em (A) os alinhamentos dos perfis com os tempos de retenções (min) não-corrigidos e em (B) após a correção pelo XCMS.

Esses alinhamentos permitiram a verificação de íons aumentados ou reduzidos após infestação que poderiam explicar a diferença da resistência nos genótipos. Utilizando os métodos PCA e PLS-DA (Mínimos Quadrados Parciais - Análise Discriminante), os perfis dos metabólitos das amostras foram comparados segundo as variáveis mais significantes para agrupamento diferencial dos genótipos e tratamentos (Figura 4).

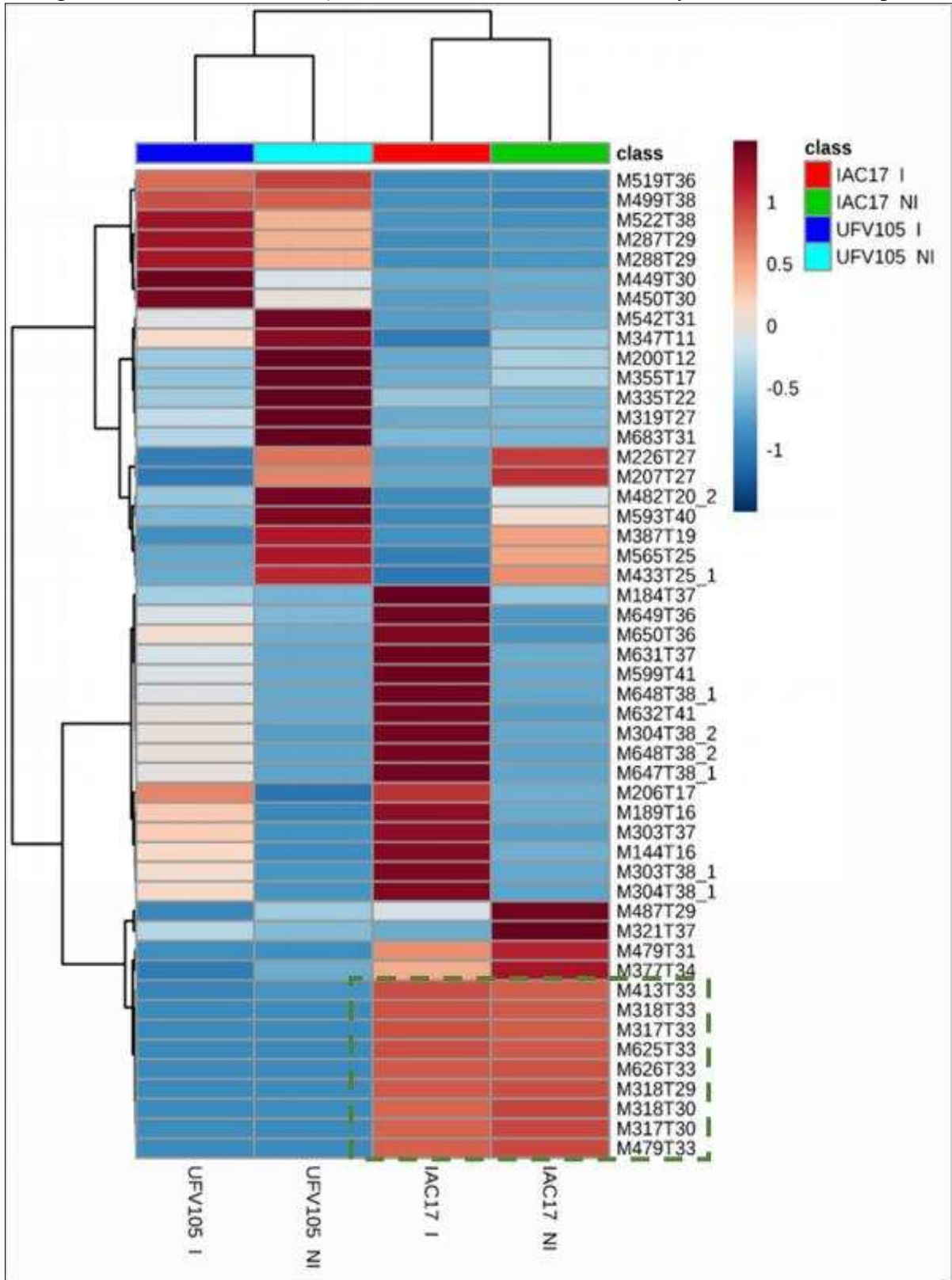
Figura 4 - Agrupamento por PLS-DA dos perfis metabólicos de UFV 105 e IAC 17 infestadas (I) e não infestadas (NI) por *A. gemmatalis*



Como esperado, a análise de componentes principais indicou perfis metabólicos distintos entre os genótipos, bem como sua resposta a infestação (48% da variabilidade observada). Portanto, a herbivoria pela lagarta ativou resposta metabólica diferente nos genótipos contrastantes para a resistência. Porém, o agrupamento dos metabólitos mostrou-se distinto mesmo nas amostras controle, isto é, sem infestação (28% da variabilidade observada). Os íons mais responsivos estão indicados na análise de Vip Score de acordo com os maiores níveis de alteração da abundância relativa em resposta aos tratamentos (Figura Suplementar 1).

Uma análise por agrupamento por *HeatMap* foi utilizada para identificar os íons diferencialmente regulados em resposta aos tratamentos (Figura 5) Os íons foram nomeados de acordo com sua massa molecular (M) e tempo de retenção (T). O agrupamento indicou íons que apresentaram abundâncias relativas elevadas no genótipo resistente IAC17 em relação ao genótipo suscetível UFV105, sendo que estes compostos não alteraram suas abundâncias na ausência da infestação pela lagarta (Figura 5, caixa tracejada em destaque). Estes resultados indicam que estes compostos são produzidos de modo constitutivo pelas folhas do genótipo IAC17, ou seja, mesmo na ausência da infestação pela lagarta da soja. Portanto, poderiam estar relacionados com a redução da sobrevivência observado por Gómez *et al.*, 2020. O mapa também apresenta íons comuns aos dois genótipos não infestados em diferentes intensidades e íons reduzidos no UFV 105, apresentando apenas cinco íons significativamente aumentados pelo ataque da lagarta neste genótipo.

Figura 5 - Análise de agrupamento pelo método de HeatMap dos íons diferencialmente desregulados (ANOVA one-way,  $p < 0.05$ )



Legenda: Os códigos foram nomeados pela letra M (massa molecular) seguidos do valor da massa molecular e T (tempo de retenção) seguido do valor do tempo de retenção encontrado para o íon. Cores mais “quentes” em vermelho intenso indicam aumento relativo da abundância dos íons e cores mais “frias” em azul escuro indicam redução da abundância relativa.

Além disso, alguns íons presentes nas amostras apresentaram a mesma massa molecular com tempos de retenção diferentes, sendo considerados isômeros. Dentre eles, M479T31 e M479T33 não mostraram aumento com infestação, mas estavam presentes com alta intensidade apenas no genótipo IAC 17 (Figura 5).

Os íons diferencialmente abundantes para o genótipo IAC 17 foram comparados por similaridade de fragmentos para identificação de moléculas pelas bibliotecas NIST e MassBank (Figuras 6, 7 e 8). Assim, os íons M317T30, M317T33, M479T31, M479T33 e M625T33 foram identificados como metilquercetina e seus derivados:  $m/z = 317$  como 3-O metilquercetina (isorhamnetina);  $m/z = 479$  como Isorhamnetina-3-O-glicosídeo e  $m/z = 625$  como Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo (Figura 9, XIC 625). Também foram identificados os íons M205T16: triptofano; M303T38 3,4-Dimetoxifenil-7-hidroxycumarina; M595T32: Kaempferol-3-O-glicosídeo-7-O-ramnosídeo. Outros íons presentes não foram identificados por apresentarem baixa intensidade no espectro ou por falta de similaridade dos espectros com os compostos das bibliotecas utilizadas.

Figura 6 - Pesquisa do espectro de fragmentação do íon  $m/z$ : 137 contra a biblioteca de espectros NIST e a identificação da quercetina 3-metilester

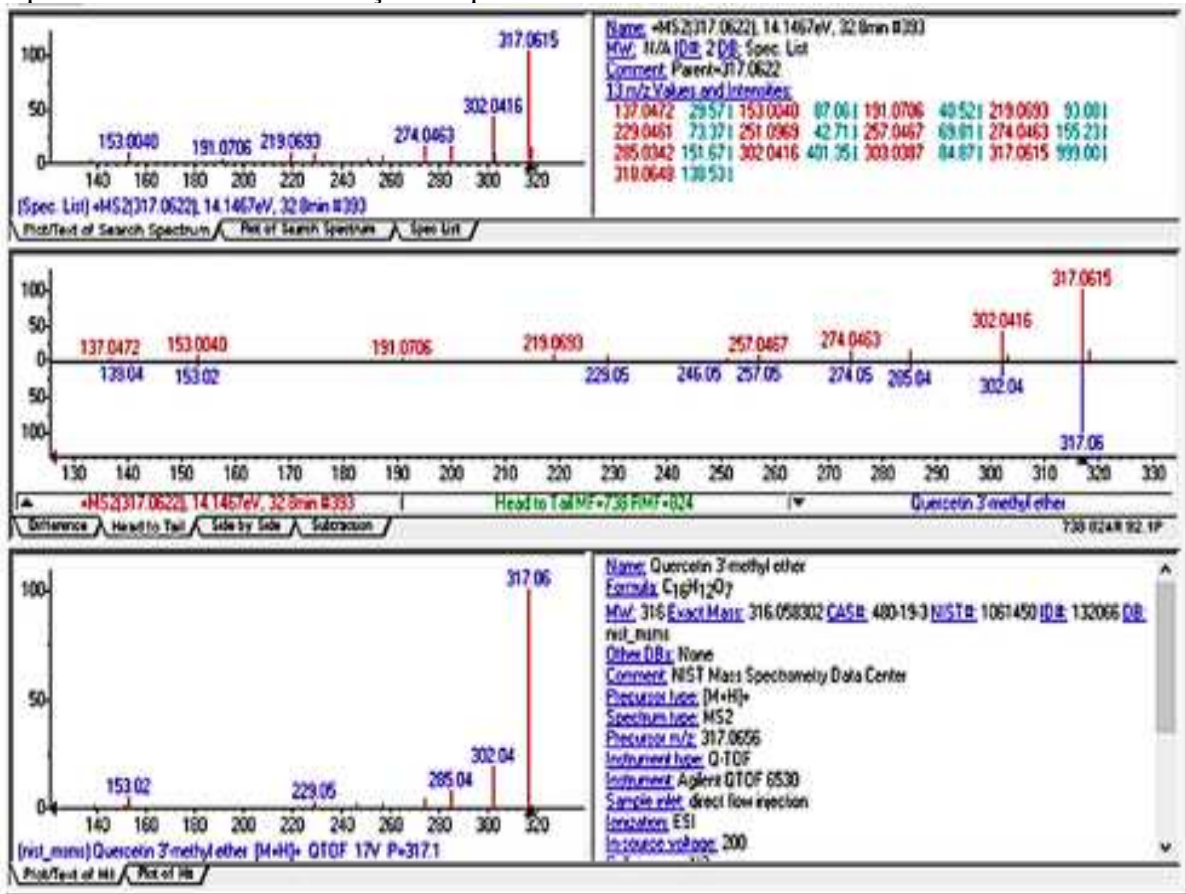
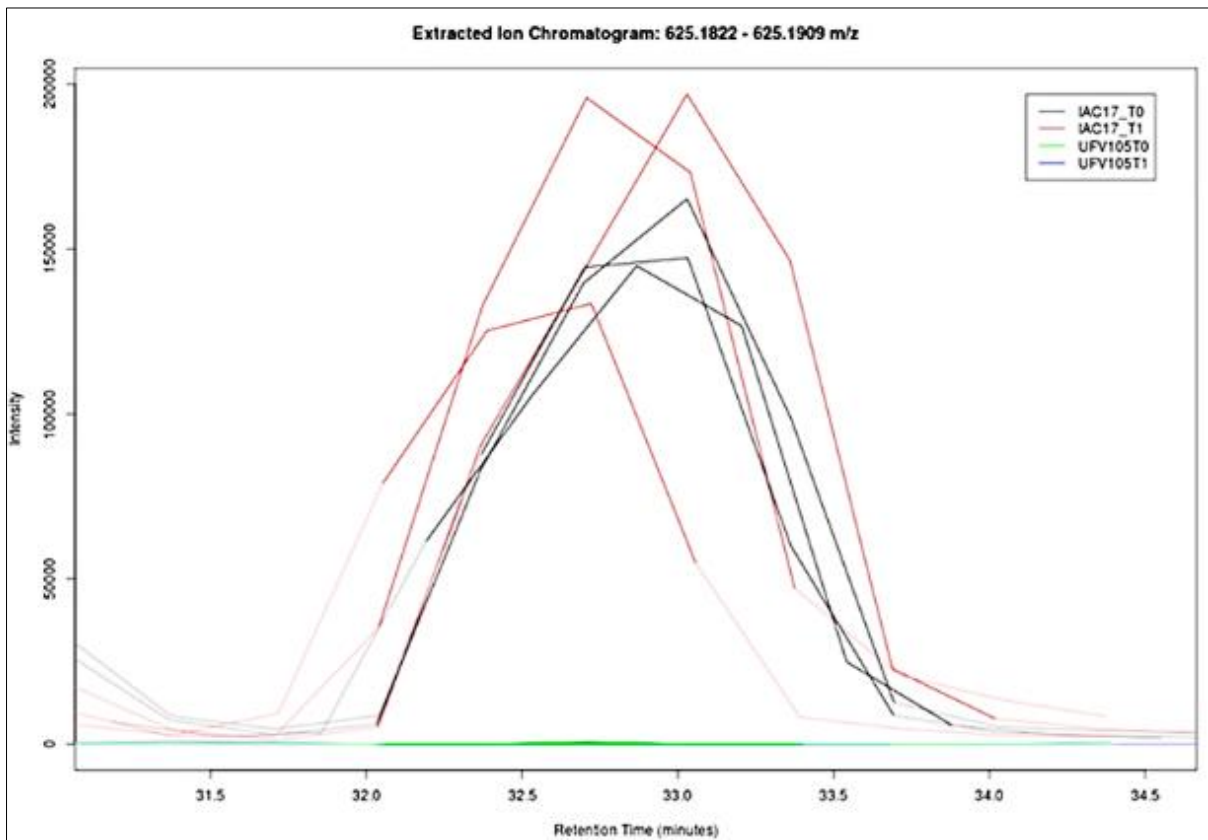




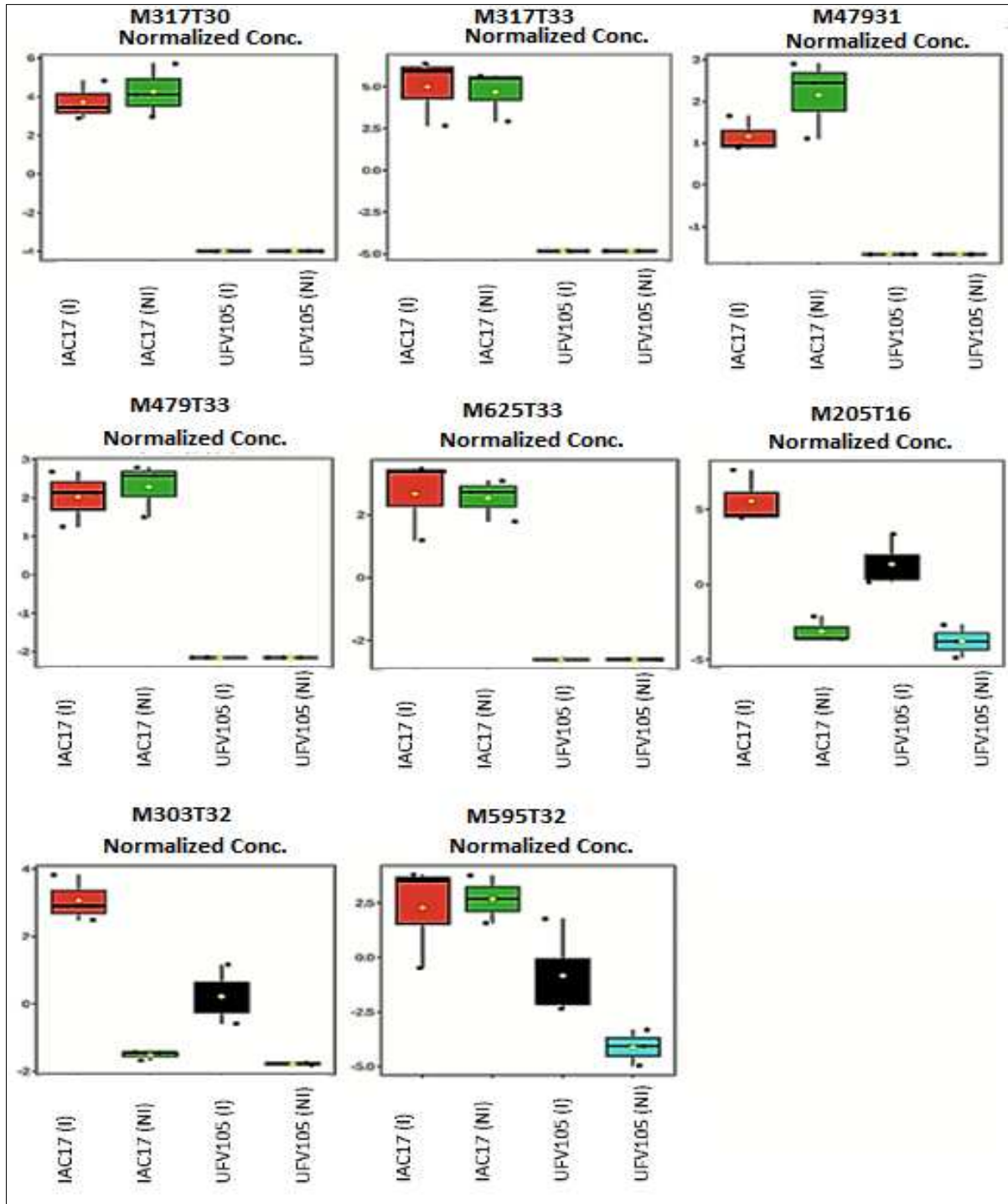
Figura 9 - Alinhamento dos cromatogramas extraídos para o íon  $m/z=625$  identificado como Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo presentes em altas abundâncias somente no genótipo resistente IAC17



Metabólitos com maior abundância em IAC 17 que supostamente estão envolvidos na defesa de soja contra pragas estão indicados na figura (Fig.10).

Os íons identificados como metilquercetina ( $m/z= 317$  e seus derivados glucosilados) como 3-O metilquercetina (isorhamnetina);  $m/z= 479$  como Isorhamnetina-3-O-glicosídeo e  $m/z= 625$  como Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo são componentes da via de flavonóis metilados (Figura 11). A análise desta via indicou que o genótipo de soja IAC17 apresenta esta via com síntese constitutiva flavonóis metilados (Figura 10). Esses resultados complementaram as observações de Gomez *et al.*, 2018 sobre a síntese constitutiva de flavonóis derivados da quercetina glucosilados (isoquercetrina e rutina), que são as formas equivalentes observadas para as quercetinas metiladas, Isorhamnetina-3-O-glicosídeo e Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo (Figura 11).

Figura 10 - Box-plot dos íons diferencialmente abundantes (ANOVA one-way,  $p > 0,05$ ) em respostas aos tratamentos infestados (I) e não infestados (NI) nos genótipos de soja IAC17 e UFV105. Os códigos foram nomeados pela letra M (massa molecular) seguidos do valor da massa molecular e T (tempo de retenção) seguido do valor do tempo de retenção encontrado para o íon.



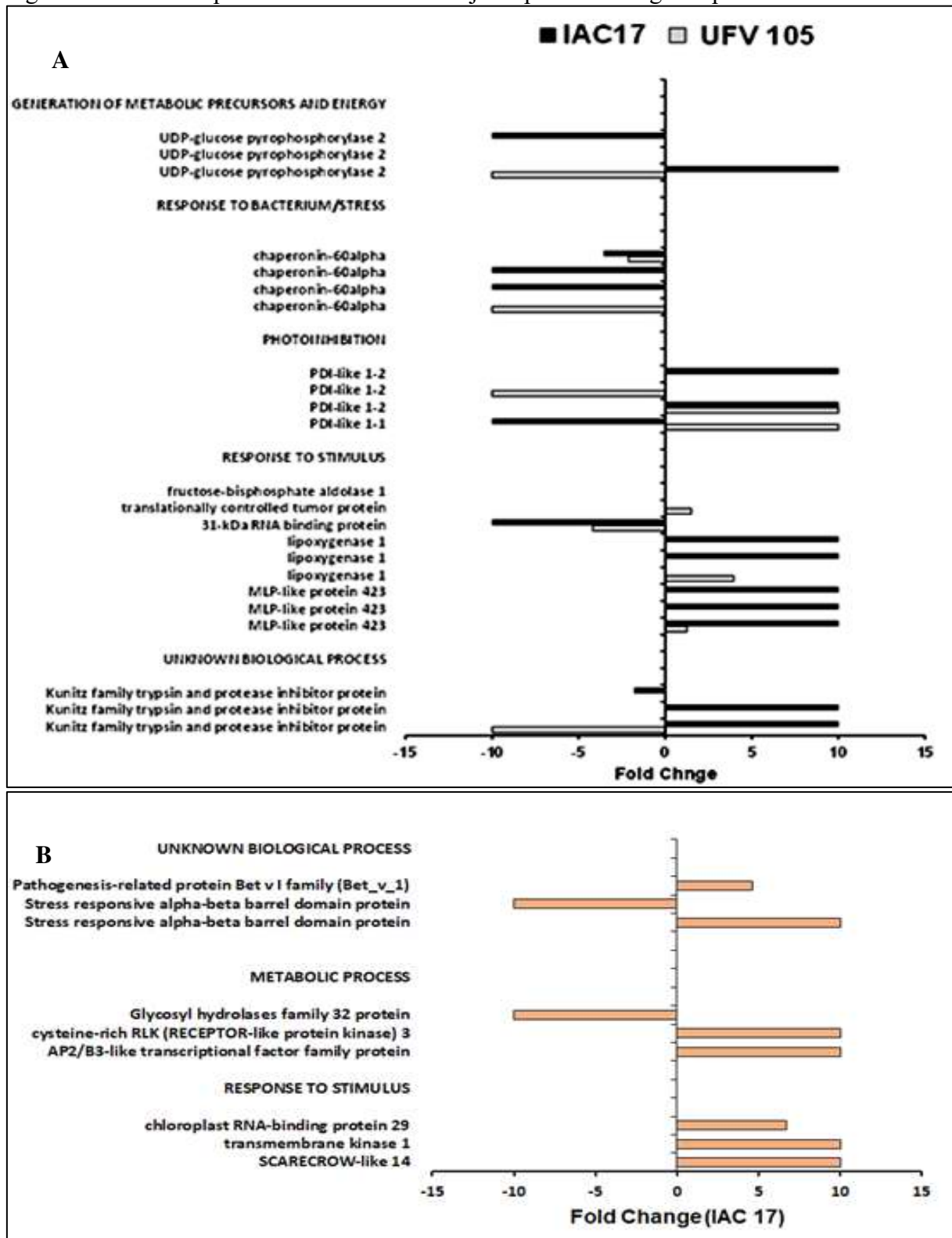


## 4.2 Análise da expressão gênica em folhas de soja contrastantes para a resistência ao ataque de insetos pragas

A expressão gênica foi analisada por 2DE-LC/MS e qRT-PCR para verificar a ativação de genes relacionadas aos mecanismos de resistência ao ataque de insetos pragas no genótipo IAC17.

Setenta e quatro proteínas diferencialmente abundantes foram identificadas no genótipo resistente IAC 17. Sete dessas proteínas foram classificadas como pertencentes à família de proteínas responsivas à resistência a doenças (proteína semelhante a dirigente), proteínas relacionadas à defesa contra patógenos da família PF00407 - proteína relacionada à patogênese da família Bet vI (Glyma.17G030300.1.p), proteína da super família de Rossmann-fold ligada a NAD(P) (Glyma.11G164700.2.p), fatores de transcrição SCARECROW-like 14 (Glyma.11G138600.1.p) e AP2/B3-like (Glyma.16G017100.1.p) (Figura 12). Os níveis de duas proteínas responsivas a estímulos, como a quinase transmembrana 1 (Glyma.14G212100.1.p) e a proteína ligada a RNA do cloroplasto 29 (Glyma.10G058500.1.p), também estavam elevados. Em contraste, as proteínas de choque térmico (HSP) 70 (Glyma.11G140500.1.p) e HSP 70 mitocondrial (Glyma.13G254900.1.p) apresentaram níveis elevados em IAC 17 após a infestação por lagartas. As HSPs protegem as plantas contra estresses bióticos e abióticos restabelecendo a homeostase celular e interagindo com chaperonas e proteases (SUN *et al.*, 2002). A regulação positiva de proteínas envolvidas em cascatas de percepção de sinais e regulação da expressão gênica, como a RLK (quinase de proteína semelhante a receptor) rica em cisteína 3 (Glyma.11G205400.1.p), foi observada apenas para o genótipo resistente IAC 17. Quinases semelhantes a receptores (RLKs) são moléculas de sinalização *upstream* que regulam vários processos biológicos, incluindo a defesa de plantas (OSAKABE *et al.*, 2013). Outra proteína com isoformas reguladas positiva e negativamente foi a UDP-glicose pirofosforilase, que está envolvida na síntese primária de UDP-açúcares. Os açúcares nucleotídicos são os precursores chave para todas as reações de glicosilação e estão envolvidos em vias de defesa de plantas (Decker; Kleczkowski, 2019).

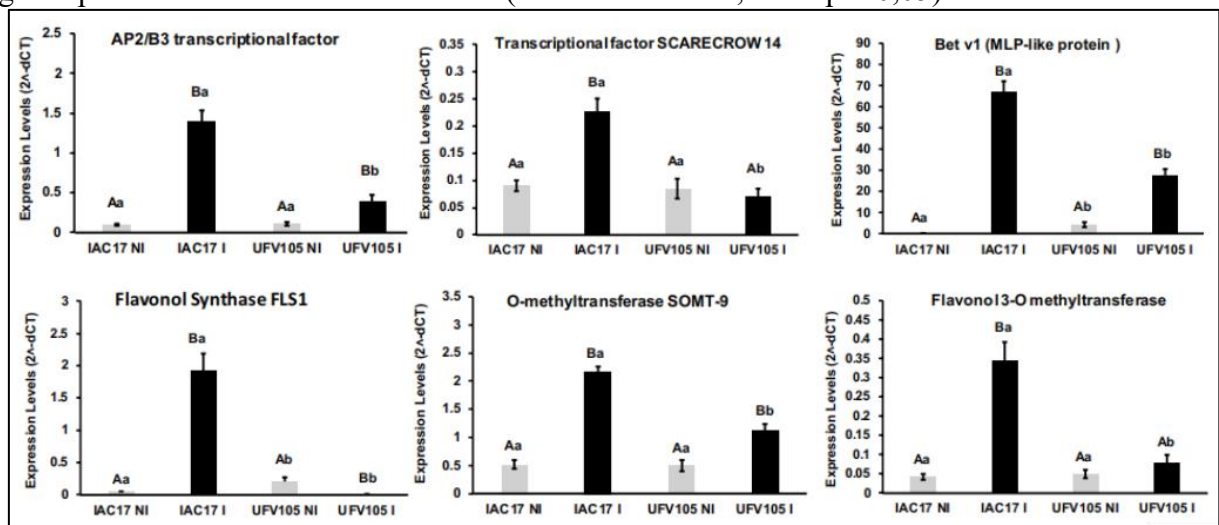
Figura 12 - Perfil de proteínas das folhas de soja responsivas no genótipo resistente IAC 17



Legenda: Em (A) a comparação com o genótipo suscetível UFV105 e em (B) as proteínas reguladas em resposta a infestação com as lagartas. Os valores de mudança de fold change foram calculados a partir das medições de % de volume de cada ponto de proteína identificado pela relação entre os tratamentos infestados em relação aos não infectados. Quando os spots de proteína estavam presentes apenas nos tratamentos infestados (I), os valores de mudança de dobragem eram mostrados como “10,00”, e aqueles presentes apenas nos tratamentos não infectados (NI) eram mostrados como “-10,00”, indicando regulação positiva e negativa, respectivamente.

A expressão de alguns genes envolvidos na defesa de plantas foi analisada por qRT-PCR. As cascatas que controlam a expressão de genes envolvidos nas respostas das plantas ao ataque de insetos, como os genes IP, são desencadeados por vias fitohormonais e fatores de transcrição (TFs), justificando nossa avaliação da expressão dos genes dos TFs AP2/B3 e SCARECROW-like 14. Ambos os TFs foram induzidos em resposta ao ataque de insetos, mas induções mais altas foram observadas para o TF AP2/B3 (Fig. 13). Curiosamente, as proteínas codificadas por esses genes foram reguladas positivamente apenas para o genótipo resistente IAC 17, indicando possível controle pós-transcricional. Assim como a proteína, o gene que codifica o Bet v1 foi induzido em IAC 17 após o ataque da lagarta. Proteínas homólogas a PR10/Bet v 1 participam da biossíntese de compostos fenólicos, incluindo flavonoides (MORRIS *et al.*, 2020). Portanto, a expressão de três genes envolvidos na biossíntese de flavonóis também foi avaliada, incluindo o gene FLS. A flavonol sintase (FLS) é a enzima chave responsável pela biossíntese de flavonóis, catalisando a conversão de diidroflavonóis em flavonóis, como os derivados de caempferol e quercetina. A expressão do gene FLS (Glyma.13G082300) aumentou no genótipo IAC 17 e diminuiu no UFV105 suscetível (Fig. 13).

Figura 13 - Análise da expressão gênica dos genes AP2/B3 (fator de transcrição), SCARECROW-like 14 (fator de transcrição), Bet v1 (PR-10 like), FLS 1 (sintase de flavonol) e O-metiltransferase e SOM-9 (metiltransferase) por qRT-PCR a partir de folhas de soja dos genótipos IAC 17 e UFV105 infestadas (I) e não infestadas (NI) por *A. gemmatilis*. Os níveis de expressão foram calculados como o valor  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para comparar a expressão relativa entre os genótipos e tratamentos. Barras (média  $\pm$  erro padrão; n = 4) com as mesmas letras maiúsculas indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos controle e infestados, e aquelas seguidas pelas mesmas letras minúsculas indicam que não há diferença significativa entre os genótipos dentro do mesmo tratamento (teste t de Student, valor  $p < 0,05$ ).



Os genes que codificam a O-metiltransferase SOM-9 (Glyma.17G171100.1) e a Flavonol-3-O metiltransferase (Glyma.06G137300.1) foram altamente induzidos no genótipo resistente IAC 17, justificando os níveis relativamente altos de derivados metilados de quercetina detectados nas folhas das plantas IAC 17.

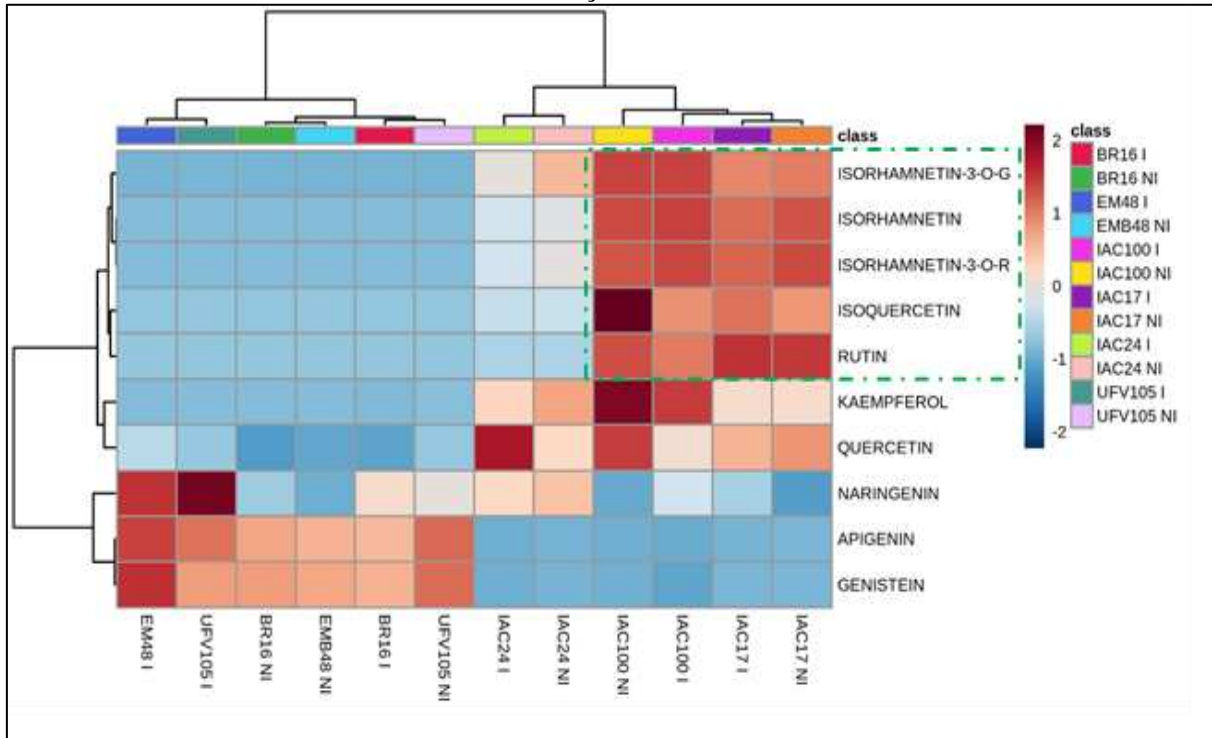
#### **4.3 Via de biossíntese de flavonóis em genótipos de soja resistente ao ataque de insetos pragas**

A ativação constitutiva da via dos flavonóis foi avaliada em outros genótipos de soja caracterizados como resistentes ao ataque de insetos pragas IAC 17, IAC 24, IAC 100 (resistentes) e suscetíveis UFV 105, Embrapa 48 e BR 16.

Metabólitos alvos da via dos flavonoides foram monitorados por LC/MS e suas abundancias foram obtidas pelo software *Skyline*. Após normalização pela mediana, os dados de abundâncias dos metabólitos foram analisados teste da ANOVA *one-way* ( $p\text{-value} < 0,05$ ) utilizando a plataforma Metaboanalyst e foi construído um mapa de calor representando as intensidades dos metabólitos secundários presentes nas folhas infestadas (I) e não infestadas (NI) (Figura 14).

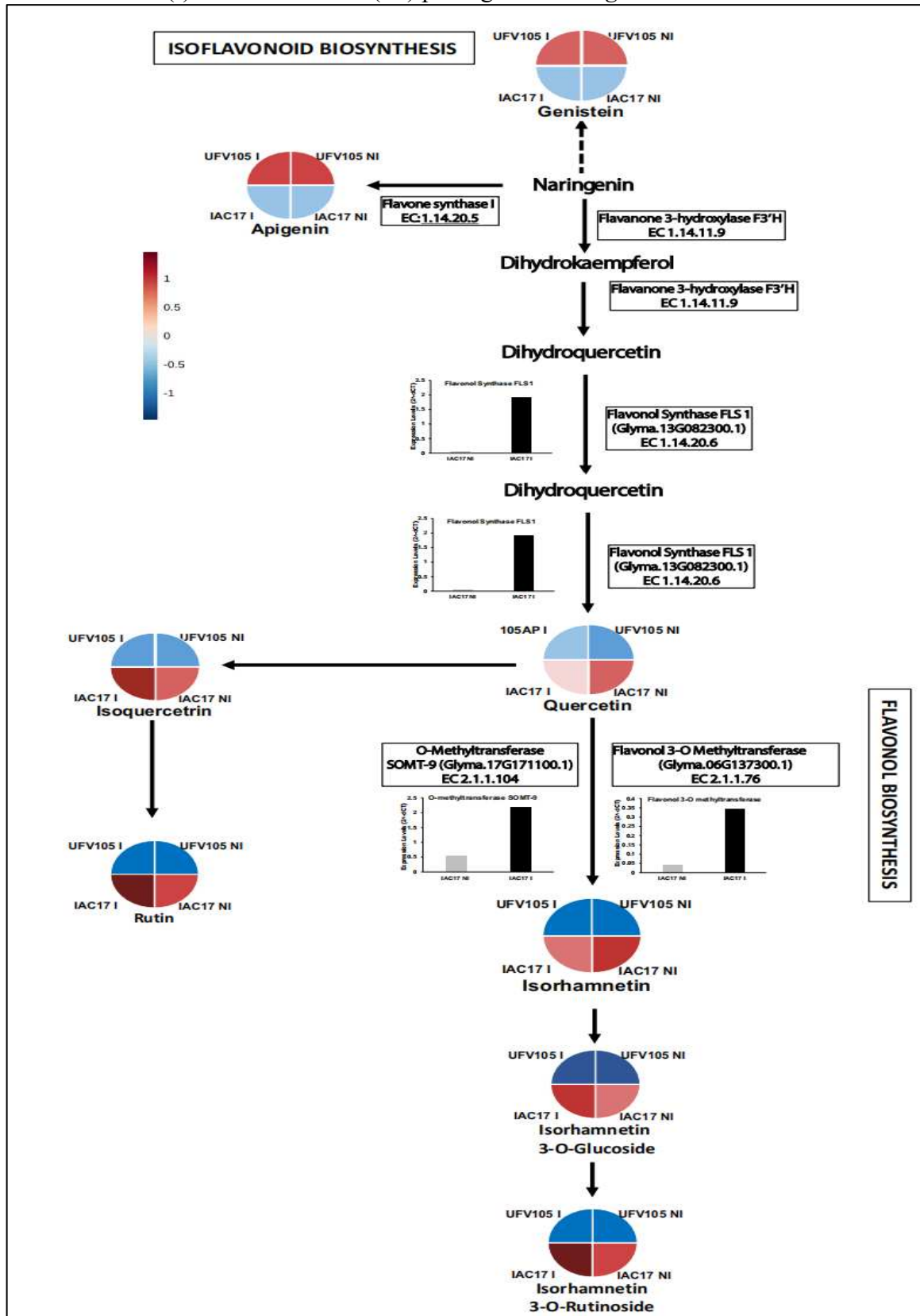
O mapa de calor indicou um agrupamento dos genótipos resistentes e, dentre eles, há ainda agrupamento das amostras controle (NI) e infestadas (I), sendo que os resistentes IAC 17 e IAC 100 apresentaram altas quantidades dos derivados de quercetina no controle e tratamento (Figura 14). Destaca-se ainda que não houve alteração nas intensidades de quercetina em IAC 17 I e NI, como já visto no experimento anterior (Figura 5). Por outro lado, o genótipo IAC 24 apresentou um perfil um pouco diferente dos outros resistentes, com presença de naringenina. Os genótipos suscetíveis apresentaram perfil metabólico com tendência à formação de isoflavonas (genisteína e apigenina).

Figura 14 - Análise de agrupamento pelo método de mapa de calor dos flavonoides caracterizados por LC/MS em folhas de soja dos genótipos IAC 100, IAC 17, IAC 24 resistentes a insetos e dos genótipos UFV105, BR16, Embrapa 48 suscetíveis a insetos, infestados (I) ou não infestados (NI) por lagartas de *A. gematallis*. Diferenças nas abundâncias de flavonoides são mostradas com cores diferentes para cada tratamento. O azul representa uma diminuição e o vermelho indica um aumento nas concentrações de metabólitos.



Destaca-se que a biossíntese de flavonóis aumentou significativamente no outro genótipo resistente IAC 100, mas foi pouco ativada em IAC 24, que também é um genótipo resistente. O mapa de calor na Figura 15 indica um agrupamento distinto dos genótipos resistentes IAC 100, IAC 17 e IAC 24 separados dos genótipos suscetíveis UFV105, BR16 e Embrapa 48. Os genótipos suscetíveis UFV105, BR16 e Embrapa 48 apresentaram abundâncias relativas mais baixas de glicoconjugados flavanois de quercetina e isorhamnetina, indicando que a via de flavonol não foi ativada. No entanto, os níveis de genisteína e apigenina foram mais altos nesses genótipos suscetíveis a insetos. Assim, o metabolismo dos flavonoides parecia estar direcionado para a via de isoflavonas (Figuras 14 e 15). Esse comportamento correlaciona-se com os níveis de expressão verificados para o gene FLS no genótipo resistente IAC 17 (Figura 13).

Figura 15 - Visão esquemática da via de biossíntese de flavonóis reconstruída usando os compostos caracterizados das folhas de soja. Cada quadrante colorido indica os níveis de abundância dos metabólitos. Os níveis de expressão por qRT-PCR são indicados para o genótipo IAC 17 infestado (I) ou não infestado (NI) por lagartas de *A. gematallis*.



#### **4.4 Perfis de flavonóis em raízes, folhas, flores e vagens de genótipos contrastantes para resistência à *A. gemmatilis*: IAC 17, IAC 24, IAC 100 (resistentes), UFV 105, Embrapa 48 e BR 16 (suscetíveis).**

A via de biossíntese de flavonóis foi avaliada em diferentes tecidos e órgãos de genótipos contrastantes para resistência à *A. gemmatilis*: IAC 17, IAC 24, IAC 100 (resistentes), UFV 105, Embrapa 48 e BR 16 (suscetíveis) para verificar diferenças de regulação em plantas de soja.

Como observado anteriormente, o genótipo de soja resistente IAC 24 continua apresentando perfil diferente dos outros dois genótipos resistentes IAC17 e IAC100, indicando um desvio para vias de flavonoides e isoflavonas. É possível observar novamente o agrupamento de genótipos IAC 100 e IAC 17, com presença dos flavonoides derivados da quercetina: Rutina, Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo e Isoquercetrina, com maior quantidade em IAC 17. Nos perfis de flavonoides em raízes do genótipo IAC 24 observamos a ativação da via biossintética de isoflavonoide (genisteína) a partir do precursor naringenina.

Ao contrário do observado nas folhas, nas raízes das plantas de soja alguns flavonóis derivados da quercetina foram mais abundantes nos genótipos suscetíveis ao ataque de insetos pragas (Figura 16.B). Destaca-se que a biossíntese de flavonóis derivados da quercetina não foi induzida nas raízes dos genótipos resistentes IAC17 e IAC100, indicando um mecanismo de regulação nas raízes distinto daquele observado nas folhas.

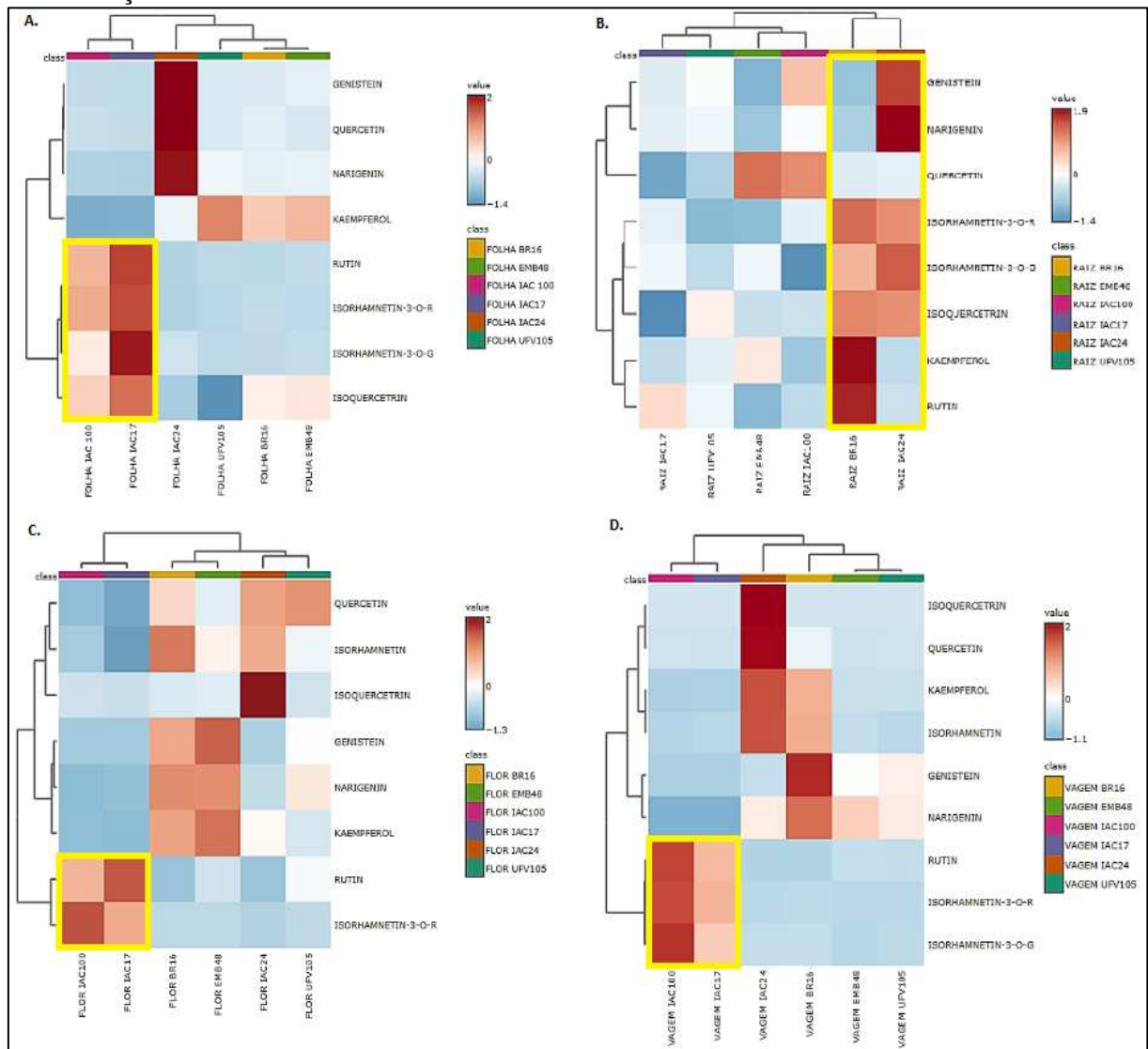
Os perfis de flavonoides monitorados e encontrados em flores (plantas no estágio reprodutivo 1, com início do florescimento) apresentam algumas semelhanças com aqueles encontrados nas folhas, porém com algumas diferenças significativas. Isorhamnetina rutinosídeo continua sendo sintetizada em IAC 17 e apresentou ainda maior quantidade em IAC 100, sendo os dois genótipos mais uma vez agrupados como semelhantes pelo software (Figura 16.C). A rutina também esteve presente nestes dois genótipos, porém, diferente do que foi constatado nas raízes e folhas em estágio vegetativo (V4), IAC 24 apresentou alta concentração de rutina.

A análises de flavonóis por LC/MS em flores de soja também indicou uma ativação constitutiva desta via nos genótipos resistentes ao ataque de insetos pragas IAC17 e IAC24 (Figura 16.C). Podemos observar também uma predominância da Rutina e da Isorhamnetin-3-O-rutinosídeo, indicando um desvio para esses produtos em comparação com os perfis foliares. Nos genótipos suscetíveis UFV105, BR16 e Embrapa48, naringenina foi desviada para biossíntese de isoflavonóides, como indicado na figura 15.

Por fim, os últimos tecidos analisados foram as vagens verdes (R4: formação completa do legume; R5: iniciando a formação do grão). Os flavonóis presentes nos três genótipos resistentes são precursores e derivados da quercetina. O IAC 24 apresentou tanto a quercetina metilada quanto o precursor da rutina (Isoquercetrin), tendo este em maior quantidade. Já o IAC 100 teve altas quantidades da rutina e de quercetina-rutinosídeo e quercetina glicosilada, assim como o IAC 17, este com menores intensidades. As vagens dos genótipos suscetíveis não tiveram quantidades significativas dos flavonóis monitorados, mas o resultado indicou que não há direcionamento para síntese de flavonóis, enquanto há pequeno favorecimento da formação da isoflavona genisteína (Figura 16D).

Esses resultados são interessantes, pois indicaram um mecanismo regulatório nas flores e vagens similar aos observadas nas folhas e, portanto, poderão ser úteis na identificação dos fatores genéticos envolvidos na biossíntese constitutiva de flavonóis em genótipos de soja tolerantes ao ataque de insetos pragas.

Figura 16 - Análise de agrupamento pelo método de mapa de calor dos flavonoides caracterizados por LC/MS em vargens nos diferentes tecidos dos genótipos IAC 100, IAC 17, IAC 24 resistentes a insetos e dos genótipos UFV105, BR16, Embrapa 48 suscetíveis a insetos, infestados (I) ou não infestados (NI) por lagartas de *A. gemmatilis*. Em (A) folhas do estágio V4, em (B) raízes do estágio V4, em (C) flores do estágio R1 e em (D) vagens do estágio R4/R5. Diferenças nas abundâncias de flavonoides são mostradas com cores diferentes para cada tratamento. O azul representa uma diminuição e o vermelho indica um aumento nas concentrações de metabólitos



#### 4.5 Perfil de compostos fenólicos em raízes, folhas, flores e vagens de genótipos contrastantes para resistência à *A. gemmatilis*: IAC 17, IAC 24, IAC 100 (resistentes), UFV 105, Embrapa 48 e BR 16 (suscetíveis)

Como a via dos flavonóis pertence a via dos fenilpropanoides, a abundância de alguns compostos fenólicos foi também avaliada por LC/MS. Alguns desses compostos apresentaram

altas abundancias relativas principalmente em raízes de genótipos suscetíveis, tais como BR 16 e Embrapa 48: caffeic acid, benzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, coniferyl alcohol, vanilin, ferulic acid, p-coumaric acid (Figura 17). Estes compostos são precursores da biossíntese de ligninas (Figura 11) Destaca-se ainda no genótipo suscetível BR 16, uma maior quantidade de 4-hydroxybenzoic acid, que é um isômero do ácido salicílico.

O agrupamento pelo mapa de calor indicou que não há um padrão de síntese de compostos fenólicos nos genótipos resistentes, exceto por daidzeína e genisteína que estão presentes nos genótipos IAC 100 em alta quantidade e em IAC 17 em menor quantidade, sendo um resultado inesperado pois, pelas análises de folhas (Figura 18), a via das isoflavonas foi identificada somente nos genótipos suscetíveis. Além disso, daidzeína é precursor do coumestrol, um dos últimos derivados da via de biossíntese de isoflavonas, mas este composto não foi identificado em nenhum dos tecidos das plantas analisadas.

De forma geral, a análise de compostos fenólicos nas flores não apresentou destaque que diferencie os genótipos suscetíveis dos resistentes, nem apresentou quantidades significativas de compostos em relação aos outros (Figura 19). Estão presentes em todos os genótipos fenilpropanóides que são direcionados para síntese de ligninas, estilpironas e isoflavonas (Figura 11). Do mesmo modo, os compostos fenólicos nas vagens também não determinaram padrão para os genótipos resistentes e teve bastante semelhança com os outros tecidos, destacando que nos genótipos suscetíveis há novamente o favorecimento da biossíntese de isoflavonas (Figura 20).

Figura 17 - Análise de agrupamento pelo método de mapa de calor de compostos fenólicos caracterizados por LC/MS em raízes de soja dos genótipos IAC 100, IAC 17, IAC 24 resistentes a insetos e dos genótipos UFV105, BR16, Embrapa 48 suscetíveis a insetos, infestados (I) ou não infestados (NI) por lagartas de *A. gematallis*.

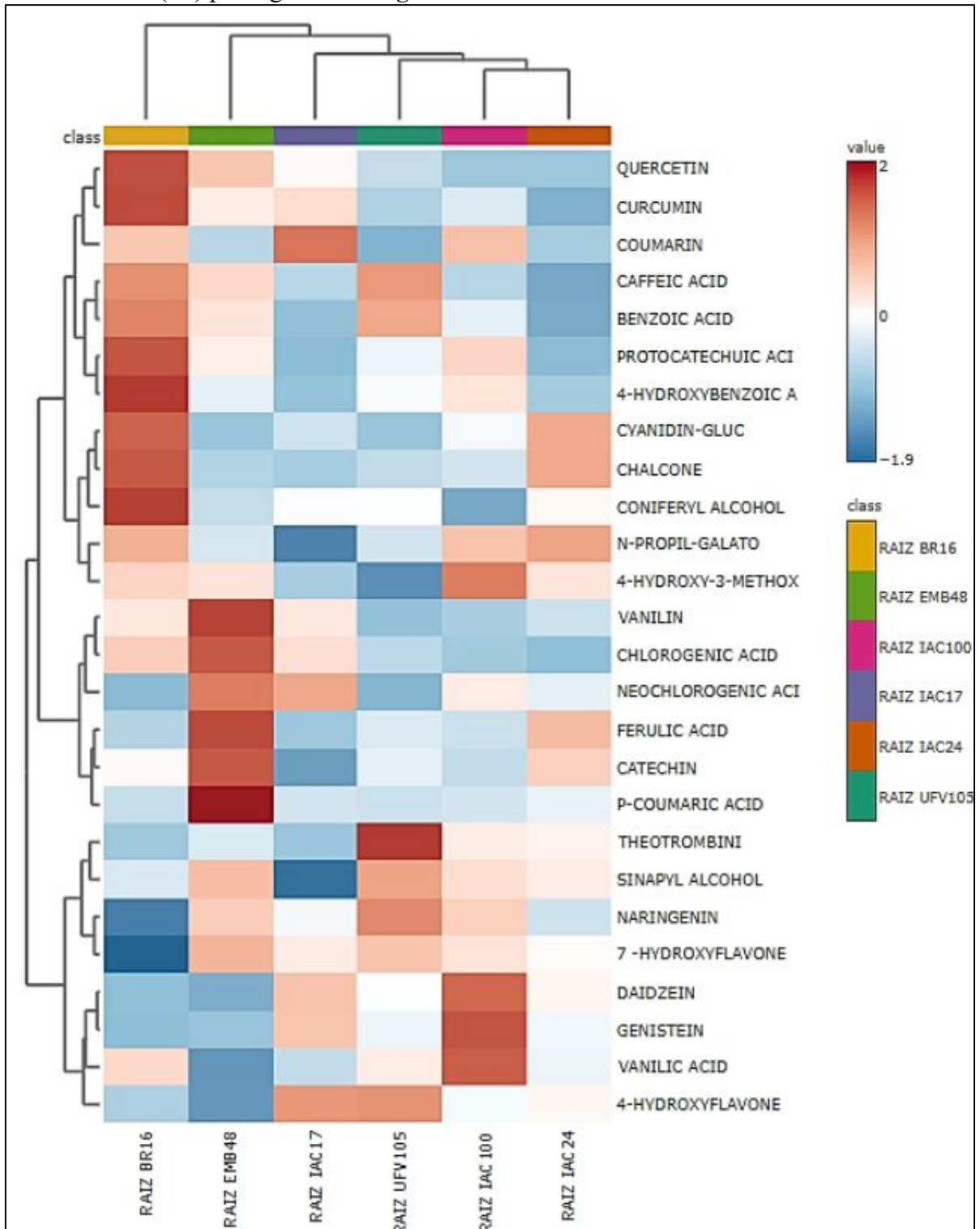


Figura 18 - Análise de agrupamento pelo método de mapa de calor de compostos fenólicos caracterizados por LC/MS em folhas de soja dos genótipos IAC 100, IAC 17, IAC 24 resistentes a insetos e dos genótipos UFV105, BR16, Embrapa 48 suscetíveis a insetos, infestados (I) ou não infestados (NI) por lagartas de *A. gematallis*.

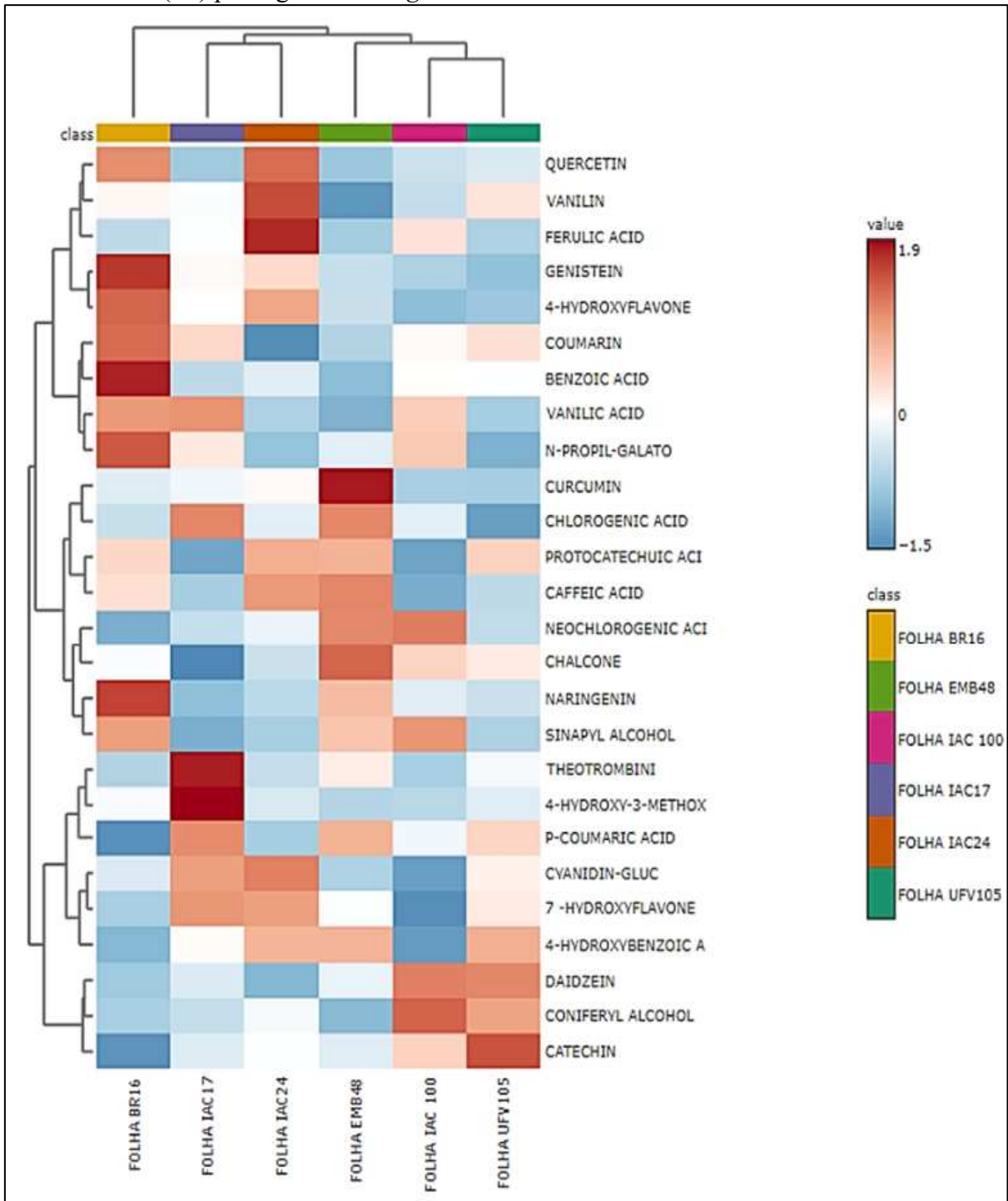


Figura 19 - Análise de agrupamento pelo método de mapa de calor de compostos fenólicos caracterizados por LC/MS em flores de soja dos genótipos IAC 100, IAC 17, IAC 24 resistentes a insetos e dos genótipos UFV105, BR16, Embrapa 48 suscetíveis a insetos, nfestados (I) ou não infestados (NI) por lagartas de *A. gematallis*.

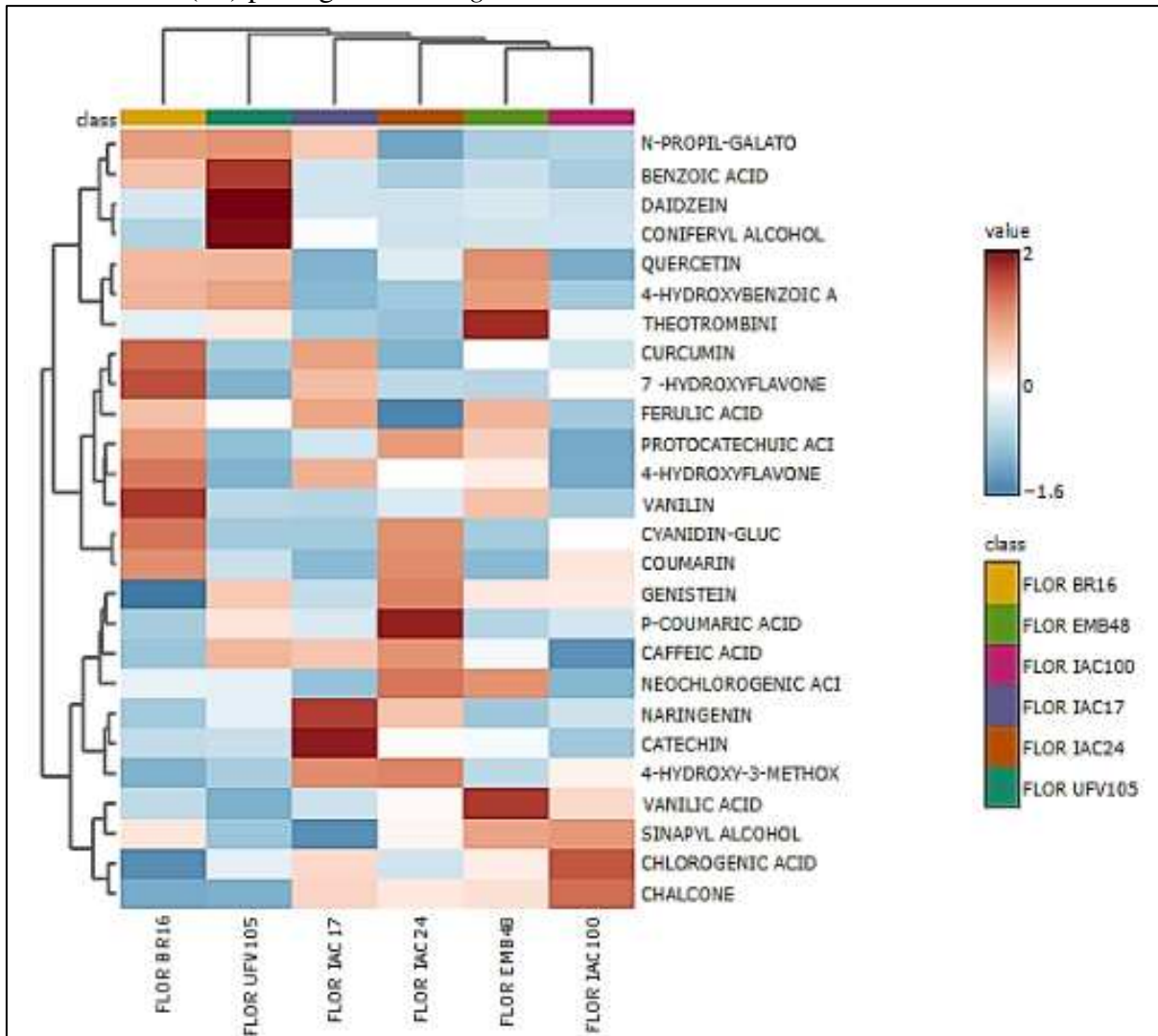
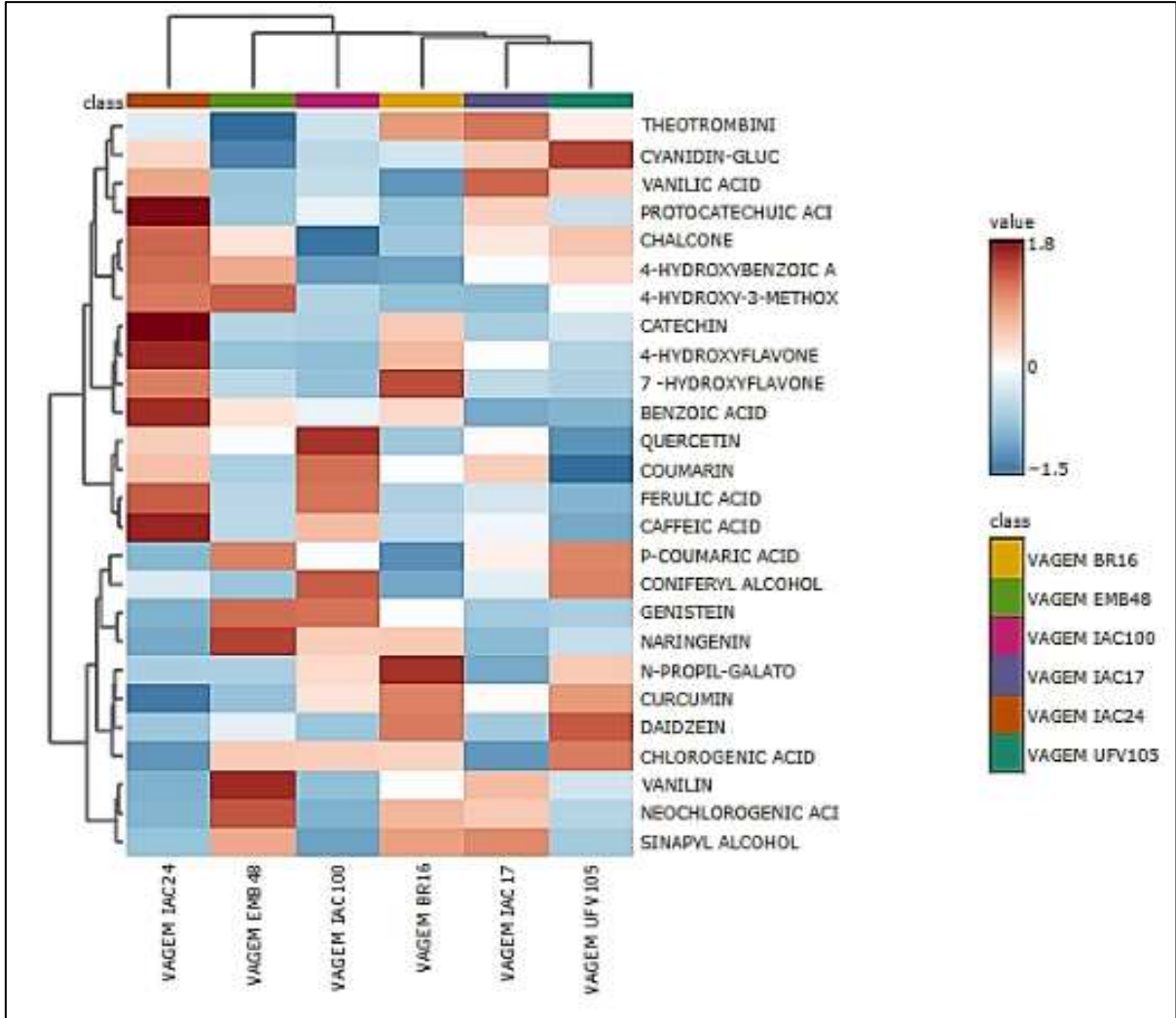


Figura 20. Análise de agrupamento pelo método de mapa de calor de compostos fenólicos caracterizados por LC/MS em vagens de soja dos genótipos IAC 100, IAC 17, IAC 24 resistentes a insetos e dos genótipos UFV105, BR16, Embrapa 48 suscetíveis a insetos, infestados (I) ou não infestados (NI) por lagartas de *A. gematallis*.

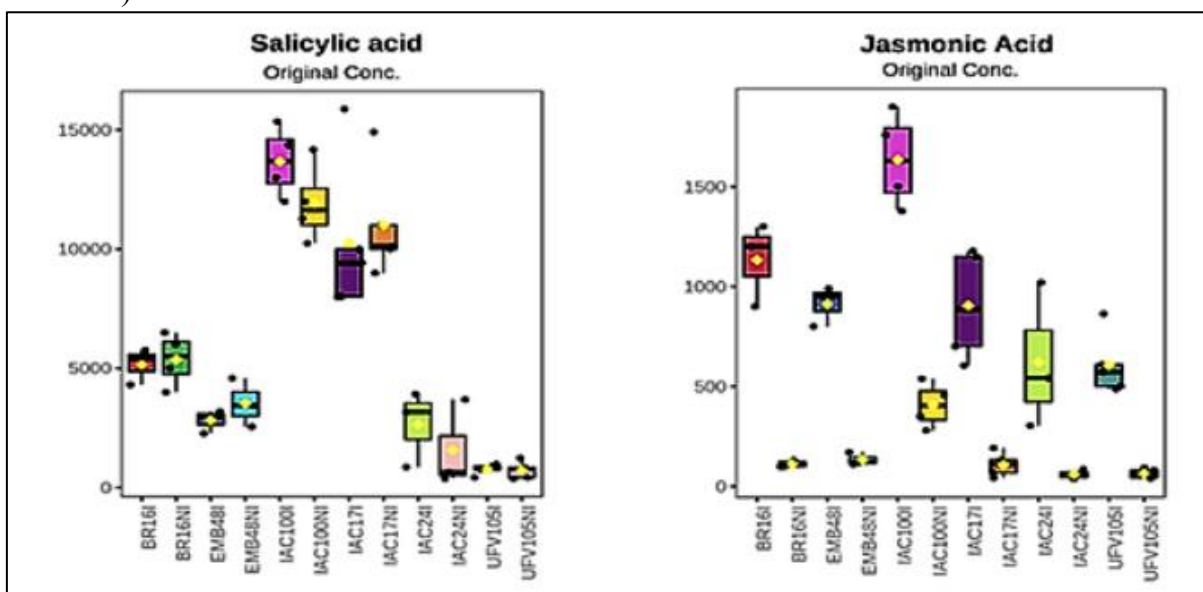


#### 4.6 Análises de fito-hormônios em genótipos de soja

Alterações nos perfis fitohormonais têm sido caracterizadas como determinantes das cascatas de resposta das plantas ao ataque de insetos pragas. Portanto, os perfis fitohormônios foram comparados entre genótipos resistente e suscetíveis.

Como esperado, os níveis de ácido jasmônico (JA) aumentou em todos os genótipos avaliados em resposta a infestação pelas lagartas (Figura 21). Entretanto, as concentrações de JA foram significativamente mais elevadas durante a infestação nos genótipos resistentes IAC 17 e principalmente IAC 100. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos para os não-infestados. Os níveis de abundância de ácido salicílico (SA) foram evidenciados para os genótipos resistentes IAC100 e IAC 17, tanto infestados quanto não infestados pela lagarta, mostrando que a síntese deste hormônio pode estar presente de forma constitutiva nesses genótipos. Portanto, o SA pode ser importante para a defesa da soja contra insetos-praga nestes genótipos. O ácido salicílico é uma importante molécula sinalizadora endógena na imunidade vegetal (AN e MOU, 2011; SHIGENAGA e ARGUESO, 2016). É fundamental na mediação da resistência por meio de genes da família PR e das respostas imunes basais (PTI e ETI) (ALAZEM e LIN, 2015). Portanto, os genótipos IAC 100 e IAC 17 apresentaram altos níveis de SA, tanto no tratamento infestado quanto não infestado, sugerindo que SA pode ser um importante fito-hormônio de defesa da soja.

Figura 21 - Gráficos da identificação de fitohormônios (AJ, AS) mostrando a relação entre a área e tratamentos infestados e não infestados em genótipos resistentes, IAC100, IAC17, IAC24 e em genótipos suscetíveis UFV 105, BR 16 e Embrapa 48. Tratamentos: I (infestado) IN (não infestado).



## 5 DISCUSSÃO

Dentre os estresses bióticos de soja destaca-se a *Anticarsia gemmatalis*, inseto-praga que possui fase larval do tipo desfolhadora e pode destruir até 100% da área foliar da planta (Da Silva *et al.* 2012). O método mais eficaz e comum de controle de pragas ainda é o uso de inseticidas e, por isso, há grande interesse científico no desenvolvimento de genótipos de soja resistentes a pragas no Brasil, como realizado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) a seleção de genótipos com melhores características de produtividade e resistência para retrocruzamentos originando alguns genótipos resistentes, como IAC 17, IAC 24 e IAC 100 (Lourenção *et al.* 1989; Bacalhau *et al.* 2014). Os mecanismos moleculares de resistência no genótipo IAC 17 de resistência à *A. gemmatalis* têm sido avaliados comparando os perfis metabólicos, bem como alterações nos níveis de fitohormônios e inibidores de protease (Da Silva *et al.* 2007; Gómez *et al.* 2018; Gómez *et al.* 2020).

A análise da abundância diferencial de proteínas dos genótipos IAC 17 (resistente) e UFV 105 (suscetível) sob ataque da lagarta de *A. gemmatalis* indicou que alguns processos moleculares e fisiológicos são comuns em ambos, porém outros foram específicos para IAC 17 (Gómez *et al.* 2018; Gómez *et al.* 2020). Chang e Hartman (2017) identificaram marcadores polimórficos de nucleotídeo simples (SNP) importantes para tolerância de soja a insetos-praga, incluindo *A. gemmatalis* e mostraram que o mecanismo de tolerância pode envolver genes específicos, além de poder apresentar mecanismos distintos. Entretanto, a resposta de soja pode ser específica para diferentes insetos e lagartas. Este estudo identificou proteínas cujos genes contêm repetições ricas em leucina, que foram relacionados com a resposta de transdução de sinal (Tang *et al.* 2017). Curiosamente, a abundância de uma proteína RLK 3, quinase transmembrana rica em cisteína e, que também codifica a proteína quinase semelhante ao receptor, foi encontrada no genótipo resistente IAC 17 com infestação da lagarta. Assim, alterações nas cascatas de reconhecimento do elicitor e transdução de sinal poderiam ser os determinantes genéticos mais importantes para a resistência a insetos-praga. RLKs são moléculas de sinalização conservadas a montante que regulam uma série de processos biológicos, incluindo o desenvolvimento das plantas e a adaptação ao estresse (Osakabe *et al.* 2013; Quezada *et al.* 2019).

A proteína SCARECROW-like 14, membro da família de genes GRAS (Cenci; Rouard, 2017), também foi aumentada em IAC 17 (I) e pode atuar como fator de transcrição. Os genes GRAS também participam de vias de sinalização de fitohormônios, como ácido giberelina (GA), ácido jasmônico (JA) e brassinosteróide (BR). AtRGL3 (RGA-like 3) regula a

sinalização do ácido jasmônico (JA) (Cenci; Rouard, 2017), portanto, SCARECROW- LIKE 3 também pode ser importante para o equilíbrio fitohormonal no resistente IAC 17. Outro fator transcricional (TF) AP2 / B3 aumentou em IAC 17 após infestação por lagarta. De acordo com abundância proteica, estes genes foram regulados positivamente apenas para o genótipo IAC 17, mas, a nível de expressão gênica, houve aumento de ambos fatores de transcrição em ambos genótipos, o que se justifica pela presença de isômeros que não foram identificados na análise das proteínas. Apesar disso, níveis mais altos de expressão gênica foram observados significativamente diferente no resistente em relação ao suscetível, indicando assim que estes TFs também podem ser regulados a nível translacional.

Da mesma forma, algumas isoformas das proteínas MPL foram diferentemente abundantes sob infestação da lagarta. As proteínas MLP pertencem à família Bet v 1 e também estão envolvidas nas cascatas fitohormonais, funcionando como ligantes de ligação, como citocininas, brassinolídeos e metabólitos secundários, e, desencadeiam a transdução de sinal a jusante (Wang *et al.* 2016). Análises fisiológicas e bioquímicas realizadas por Wang *et al.* 2016 indicaram que MLP - 43 está envolvida nas respostas ao estresse por ácido abscísico, e, à seca em *Arabidopsis thaliana*, pela modulação do perfil metabólico primário e da expressão gênica. Experimentos com a indução de MLP em *A. thaliana* ainda mostraram que o conteúdo total de flavonóis nas plantas foi maior em comparação ao controle, sugerindo que a super expressão de MLP está envolvida na mudança nas concentrações de flavonóis nas plantas (Chen; Dai, 2010). Recentemente, foi sugerido que a abundância de proteínas semelhante a MLP pode aumentar o acúmulo de isoflavonas coumestrol (CMS) em resposta a condições de estresse (HA *et al.* 2019). Níveis de flavonóis e isoflavonas específicos foram detectados em maior concentração nos genótipos resistentes IAC 17 e IAC 100, dentre eles, daidzeína, isoflanonol precursor do coumestrol foi identificado em altas quantidades nas raízes e em IAC 100 nas folhas, sendo que em ambos os tecidos a biossíntese foi constitutiva, sem exposição à lagarta. Portanto, a proteína MPL poderia estar envolvida na regulação da produção de metabólitos secundários contra a infestação de lagartas.

A regulação metabólica em resposta ao ataque de pragas herbívoras foi proposta como responsável por induzir a síntese de metabólitos secundários, como fitohormônios, compostos fenólicos e ROS (espécies reativas de oxigênio). A herbivoria por insetos impacta processos relacionados a fotossíntese, tanto por mecanismos fisiológicos quanto por mudanças no perfil transcricional de genes associados às reações fotossintéticas (Kerchev *et al.* 2011). Porém, na maioria dos casos, essas respostas de defesa estão associadas a uma redução na fotossíntese, afetando assim o metabolismo do cloroplasto. No presente estudo, foi observado que a

abundância de algumas proteínas de ligação ao RNA (RBPs) no genótipo resistente IAC 17 foi aumentada, enquanto uma proteína isômera foi diminuída no suscetível UFV 105 sob infestação de *A. gemmatalis* e pode ser importante para a regulação pós-transcricional dos genes do cloroplasto (Lee; Kang 2016).

Devido à importância já conhecida das lipoxigenases na defesa contra pragas, já que são enzimas regulatórias na via de síntese do ácido jasmônico (JA) (Vick; Zimmerman 1987), esperava-se observar uma grande expressão gênica nos tratamentos. De fato, os resultados mostraram o aumento de lipoxigenases ao nível de transcrição por qRT-PCR após a infestação em genótipos resistentes e suscetíveis, mas, esse aumento foi mais pronunciado no genótipo suscetível UFV 105. Apesar disso, a atividade da LOX 1 foi ligeiramente maior no IAC 17 (Fig.S2). Por outro lado, os níveis de ácido jasmônico avaliados por LC/MS aumentaram sob infestação, de forma semelhante para ambos os genótipos (GÓMEZ *et al.* 2020). Assim, o mecanismo de resistência a insetos relacionados a biossíntese constitutiva de flavonóis nos genótipos IAC 17 e IAC 100 são independente de JA.

Como resposta de defesa ao dano físico causado no momento do ataque e à medida que é elicitada pela herbivoria, a planta produz moléculas e toxinas que afetam diretamente os insetos, causando prejuízos ao seu desenvolvimento com a resposta denominada antibiose (Maffei *et al.* 2007). Algumas dessas moléculas mais relevantes são os inibidores de protease da família Kunitz (SKTI) e o inibidor de serina protease Bowman-Birk (BBI), que são inibidores de tripsina que impedem a absorção de proteínas no intestino da praga. Ao nível transcricional, os dois inibidores tiveram aumento observado em ambos os genótipos sob infestação, com níveis de mRNA mais elevados em IAC 17, enquanto a quantificação da atividade inibitória não foi significativamente diferente entre os genótipos (Fig.S3). Esta regulação pós-transcricional pode ser justificada pela expressão ou presença nas folhas de demais isoformas de inibidores de protease. Estes resultados são consistentes com o estudo de ensaios de sobrevivência e atividades proteolíticas intestinais realizado por Gómez *et al.* (2019), que mostrou que lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com extratos de folhas de IAC 17 eliciados tiveram maiores reduções da capacidade proteolítica do sistema intestinal. Assim, os inibidores de protease poderiam estar contribuindo para a resistência no genótipo IAC 17.

Proteínas da classe “dirigentes” também foram aumentadas no genótipo IAC 17. A regulação positiva de genes do tipo dirigente em resposta a ataques de fungos (Zhu *et al.* 2007; Reboledo *et al.* 2015) e insetos (Ralph *et al.* 2007) foi descrita com papéis predominantes da família de genes dirigentes relacionados às respostas de defesa, biossíntese de fibras (Davin; Lewis, 2003; Ralph *et al.* 2006; Berim *et al.* 2008) e metabolismo secundário, que contribuem

para a formação de lignana e lignina. Essa participação é muito importante para a defesa das plantas, uma vez que as lignanas podem ter funções defensivas contra insetos ou patógenos (Ralph *et al.* 2007).

A participação dos flavonóis nas respostas de defesa de soja pode ser importante para os genótipos IAC 17 e IAC 100. O agrupamento íons dos metabólitos totais mostrou-se diferencial para ao genótipos mesmo nas amostras controle, isto é, sem infestação. Há evidências de que flavonóis incluídos na dieta de lagartas pode causar prejuízo ao inseto por antixenose e/ou antibiose (Macedo *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2014; Thanigaivel *et al.*, 2017). Tanninas e compostos fenólicos como os flavonóis são compostos com fatores anti nutricionais para lagartas (Freitas *et al.*, 2014). Gomez *et. al.* 2018 mostrou que as concentrações de flavonóis como kaempferol, rutina, naringenina, luteolina, genisteina, apigenina e flavonóis glicoconjugados são específicas nas folhas desses dois genótipos. Até então os flavonóis isorhamnetina-3-O-glicosídeo e isorhamnetina-3-O-rutinosídeo não tinham sido descritos em folhas de soja, sendo identificado pela primeira vez nas folhas do genótipo resistente IAC 17. Metilquercetina, isorhamnetina, isorhamnetina-3-O-glicosídeo, isorhamnetina-3-O-rutinosídeo e rutina são os principais derivados da quercetina e foram identificados presentes constitutivamente em IAC 17, mesmo na ausência da herbivoria.

Plantas do genótipo IAC 17 também apresentaram maiores induções de genes envolvidos na biossíntese de flavonol glucoconjugado, como as enzimas Flavonol Sintase (GmFLS1) e metiltransferases (SOMT-9 e Flavonol 3-O-metiltransferase). Analogicamente, análises metabólicas de folhas de *Nicotiana glauca*, superexpressando NtFLS2, mostraram a indução de grandes aumentos nos níveis de rutina, como também detectado para plantas IAC 17 e IAC 100 tanto no controle quanto sob infestação por *A. gemmatilis*, indicando que a atividade de FLS pode regular intensamente a fluxo metabólico em direção a flavonóis ou biossíntese de antocianinas (LIU *et al.* 2019; SHI *et al.* 2017). Altos níveis de rutina podem ser justificados pela maior indução do gene GmFLS1, enquanto os níveis mais altos de isorhamnetina rutinosídeo (metilquercetina 3-rutinosídeo) também detectados para IAC 17 e IAC 100 também podem ser justificados pelas atividades de metiltransferases nestes genótipos resistentes ao ataque de insetos.

Os perfis de proteínas 2DE-MS revelaram que isoformas para UDP-pirofosforilase foram responsivas à infestação por lagartas no genótipo resistente IAC 17. Portanto, a ativação dessas enzimas pode agir fornecendo UDP-açúcares, mantendo os altos níveis de biossíntese de glicoconjugados de flavonol observados em IAC 17. Em conformidade, Zhang *et al.*, 2022 observaram que a UDP-glicosiltransferase (UGT) era um determinante de resistência contra

insetos mastigadores na soja, alterando o conteúdo de flavonoides e os padrões de expressão de genes relacionados à biossíntese de flavonoides. De acordo com os padrões de expressão gênica, foram observadas maiores induções de genes envolvidos na biossíntese de glicoconjugados de flavonol, como Sintase de Flavonol (GmFLS1) e Metiltransferase (SOMT-9 e Flavonol 3-O-metiltransferase), para o genótipo IAC 17. A análise metabólica de folhas de tabaco superexpressando NtFLS2 indicou aumentos significativos nos níveis de quercetina-3-O-rutinosídeo e rutina (LIU *et al.* 2019; SHI *et al.* 2017), indicando que a atividade de FLS pode regular intensamente o fluxo metabólico em direção à biossíntese de flavonol no genótipo IAC 17. Assim, grandes quantidades de flavonóis nas folhas dos genótipos resistentes a insetos podem ser devidas a uma maior indução do gene GmFLS1, culminando em quantidades mais elevadas de derivados de quercetina glicoconjugados.

A síntese constitutiva de flavonol pode ser devida ao aumento das atividades de FLS e flavonol metiltransferase nas plantas IAC 17 e IAC 100. Em contraste, o mecanismo de resistência do genótipo IAC 24 parece não estar relacionado aos níveis de rutina ou isoharmnetina-rutinosídeo. De acordo, os genótipos IAC 100, IAC 17 e IAC 24 apresentaram diferentes níveis de resistência em termos de antixenose, antibiose e insetos pragas. Assim, essa característica genética pode ser um determinante crítico da resistência ao ataque de insetos na soja. A sintase de flavonol (FLS) é uma enzima essencial no metabolismo de flavonóis. FLS regula a síntese bioquímica de quercetina, miricetina e quempferol catalisando reações metabólicas relacionadas. A quercetina produzida por FLS pode ser glicosilada por enzimas UDP-glicose flavonoide 3-O glicosiltransferase e raminosiltransferase, como indicado na Figura 11. Como observado por HOU *et al.* (2020), altos níveis de expressão de FLS aumentam o conteúdo de rutina, aumentando a tolerância ao estresse da planta.

Os perfis metabólicos de diferentes tecidos de soja foram analisados sem infestação de *A. gemmatilis* visando avaliar os mecanismos de regulação constitutivas ou induzidas de defesa em diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos da planta. De forma geral, os metabólitos secundários identificados corroboram as afirmações anteriores de que nos genótipos suscetíveis a via das isoflavonas é favorecida em contraste com as dos flavonóis nos genótipos resistentes. Os principais flavonoides encontrados em raízes de soja são a daidzeína e genisteína que, entre outras funções, modulam o transporte de auxina, um importante hormônio vegetal que regula o desenvolvimento de raízes e dos nódulos, estimulando a divisão celular (Mathesius, 2018). Em plantas cultivadas em campo, a expressão de UGT4, uma 7-O-glicosiltransferase específica de isoflavonas, e de ICHG (conjugados de isoflavonas que hidrolisam beta-glicosidase), diminuíram durante os estágios reprodutivos, sugerindo que a secreção de isoflavonas na

rizosfera é maior durante os estágios vegetativos do que durante os estágios reprodutivos em cultivos em campo (Sugiyama, 2017).

## 6 CONCLUSÕES

A biossíntese de flavonol é uma característica genética constitutiva nas folhas dos genótipos brasileiros de soja IAC 17 e IAC 100. No entanto, essa característica explica apenas parcialmente a resistência aos insetos, pois o genótipo IAC 24, também resistente, não produz grandes quantidades de glicoconjugados de flavonol. Além disso, as atividades biológicas dos derivados metilados do flavonol quercetina (glicoconjugados de isoramnetina) precisam ser verificadas para obter novos genótipos com resistência a insetos aprimorada. A expressão gênica e os perfis de metabólitos indicaram que alguns dos genes estudados podem ser candidatos para caracterização genética dessa biossíntese constitutiva de flavonol, incluindo receptores de quinase e fatores de transcrição. Curiosamente, as características de resistência a insetos dos genótipos IAC 17, IAC 24 e IAC 100 podem ter sido herdadas do genótipo de soja PI229358 (Tabela Suplementar 1). No entanto, apenas os genótipos IAC 17 e IAC10 apresentaram grandes quantidades de glicoconjugados de flavonol, indicando que esses genótipos são fontes genéticas apropriadas para estudar a biossíntese de flavonol e sua relação com a resistência a insetos. Além disso, genes envolvidos diretamente na biossíntese de flavonol glicoconjugado, como FLS e O-metiltransferase, e aqueles que atuam indiretamente como promotores de catalisadores enzimáticos, como proteínas PR10/Bet v1-like, também poderiam ser alvos para caracterização genética.

## REFERÊNCIAS

- AGEITEC. Agência Embrapa de informação tecnológica, 2020. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/>
- 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.**, v. 148, p. 504-518, 2008.
- ALAZEM, M.; LIN, N.S. Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. **Mol Plant Pathol.**, v. 5, p. 529-540, 2015. doi: 10.1111/mpp.12204.
- AN, C.; MOU, Z. Salicylic acid and its function in plant immunity. **J. Integr. Plant Biol.**, v. 53, p. 412-428, 2011. doi: 10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x.
- AUCLAIR, J. L. Host plant resistance. *In*: MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. (Eds). **Aphids-their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 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.**, v. 50, p. 911-923, 2009.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.; LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. *In*: JM Lowenstein (Ed.). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1981.
- AZZOUZ, H.; CHERQUI, A.; CAMPAN, E.D.M.; RAHBÉ, Y.; DUPORT, G.; JOUANIN, L.; KAISER, L.; GIORDANENGO, P. Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman Birk inhibitor on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). **J. Insect. Physiol.**, v. 51, n. 15686649, p. 75-86, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.11.010>
- BACALHAU, F.B.; DOURADO, P.M.; HORIKOSHI, R.J.; CARVALHO, R.A.; SEMEÃO, A.; MARTINELLI, S.; BERGER, G.U.; HEAD, G.P.; SALVADORI, J.R.; BERNARDI, O. **Performance of genetically modified soybean expressing the Cry1A.105, Cry2Ab2, and Cry1Ac proteins against key Lepidopteran pests in Brazil**. *Journal of Economic Entomology*. 2020. 113: 2883–2889. <http://doi.org/10.1093/jee/toaa236>
- BARAH, P.; BONES, A.M. Multidimensional approaches for studying plant defence against insects: from ecology to omics and synthetic biology. **J. Exp. Bot.**, v. 66, p. 479-93, 2015. doi: 10.1093/jxb/eru489.
- BERIM, A.; EBEL, R.; SCHNEIDER, B.; PETERSEN, M. UDP-glucose: (6-methoxy) podophyllotoxin 7-O-glucosyltransferase from suspension cultures of *Linum nodiflorum*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 374-381, 2008. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.07.030.
- BODE, W.; HUBER R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, p. 433-451, 1992.

BOIÇA JÚNIOR, A.L. *et al.* A defesa das plantas ao ataque dos insetos. *In: BUSOLI, A.C. et al.* (Eds.). **Tópicos em entomologia agrícola** - VIII. Jaboticabal: Multipress. 2015. (1,15: 207-224).

BORÉM, A. **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2005. p. 969.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BURAK, M.; IMEN, Y. Flavonoids and their antioxidant properties. **Turkiye Klin Tip Bil Derg.**, v. 19, p. 296-304, 1999.

CANASSA, V.F.; BALDIN, E.L.L.; BENTIVENHA, J.P.F.; PANNUTI, L.E.R.; LOURENÇÃO, A.L. **Characterization of antixenosis to *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) in soybean genotypes**. *International Journal of Pest Management*. 2017. 63:112-118. <http://doi.org/10.1080/09670874.2016.1227884>

CARTER, T.E.; NELSON, R.L.; SNELLER, C.H.; CUI, Z. Genetic Diversity In Soybean. *In: BOERMA, H.R. e SPECHT, J.E. Soybeans: Improvement, production, and uses*. Agron. Monogr. 16. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. 2004. p. 303–416. doi:10.2134/agronmonogr16.3ed.c8.

CENCI, A.; ROUARD, M. Evolutionary Analyses of GRAS Transcription Factors in Angiosperms. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-15, 2017. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.00273>

CERA, J. C.; STRECK, N. A.; ZANON, A. J.; ROCHA, T. S. M.; CARDOSO, A. P.; RIBEIRO, B. S. M. R.; FENSTERSEIFER, C. A. J.; BECKER, C. C. Dano por Granizo na Cultura da Soja em Condições de Lavoura: Um Estudo de Caso. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 31, n. 2, 211-217, 2016.

CHANG, H.X.; HARTMAN, G.L. Characterization of Insect Resistance Loci in the USDA Soybean Germplasm Collection Using Genome-Wide Association Studies. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-12, 2017. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.00670>

CHEN, J.Y.; DAI, X.F. Cloning and characterization of the *Gossypium hirsutum* major latex protein gene and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 23, p. 861-873, 2010. <http://doi.org/10.1007/s00425-009-1092-2>

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Soja MT**. 19 jan. 2023. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analise-regional-do-mercado-agropecuario/analise-regional-mt-soja/item/22645-soja-analise-dezembro-2023>.

COSTA, J.A. **Cultura da Soja**. Porto Alegre: Evangraf, 1996. p. 233.

COUTINHO, F.S.; SANTOS, D.S.; LIMA, L.L.; VITAL, C.E.; SANTOS, L.A.; PIMENTA M.R.; SILVA, J.C.; RAMOS, J.R.L.S.; METHA, A.; FONTES, E.P.B.; RAMOS, H.J.O.

Mechanism of the drought tolerance of a transgenic soybean overexpressing the molecular chaperone BiP. **Physiol. Mol. Biol. Plants.**, v. 1, p. 1-16, 2019.

<https://doi.org/10.1007/s12298-019-00643-x>

DAKORA, F. D.; PHILLIPS, D. A. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. **Physiol. Mol. Plant. Path.**, v. 49, p. 1-20, 1996.

DA SILVA, F.F.; DE ALMEIDA, O.M.G.; BRUMANO, M.H.N. *et al.* Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Journal of Pest Science*, v. 80, p. 241-247, 2007.

<http://doi.org/10.1007/s10340-007-0179-4>

DECKER, D.; KLECZKOWSKI, L.A. UDP-Sugar Producing Pyrophosphorylases: Distinct and Essential Enzymes With Overlapping Substrate Specificities, Providing *de novo* Precursors for Glycosylation Reactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1822, 2019.

<http://doi.org/10.3389/fpls.2018.01822>

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. **Nat Prot.**, v. 2, p. 778-791, 2007.

DILLON, M.; TEJEDOR, M.; ILINA, N.; CHLUDIL, H.D.; MITHÖFER, A.; PAGANO, E.A.; ZAVALA, J.A. Solar UV-B radiation and ethylene play a key role in modulating effective defenses against *Anticarsia gemmatalis* larvae in field-grown soybean. **Plant, cell & environment.**, v. 41, n. 2, p. 383-394, 2018. <https://doi.org/10.1111/pce.13104>

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

EISENTHAL, R.; DANSON, M.J. (Eds), **Enzyme Assays: A Practical Approach**. Oxford University Press, 2002. ISBN 0-19-963820-9.

EMATER. **Informativo Conjuntural**. Porto Alegre, n. 1813, p. 6, 2024.

EMBRAPA. **Soja em números**. 2020. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/en/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>

EMBRAPA SOJA. **Soja em números**. 2023. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>

ESPINDOLA, F. S. *et al.* Recursos de Bioinformática Aplicados às Ciências Ômicas como Genômica, Transcriptômica, Proteômica, Interatômica e Metabolômica. **Uberlândia**, v. 26, n. 3, p. 463-477, 2010.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology. 1977. p.11. (Special Report, 80).

FERREIRA JÚNIOR, J. A.; UNÊDA-TREVISOLI, S.H.; ESPÍNDOLA, S.M.C.G.; VIANNA, V.F.; DI MAURO, A.O. Diversidade genética em linhagens avançadas de soja

oriundas de cruzamentos biparentais, quádruplos e ócuplos. **Revista CiênciaAgrônômica**, v. 46, n. 2, p. 339-351, 2015.

FIEHN, O. Metabolomics the link between genotypes and phenotypes. *Plant. Mol. Biol.*, v. 8, p. 155-71, 2002.

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.**, v. 43, p. 446-52, 2014. doi: 10.1007/s13744-014-0225-x.

FUGI, C.G.Q.; LOURENÇÃO, A.L.; PARRA, J.R.P. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with diferent degrees of resistance to insects. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 31-35, 2005. [https://doi.org/10.](https://doi.org/10.1007/s13744-014-0225-x)

GAO Y-L.; PAN Z-Y.; MENG X.; YUAN Y-F.; LI H-Y.; CHEN M. The Effect of Quercetin on the Growth, Development, Nutrition Utilization, and Detoxification Enzymes in *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). **Forests**, v. 13, n. 11, p. 1945, 2022. <https://doi.org/10.3390/f13111945>

GAZZONI, D. L.; PEDROSO JUNIOR, M.; GARAGORRY, F.; MOSCARDI, F. Mathematical simulation model of the velvetbean caterpillar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 385-396, 1998.

GILL, R.S., GUPTA, K., TAGGAR, G.K., TAGGAR, M.S. Role of oxidative enzymes in plant defenses against herbivory. **Acta Phytopathol. Entomol. Hung.**, v. 45, p. 277-290, 2010. <http://dx.doi.org/10.1556/APhyt.45.2010.2.4.1590/S0103-90162005000100006>

GOMEZ, J.D.; VITAL, C.E.; OLIVEIRA, M.G.A.; RAMOS, H.J.O. Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLOS ONE**, v. 13, p. 1-24, 2018. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0205010>.

GÓMEZ, J.D.; PINHEIRO, V.J.M.; SILVA, J.C.; ROMERO, J.V.; MERIÑO-CABRERA, Y.; COUTINHO, F.S.; LOURENÇÃO, A.L.; SERRÃO, J.E.; VITAL, C.E.; FONTES, E.P.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; RAMOS, H.J.O. Leaf metabolic profiles of two soybean genotypes differentially affect the survival and the digestibility of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 155, p. 196-212, 2020. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.010>

GOŁAWSKA, S.; ŁUKASIK, I. & CHOJNACKI, A. A. Luteolin and quercetin affect aphid feeding behavior. **The European Zoological Journal**, v. 91, n. 1, p. 318-331, 2024. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2325544>

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri Press, 1986. p.433.

HA, J.; KANG, Y.G.; LEE, T.; KIM, M.; YOON, M.Y.; LEE, E.; YANG, X.; KIM, D.; KIM, Y.J.; LEE, T.R.; KIM, M.Y.; LEE, S.H. Comprehensive RNA sequencing and co-expression

network analysis to complete the biosynthetic pathway of coumestrol, a phytoestrogen. *Scientific Reports*, v. 9, p. 1-11, 2019. [http://doi: 10.1038/s41598-018-38219-6](http://doi.org/10.1038/s41598-018-38219-6)

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.

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. *Food Security*, v. 3, p. 5-17, 2011.

HAVSTEEN, B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, v. 96, p. 67-202, 2002.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 225.

HOFFMANN-CAMPO, C.B. *et al.* Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 41, n. 10, p. 1453-1459, 2006.

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. 70. (Circular Técnica, 30).

HOMRICH, M.S.; WIEBKE-STROHM, B.; WEBER, R.L.M.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Soybean genetic transformation: A valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants. *Genetics and Molecular Biology*, v. 35, n. 4, p. 998-1010, 2012.

HOU, M.; ZHANG, Y.; MU, G. *et al.* Molecular cloning and expression characterization of flavonol synthase genes in peanut Gene expression, proteomic, and metabolic profiles of Brazilian soybean genotypes reveal...(*Arachis hypogaea*). *Sci Rep.*, v.10. p.17717, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74763-w>

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

JORGE, T.F.; RODRIGUES, J.A.; CALDANA, C.; SCHMIDT, R.; VAN DONGEN, J.T.; THOMAS-OATES, J.; ANTÓNIO, C. Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Mass. Spectrom*, 2015. doi: 10.1002/mas.21449.

KERCHEV, P.L.; FENTON, B.; FOYER, C.H.; HANCOCK, R.D. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant, Cell & Environment*, V.35. p.441–453, 2011. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02399.x>

KIM, B.G.; LEE, H.J.; PARK, Y.; LIM, Y.; AHN, J.H. Characterization of an Omethyltransferase from soybean. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 44, p. 236-241, 2006.

KUWAR, S.S.; PAUCHET, Y.; VOGEL, H.; & HECKEL, D. G. Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 59, p. 18-29, 2015. doi:10.1016/j.ibmb.2015.01.016.

LEE, K.; KANG, H. **Emerging Roles of RNA-Binding Proteins in Plant Growth, Development, and Stress Responses**. **Molecules and Cells**, v.39, p. 79-185, 2016. <http://doi.org/10.14348/molcells.2016.2359>

LIMA, L.L.; MESQUITA, R.; BALBI, B.P.; COUTINHO, F.S.; SILVA, C.; CARMO, F.M.S.; VITAL, C.E.; MEHTA, A.; LOUREIRO, M.E.; FONTES, E.P.B.; BARROS, E.G.; RAMOS, H.J.O. Proteomic and Metabolomic Analysis of a Drought Tolerant Soybean Cultivar from Brazilian Savanna. **Crop Breeding, Genetics and Genomics**. 2019. <http://doi.org/10.20900/cbgg20190022>.

LIU, X.; LAM, E. Two binding sites for the plant transcription factor ASF-1 can respond to auxin treatments in transgenic tobacco. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 668-675, 1994.

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 gemmatilis*, and Its Enzymatic Activity. **J. Insect Sci.**, v. 14, p. 27, 2014. <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**, v. 68, p. 2946-59, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.016>

MATHESIUS U. Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. **Plants (Basel)**. 2018. doi: 10.3390/plants7020030. PMID: 29614017; PMCID: PMC6027123.

MATOS, N.F.C.; ZANUNCIO, J.C.; CRUZ, I.; TORRES, J.B. Nymphal development of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera, Pentatomidae) preying on larvae of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Noctuidae) fed with resistant and susceptible soybeans. **Rev Bras. entomol.**, v. 46, p. 237-241, 2002.

MELO, B.P.; FRAGA, O.T.; SILVA, J.C.F.; FERREIRA, D.O.; BRUSTOLINI, O.J.B.; CARPINETTI, P.A.; MACHADO, J.P.B.; REIS, P.A.B.; FONTES, E.P.B. Revisiting the Soybean GmNAC Superfamily. **Front Plant Sci.**, v. 9, p. 1864, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01864>

MENDONÇA, E. G.; ALMEIDA BARROS, R.; CORDEIRO, G.; SILVA, C. R.; CAMPOS, W. G.; OLIVEIRA, J. A.; & ALMEIDA OLIVEIRA, M. G. Larval development and proteolytic activity of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to different soybean protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, 2019.

- 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**, v. 62, p. 19-27, 2003a.
- 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**, v. 62, p. 29-37, 2003b.
- MORAES, M.C.B.; LAUMANN, R.; SUJII, E.R.; PIRES, C.; BORGES, M. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. **Ent. Exp. Ap.**, v. 115, p. 227-237, 2005.
- MOROZOVA, O.; HIRST, M. & MARRA, M. Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 10, p. 135- 51, 2009. [10.1146/annurev-genom-082908-145957](https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-145957).
- MORRIS, J.S.; CALDO, K.M.; LIANG, S.; FACCHINI, P. PR10/Bet v 1-like proteins as novel contributors to plant biochemical diversity. **ChemBioChem**. 2020. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000354>.
- 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. <https://doi.org/10.1017/S0007485311000642>.
- NAKABAYASHI, R., SAITO, K. Metabolomics for unknown plant metabolites. **Anal Bioanal Chem.** p. 1-7, 2013.
- 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 CO<sub>2</sub> and herbivory on flavonoids of soybean (*Glycine max* Linnaeus). **J. Chem. Ecol.**, v. 36, p. 35-45, 2010. doi: 10.1007/s10886-009-9727-0.
- ONGARATTO, S.; SILVEIRA, C.M.; SANTOS, J.E.R.; GORRI, M.M.P.; SARTORI, THOMAS E HUNT; LOURENÇÃO, A.L.; BALDIN, E.L.L. Resistance of soybean genotypes to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae): antixenosis and antibiosis characterization. **Journal of Economic Entomology**, v. 114, p. 2571-2580, 2021. <https://doi.org/10.1093/jee/toab197>.
- OSAKABE, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN, L.S. Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*. 2013. v. 64, p. 445-458, 2013. <http://doi.org/10.1093/jxb/ers354>.
- PAINTER, R.H. **Insect Resistance in Crop Plants**. New York: Macmillan, 1951. <http://dx.doi.org/10.1097/00010694-195112000-00015>

PANCHE, A.N., DIWAN, A.D., CHANDRA, S.R. Flavonoids: An overview. **J. Nutr. Sci.**, v. 5, p. e47, 2016. doi: 10.1017/jns.2016.41.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico: terminologia**. Em: PARRA, J.R.P; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole. 2002. p. 1-16.

PINHEIRO, V.J.M.; GÓMEZ, J.D.; GOUVEIA, A.S.; *et al.* Gene expression, proteomic, and metabolic profiles of Brazilian soybean genotypes reveal a possible mechanism of resistance to the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 18, p. 15-32, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11829-023-10030-9>

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.**, v. 31, p. 1509-25, 2005.

PRATISSOLI, D. 2002. Disponível em:  
[http://200.252.165.4/agrofit/Probl\\_Fitossanitarios/PragaseDoencas/Index.htm](http://200.252.165.4/agrofit/Probl_Fitossanitarios/PragaseDoencas/Index.htm).

QUEZADA, E.H.; GARCÍA, G.X.; ARTHIKALA, M.K.; MELAPPA, G.; LARA, M.; NANJAREDDY, K. Cysteine Rich Receptor-Like Kinase Gene Family Identification in the Phaseolus Genome and Comparative Analysis of Their Expression Profiles Specific to Mycorrhizal and Rhizobial Symbiosis. **Genes**, v. 10, p. 1-21, 2019.  
<http://doi.org/10.3390/genes10010059>

RALPH, S. G.; JANCSIK, S.; & BOHLMANN, J. Dirigent proteins in conifer defense II: Extended gene discovery, phylogeny, and constitutive and stress-induced gene expression in spruce (*Picea* spp.). **Phytochemistry**, 2007. doi:10.1016/j.phytochem.2007.04.042.

RALPH, S.; PARK, J.Y.; BOHLMANN, J.; MANSFIELD, S.D. Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny, and differential wound-and insect-induced expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (*Picea* spp). **Plant Mol. Biol.**, v. 60, p. 21-40, 2006.. doi: 10.1007/s11103-005-2226-y

REBOLEDO, G.; DEL CAMPO, R.; ALVAREZ, A.; MONTESANO, M.; MARA, H.; PONCE DE LEÓN, I. *Physcomitrella patens* activates defense responses against the pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Int. J. Mol. Sci.**, 2015. 16:22280–22298.  
doi:10.3390/ijms160922280.

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. **Food Res. Int.**, v. 42, p. 401-410, 2009.

ROJO, E.; SOLANO, R.; SANCHEZ-SERRANO, J. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. **J Plant Growth Regul.**, v. 22, n. 1, p. 82-98, 2003.

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

SCHERLING, C.; ROSCHER, C.; GIAVALISCO, P. Metabolomics unravel contrasting effects of biodiversity on the performance of individual plant species. **PLoS ONE**, v. 5, p. e12569, 2010.

SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R.; BORGES, M.; CARVALHO, R. **Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2001. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

SEDIYAMA, T. (Org.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. 1. ed. Londrina, PR: Mecenas, 2009. 1. p. 314.

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

SHI, J.; LI, W.; GAO, Y.; WANG, B.; LI, Y.; SONG, Z. Enhanced rutin accumulation in tobacco leaves by overexpressing the NtFLS2 gene. *Biosci Biotechnol Biochem.*, v. 811, p. 721-1725, 2017. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1353401>

SHIGENAGA, A.; ARGUESO, C. **No Hormone to Rule Them All: Interactions of Plant Hormones During the Responses of Plants to Pathogens**. *Seminars in cell & developmental biology*. 2016. 56. 10.1016/j.semcdb.2016.06.005.

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.**, v. 36, p. 179-91, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-010-9752-z>

SILVA, F. B.; OLIVEIRA, M. G. de A.; BATISTA, R. B.; PIRES, C. V.; XAVIER, L. P.; PIOVESAN, N. D.; OLIVEIRA, J. A. de; JOSÉ, I. C.; MOREIRA, A. **Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* HÜBNER)**. Arquivo do Instituto Biológico. 2002. São Paulo, v. 69, n. 1, p. 67- 74.

SIMMONDS, M.S.J. Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. **Phytochemistry**. 2003. 64:21-30. PMID:12946403. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00293-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00293-0)

SINCLAIR, J.B., KOGAN, M., MCGLAMERY, M.D. **Guidelines for the Integrated Management of Soybean Pests**. National Soybean Research Laboratory Publication N. 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**. 1. ed. 2010. CAB International. ISBN 978-1- 84593-644-0.

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

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

SOUZA, E. S.; SILVA, J. P. G. F.; BALDIN, E. L. L.; PIEROZZI, C. G.; CUNHA, L. S.; CANASSA, V. F.; LOURENÇÃO, A. L. Response of Soybean Genotypes Challenged by a Stink Bug Complex (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 2, p. 898-906, 2015. doi:10.1093/jee/tov341.59.

STEPHENSON, F. H. **Calculations for Molecular Biology and Biotechnology**. Elsevier. 2016. Cap 9.

SUGIYAMA, A.; YAMAZAKI, Y.; HAMAMOTO, S.; TAKASE, H.; YAZAKI, K. Synthesis and Secretion of Isoflavones by Field-Grown Soybean. **Plant Cell Physiol.**, 2017. doi:10.1093/pcp/pcx084. PMID: 28637253.

TANG, R.; SEGUIN, P.; MORRISON, M.; SMEDBOL, E. Impact of climatic factors at specific growth stages on soybean soyasaponin I concentration. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 101, n. 1, p. 124-128, 2021. <https://doi.org/10.1139/cjps-2020-0066>

TANG, D.; WNAG, G.; ZHOU, J.M. Receptor kinases in plant-pathogen interactions: more than pattern recognition. **Plant Cell Adv.**, v. 29. p. 618-637, 2017. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00891>

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.*, v. 94, 2017. doi:10.1002/arch.21384.

TON, J.; D'ALESSANDRO, M.; JOURDIE, V.; JAKAB, G.; KARLEN, D.; HELD, M.; MAUCH-MANI, B.; TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. **Plant. Biol. (Stuttg)**, v. 7, p. 581-91, 2005.

TEJO, D.P.; FERNANDES, C.H.S.; BURATTO, J.S. Soja: Fenologia, morfologia e fatores que interferem na produtividade. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia da FAEF**, v. 35, n. 1, p. 4, 2019.

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

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.**, v. 154, p. 536-40, 2010. <http://dx.doi.org/10.1104/p.110.161570>.

VICK, B.A.; ZIMMERMAN, D.C. Oxidative systems for the modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. *In*: P. K. STUMPF; E. E. CONN (Eds). **The Biochemistry of Plants, Academic Press**. New York. 1987. V.9. p. 53-90.

VIERA, P. C.; FERNANDES, J. B.; ANDREI, C. C. Plantas e inseticidas. *In*: SIMÕES, C. M. *et al.* (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da EFSC, 2003.

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.**, v. 152, p. 2036-2052, 2010.

WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection.** Oxford: Blackwell, 2007. p. 258.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. 2003 Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p.1-14, 2003.

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.**, v. 7, p. 1306-20, 2012. 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.**, v. 30, p. 512-23, 2011a. <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.**, v. 6, p. 1769-77, 2011b. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.6.11.17323>.

WRIGHT, P. C.; NOIREL, J.; OW, S. Y.; FAZELI, A. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. **Theriogenology**, v. 77, n. 4, p. 738- 765, 2012.

ZAVALA, J.; SCOPEL, A.; BALLARÉ, C. Effects of ambient UV-B radiation on soybean crops: Impact on leaf herbivory by *Anticarsia gemmatalis*. **Plant Ecology**, v. 156, p. 121-130, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1012672226811>

ZHU, L.; ZHANG, X.; TU, L.; ZENG, F.; NIE, Y.; GUO, X. Isolation and characterization of two novel dirigent-like genes highly induced in cotton (*Gossypium barbadense* and *G. hirsutum*) after infection by *Verticillium dahliae*. **J. Plant Pathol.**, v. 89, p. 41-45, 2007.

## APÊNDICE A – TABELAS SUPLEMENTARES

**Tabela suplementar 1.** Características e genealogia dos genótipos de soja que mostram resistência ao ataque de insetos.

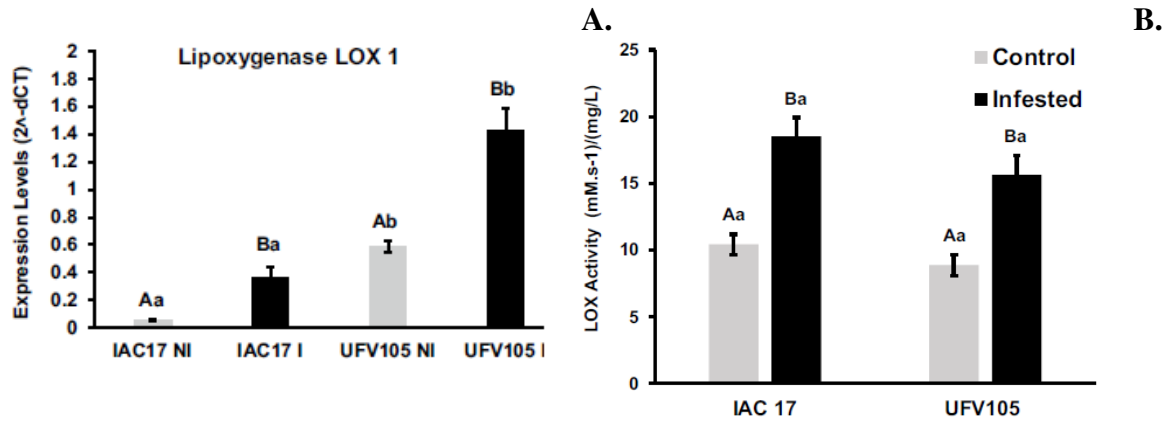
Genotype	Characteristics (genealogy or source)
PI 229358	Japan
D72-9601	D66-8666 x (Bragg x PI 220358)
IAC78-2318	D72-9601 x IAC 73-227
IAC 17	D 72-9601 x IAC 8
IAC 24'	[D72-9601 x F <sub>1</sub> (Davis x PI 227687)] x (D72-9601-1 x IAC 73-515)
IAC 100'	IAC 12' x IAC 78-2318

**Tabela suplementar 2.** Códigos e sequências de primers desenhados para análises de expressão gênica por qRT-PCR.

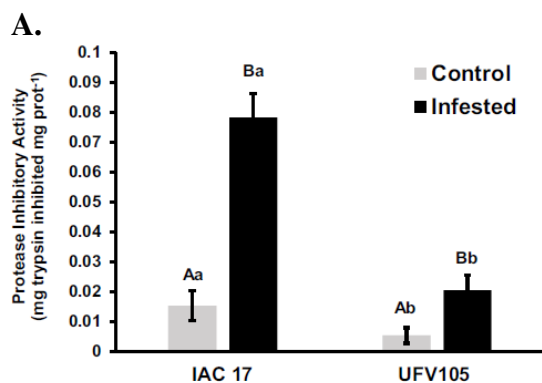
NOME	CÓDIGO GLYMA	FOWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
O-metiltransferase SOMT-9	Glyma.17G171100.1	GAACATCATGGCAACACCAG	ATCTTCCATCAGGGGGAAG
Flavonol sintase FLS1	Glyma.13G082300	GCTTCCAAATCCAAAGATGC	TTCCCTTCATCTGGGTAC
Flavonol 3-O-metiltransferase	Glyma.06G137300.1	TCTAGCTTGGCCACAAAAGG	TTGAAAGCACAGCACAGGAC
AP2/B3-like FATOR DE TRANSCRIÇÃO	Glyma.16G017100.1.p	AGTTGCTCACCACCTCCATC	CATGTTCAACCCAAATAGCC
SCARECROW-like 14 FATOR DE TRANSCRIÇÃO	Glyma.11G138600.1	GGGAGAAGCAACAAGCAGTC	GTCTGCGTGACCAATACACG
(Bet_v_1)(MLP-like protein 423)	Glyma.07G243500.2	CTCCAAATTGGTTGCTGGTC	GGCCTTGAAGAGAGCATCAG
Lipoxigenase LOX 1	Glyma.07G007000.1	ATGGGGGCTTAATCCTGAAC	GGGTCTCAAACCTGGGTGTG
Inibidor Bowman BIRK- BBI	Glyma.18G231700.1	AGAAGGTGGCATTGGTGAAG	TAATTGTTGGGGAGCACCTG
Inibidor Kunitz- SKTI	Glyma.08G341500.1	TCTCGTCCCATATCGAATC	GCAGGTCCTTCTGGTAGATCC



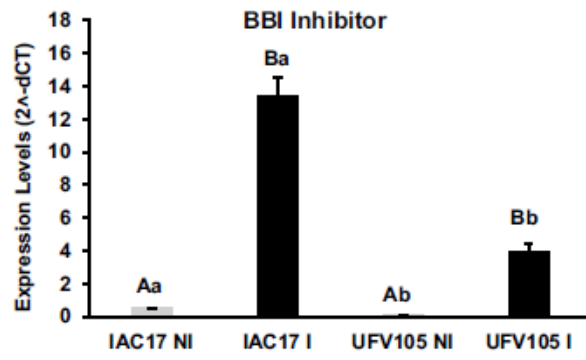
**Figura Suplementar 2.** (A) Análise da atividade de lipoxigenases totais, NI (control) e I (infested) e (B) análise da expressão gênica por qRT-PCR da lipoxigenase LOX 1 em folhas de IAC 17 e UFV 105 AP, NI (controle) e I (infestadas) por *A. gemmatalis*. Os níveis de expressão gênica foram calculados por  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para comparar a expressão relativa entre genótipos e tratamentos. Barras (significância  $\pm$  SE;  $n = 4$ ) com mesmas letras maiúsculas indicam diferenças não significantes entre controle e tratamento e barras com as mesmas letras minúsculas indicam diferenças não significantes entre os genótipos dentro do mesmo tratamento.



**Figura Suplementar 3.** Análise da atividade total de inibição de tripsina (A), NI (control) e I (infested) e análise da expressão gênica do inibidor de proteases (B) BBI (Bowman-Birk inhibitor) e (C) SKTI (Kunitz Trypsin Inhibitor de soja) por qRT-PCR em folhas de IAC 17 e UFV 105 AP, NI (controle) e I (infestadas) por *A. gemmatalis*. Os níveis de expressão gênica foram calculados por  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para comparar a expressão relativa entre genótipos e tratamentos. Barras (significância  $\pm$  SE;  $n = 4$ ) com mesmas letras maiúsculas indicam diferenças não significantes entre controle e tratamento e barras com as mesmas letras minúsculas indicam diferenças não significantes entre os genótipos dentro do mesmo tratamento.



B.



C.

