

VERÔNICA APARECIDA FAUSTINO

**IMPACTO DO ESTRESSE HÍDRICO E BIÓTICO (*Anticarsia gemmatalis*
HÜBNER, 1818) SOBRE O MECANISMO DE DEFESA DA SOJA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

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

T

F268i
2015
Faustino, Verônica Aparecida, 1985-
Impacto do estresse hídrico e biótico (*Anticarsia
gemmatalis* Hbüner, 1818) sobre o mecanismo de defesa da
soja / Verônica Aparecida Faustino. - Viçosa, MG, 2015.
viii, 57f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.42-57.

1. Soja - Doenças e pragas. 2. Lagarta-da-soja.
3. Lipoxigenases. 4. Enzimas proetolíticas - Inibidores.
5. Soja. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 633.343

VERÔNICA APARECIDA FAUSTINO

**IMPACTO DO ESTRESSE HÍDRICO E BIÓTICO (*Anticarsia gemmatalis*
HÜBNER, 1818) SOBRE O MECANISMO DE DEFESA DA SOJA**

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

APROVADA: 26 de novembro de 2015.

Ana Ermelinda Marques
(Coorientadora)

Felipe Lopes da Silva
(Coorientador)

Patrícia Aparecida Fontes Vieira

Gláucia Cordeiro

Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, pelo apoio, amor e compreensão, pois é graça a ela que este sonho se tornou realidade.

Ao meu pai, pelos conselhos, dedicação e amor.

Ao meu irmão pelo carinho e incentivo aos estudos.

Em especial, ao meu filho, Arthur, que veio para acrescentar mais alegria e ternura a minha vida.

É você filho, que renova todos os meus sonhos e expectativas.

“Ouse, arrisque, não desista jamais e saiba valorizar quem te ama, esses sim merecem seu respeito. Quanto ao resto, bom, ninguém nunca precisou de restos para ser feliz.”

(Clarice Lispector)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me abençoar, durante todas as etapas do meu mestrado;

À intercessão de Santa Terezinha e de São João Batista, que a todo o momento cuidou de mim espiritualmente;

À Universidade Federal de Viçosa, à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste curso;

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

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa;

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação do trabalho;

À coorientadora Dr^a Ana Ermelinda Marques pela sua dedicação e prontificação sempre que precisei, pela amizade, carinho, confiança e ensinamentos nos quais levarei pelo o resto da minha vida;

Ao Professor Felipe Lopes da Silva, pela sua ajuda e coorientação ao implementar o experimento, pois sem este apoio seria impossível tê-lo realizado;

Ao Dr. Paulo Luiz da Silva pela disponibilidade em ajudar nas análises de campo e bancada, pelos conselhos e sugestões;

Ao Dr. Gerson Adriano Silva pela ajuda nas análises estatísticas;

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do BIOAGRO por todo companheirismo e ajuda nos momentos de dificuldades;

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada Eduardo Pereira Monteiro e Marco Aurélio Ferreira de Oliveira por agilizarem a parte burocrática;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o sucesso desse trabalho.

Muito obrigada.

BIOGRAFIA

Verônica Aparecida Faustino, filha de José Faustino Filho e Glória Maria Barroso Faustino, nasceu em Viçosa, estado de Minas Gerais, no dia 15 de novembro de 1985. É mãe do Arthur Faustino Maciel, de sete anos, natural de Viçosa-MG. Em maio de 2006, iniciou o curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa – MG), graduando-se em janeiro de 2012. Em Agosto de 2013, ingressou-se no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | viii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. Cultura da Soja | 3 |
| 2.2. Mudanças Climáticas | 4 |
| 2.3. Lagarta-da-Soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner, 1818)..... | 8 |
| 2.4. Lipoxigenases (LOX) | 9 |
| 2.5. Inibidores de Proteases (IPs) | 11 |
| 2.6. Enzimas Proteolíticas do Intestino de Lagartas..... | 14 |
| 3. OBJETIVOS | 15 |
| 3.1. Objetivo Geral | 15 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 15 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 4.1. Material Vegetal e Condução do Estresse Hídrico..... | 16 |
| 4.2. Criação e Preparo da Dieta Artificial da Lagarta-da-Soja..... | 17 |
| 4.2.1. Criação da Lagarta-da-Soja..... | 17 |
| 4.2.2. Preparo da Dieta para a Lagarta-da-Soja | 17 |
| 4.3. Tratamentos com a Lagarta-da-Soja..... | 19 |
| 4.4. Determinação da Atividade de Lipoxigenases (LOX) em Folhas da Cultivar UFV-16..... | 19 |
| 4.4.1 Obtenção do Extrato Foliar | 19 |
| 4.4.2 Análise de Lipoxigenases (LOX)..... | 20 |
| 4.5. Determinação de Inibidores de Proteases em Folhas da Cultivar UFV-16..... | 20 |
| 4.5.1. Obtenção do Extrato Foliar | 20 |
| 4.5.2. Análise de Inibidores de Proteases..... | 21 |
| 4.6. Obtenção do Extrato Enzimático do Intestino da Lagarta-da-Soja | 22 |
| 4.7. Determinação da Atividade de Proteases do Intestino da Lagarta-da-Soja..... | 22 |
| 4.8. Determinação da Atividade Amidásica de Tripsina-like do Intestino da Lagarta-da-Soja..... | 22 |
| 4.9. Determinação da Atividade Esterásica de Tripsina-like do Intestino da Lagarta-da-Soja..... | 23 |
| 4.10. Determinação da Concentração das Proteínas..... | 23 |

| | |
|--|----|
| 4.11. Análise Estatística | 23 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 25 |
| 5.1. Atividade de Lipoxigenases (LOX)..... | 25 |
| 5.1.1. Determinação da Atividade de Lipoxigenases em Folhas da Cultivar UFV-16 Submetidas ou não ao Estresse Hídrico, Injuriadas ou não pela Lagarta <i>A. gemmatalis</i> | 25 |
| 5.1.2 Determinação da Atividade de Lipoxigenases em Folhas da Cultivar UFV-16, Irrigada e Reirrigada, Injuriadas pela lagarta <i>A. gemmatalis</i> | 27 |
| 5.2. Inibidores de Proteases (IPs) | 29 |
| 5.2.1. Determinação de Inibidores de Proteases em Folhas da Cultivar UFV-16 Submetidas ou não ao Estresse Hídrico, Injuriadas ou não pela Lagarta <i>A. gemmatalis</i> | 29 |
| 5.2.2. Determinação de Inibidores de Proteases em Folhas da Cultivar UFV-16 Irrigada e Reirrigada, Injuriadas pela Lagarta <i>A. gemmatalis</i> | 32 |
| 5.3. Atividade de Enzimas e Proteína Total do Intestino de Lagartas <i>A. gemmatalis</i> | 33 |
| 5.3.1. Atividade de Protease Total do Intestino de <i>A. gemmatalis</i> Alimentadas com Plantas da Cultivar UFV-16 Submetidas ou não ao Estresse Hídrico | 33 |
| 5.3.2 Atividade de Tripsina-like do Intestino de <i>A. gemmatalis</i> Alimentadas com Plantas de Soja submetidas ou não ao Estresse Hídrico..... | 34 |
| 5.3.3 Concentração de Proteína Total do Intestino de <i>A. gemmatalis</i> , Alimentadas com Plantas da Cultivar UFV-16 Submetidas ou não ao Estresse Hídrico | 37 |
| 5.3.4 Atividade de Enzimas e Concentração de Proteína Total do Intestino de Lagartas <i>A. gemmatalis</i> , Alimentadas com Folhas da Cultivar UFV-16 Irrigada e Reirrigada..... | 39 |
| 6. CONCLUSÕES | 41 |
| 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA | 42 |

RESUMO

FAUSTINO, Verônica Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2015. **Impacto do estresse hídrico e biótico (*Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818) sobre o mecanismo de defesa da soja.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Ana Ermelinda Marques, Felipe Lopes da Silva e Joel Antônio de Oliveira.

O déficit hídrico é um dos principais estresses abiótico capaz de gerar dano para o crescimento e desenvolvimento da planta de soja, principalmente no período de floração e enchimento dos grãos. Além disso, a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), uma das principais pragas desfolhadora da cultura, causa perdas significativas na lavoura. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do estresse hídrico no mecanismo de defesa da soja e nos parâmetros bioquímicos da lagarta *A. gemmatalis*. O experimento foi realizado com a cultivar UFV-16, submetida ou não ao estresse hídrico e à injúria pela lagarta; cultivar UFV-16 submetida ou não ao estresse hídrico sem a injúria pela lagarta, e, cultivar UFV-16 irrigada e reirrigada, submetidas à injúria pela lagarta. Os tratamentos foram compostos por 5 repetições. Avaliou-se a atividade de lipoxigenase e síntese de inibidores de proteases nas folhas de soja. No intestino da lagarta avaliou-se a atividade das proteases totais, da tripsina-like amidásica e esterásica e a concentração de proteína total. A atividade de lipoxigenases nas folhas de soja sob estresse hídrico crescente, com (CL) e sem (SL) a injúria pela lagarta, não apresentou diferença significativa entre os diferentes estresses hídricos ($P > 0,05$). Entretanto, os inibidores de proteases nas plantas de soja em ambos os tratamentos CL e SL, aumentaram até o estresse hídrico $\Psi_{am} = -1,0$ MPa e no $\Psi_{am} = -1,6$ MPa os valores diminuíram. No intestino da lagarta, a atividade de proteases totais foi significativamente menor nas plantas do $\Psi_{am} = -1,6$ MPa. Mas, as atividades da tripsina-like amidásica e esterásica foram decrescentes no intestino das lagartas que se alimentaram das folhas nos três potenciais hídricos: $\Psi_{am} = -0,6$ MPa; $\Psi_{am} = -1,0$ MPa e $\Psi_{am} = -1,6$ MPa. Para a soja irrigada e reirrigada não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na atividade da lipoxigenase e na produção de inibidores de proteases. A atividade da enzimas e a concentração da proteína total no intestino da lagarta não apresentaram diferença estatística significativa ($P > 0,05$). Portanto, a cultivar UFV-16 é tolerante ao déficit hídrico ao qual foi submetida, e ainda, responde com defesas às injúrias causadas pela lagarta *A. gemmatalis*.

ABSTRACT

FAUSTINO, Verônica Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2015. **Impact of water and biotic stress (*Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818) on the soy defense mechanism.** Advisor: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Advisor: Ana Ermelinda Marques, Felipe Lopes da Silva and Joel Antônio de Oliveira.

Water deficit is a very important abiotic stress and it produces damage to the growth and development of soybean plants, particularly in the flowering period and grain filling. Furthermore, the soybean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*), the principal defoliator pest crop, it causes significant crop losses. The objective of this study was to evaluate the impact of water stress in soybean defense mechanism and biochemical parameters of soybean caterpillar *A. gemmatalis*. The experiment was conducted with the UFV-16 cultivar, submitted and did not submit to water stress and injury by the caterpillar; UFV-16 cultivar submitted and did not submit to water stress without injury by the caterpillar, and UFV-16 cultivar irrigated and reirrigated submitted to injury by the caterpillar. The treatments consisted of 5 repetitions. We evaluated the lipoxygenase activity and protease inhibitors synthesis in soybean leaves. In the caterpillar gut was evaluated total proteases activity, amidolytic and esterolytic trypsin-like and total protein concentration. The lipoxygenase activity in soybean leaves submitted crescent water stress, with (CL) and without (SL) the injury caused by the caterpillar, did not show significant difference between all water stress ($P > 0.05$). However, protease inhibitors in the soybean plants to both CL and SL treatments, increased until water stress of $\Psi_{am} = -1.0$ MPa and to plants with $\Psi_{am} = -1.6$ MPa, protease inhibitors decreased. In the caterpillar gut, total protease activity was significantly lower in plants with $\Psi_{am} = -1.6$ MPa. But amidolytic and esterolytic trypsin-like decreased in caterpillars gut fed on leaves in three water potentials: $\Psi_{am} = -0.6$ MPa; $\Psi_{am} = -1.0$ MPa and $\Psi_{am} = -1.6$. Between irrigated and reirrigated soybeans there were not significant differences ($P > 0.05$) in the lipoxygenase activity and protease inhibitors synthesis. The enzymes activities and total protein concentration in the caterpillar gut did not show statistically significant difference ($P > 0.05$). Therefore, UFV-16 cultivar is tolerant to water stress which has been submitted, and it responds with defenses to injuries caused by the caterpillar *A. gemmatalis*.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) da família Fabaceae, é uma das principais commodities cultivada no mundo. No Brasil, ela tem grande importância no cenário econômico, por ser um dos principais produtos do agronegócio, ocupando lugar de destaque na pauta das exportações do país. A soja em grão é o produto mais exportado atualmente (Hirakuri e Lazzaroto, 2014; Conab, 2014; Boletim do Agronegócio Internacional, 2015; Conab 2015A).

No entanto, no Brasil a cultura de soja é acometida por diferentes estresses abióticos e bióticos reduzindo sua produtividade. Dentre os estresses abióticos, a seca é um dos principais fenômenos gerador de prejuízos e de riscos para a cultura (Farias et al., 2001; Farias et al., 2007). Com o progresso das pesquisas na geração de cultivares com maior rendimento de grãos, estresses causados pelo déficit hídrico, durante estádios críticos, têm limitado estes rendimentos (Maehler et al., 2003). O impacto do estresse hídrico na lavoura de soja ficou mais evidente na safra de 2012/2013 quando houve redução significativa na produção do grão em comparação com a safra de 2013/2014 (Conab, 2015A).

No que diz respeito aos estresses bióticos, o ataque de pragas podem causar considerável redução da produtividade de grãos. Dentre esses, a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das principais pragas desfolhadora da cultura. Essa lagarta inicialmente se alimenta da epiderme inferior e do mesófilo das folhas jovens, e a partir do segundo instar, se alimenta da folha podendo causar completa desfolha nas plantas. Além do limbo, em situação de intensa infestação, ela consome também as nervuras para poder completar seu desenvolvimento até a fase de pupa, consumindo o equivalente a 2,1 vezes a sua massa corporal (Hoffmann-Campo et al., 2000; Andrade et al., 2004).

A planta ao ser injuriada pelo inseto ativa as suas vias de defesa e uma das principais vias é a das lipoxigenases. Estas enzimas são da classe das oxidoredutases, contêm ferro e catalisam a dioxigenação do ácido linoleico, formando ácido jasmônico pela via octadecanoide das plantas (Guimarães, 2008; Scott et al., 2010; Shivaji et al., 2010). O ácido jasmônico é responsável pela ativação dos genes que expressam os inibidores de proteases (Farmer e Ryan, 1992; Oliveira et al., 2005; Scott et al., 2010; Shivaji et al., 2010). Os inibidores de proteases são considerados agentes antimetabólicos, pois levam os insetos à deficiência proteica. Essa interferência na digestão diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas

necessárias ao crescimento e desenvolvimento do inseto (Silva-Filho e Falco, 2000; Oliveira et al., 2005).

Sendo assim, é importante explorar a capacidade de defesa da planta de soja submetida aos dois tipos de estresse, abiótico e biótico. Para tal, foi proposto a avaliação do impacto do estresse hídrico no mecanismo de defesa da cultivar UFV-16, e o reflexo nos parâmetros bioquímicos do intestino da lagarta-da-soja após alimentação com estas plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura da Soja

Atualmente a soja é uma das principais commodities cultivada no mundo. Suas características de crescimento e desenvolvimento são bastante diferentes dos ancestrais que lhe deram origem, principalmente no que se refere a sua produtividade de grãos por planta. O seu progresso começou com o surgimento de plantas oriundas de sucessivos cruzamentos naturais, entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China (CISoja, 2015A).

A planta de soja é herbácea e de produção anual, possui altura variando entre 80 e 150 cm, os frutos medem de 2 a 7 cm e alojam de 1 até 5 sementes. Há grande diversidade de ciclo. Os cultivares brasileiros apresentam ciclos variando entre 100 e 160 dias e são classificados em Grupos de Maturidade Relativa (GMR) e possuem diferentes tipos de crescimento: indeterminado, semideterminado e determinado. A soja é fortemente influenciada pelas interações ambientais versus os genótipos (Alliprandini et al., 2009; CISoja, 2015B).

No Brasil, a produção de grãos foi estimada pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) em 209,5 milhões de toneladas para safra 2014/2015. Esta estimativa representa um aumento de 8,2%, ou seja, o equivalente a 15,9 milhões de toneladas em relação à safra anterior, que foi de 193,62 milhões de toneladas. Em termos percentuais, os destaques foram para a cultura da soja que apresentou um incremento de 11,8% na produção, chegando a 96,2 milhões de toneladas, seguido da cultura do milho na segunda safra, que registrou 54,5 milhões de toneladas. (Ministério da Agricultura, 2015A).

Para a safra 2015/2016, a Conab prevê que a produção de grãos atingirá cerca de 212,9 milhões de toneladas, representando um crescimento de 2,1% em relação ao ciclo 2014/2015. As projeções para a área plantada de grãos são de 58,9 milhões de hectares e esse número representa um crescimento de 1,6% em comparação à temporada 2014/2015. Esse aumento se deve à soja, com previsão de um acréscimo entre 2,1% (671,3 mil ha) e 3,8% (1,22 milhão de ha), seguido da produção de milho na primeira safra que ficará entre 26,5 e 28,2 milhões de toneladas. (Ministério da Agricultura, 2015B).

Diante deste cenário produtivo, para a situação da cultura da soja, a seca é um dos principais fenômenos gerador de prejuízos e de riscos para a cultura (Farias et al.,

2001; Farias et al., 2007). Perante o progresso obtido nas pesquisas geradoras de cultivares de maior capacidade de rendimento de grãos, estresses causados pelo déficit hídrico durante estádios críticos têm limitado estes rendimentos (Maehler et al., 2003). A sensibilidade da soja ao déficit hídrico, considerando o rendimento de grãos, tende a aumentar à medida que a cultura avança no seu ciclo, apresentando máxima sensibilidade durante o período de reprodução (Ashley e Ethridge, 1978; Korte et al., 1983; Farias et al., 2007; Farias et al., 2007; Kron et al., 2008; Silvante et al., 2012).

2.2. Mudanças Climáticas

Diversas atividades antrópicas e industriais têm colaborado para aumento nas concentrações de gases de efeito estufa na atmosfera. Esta situação tem mudado o clima global e elevou a temperatura da superfície da Terra em 0,74°C no século passado (IPCC, 2007). A causa do aumento da concentração de CO₂ atmosférico de 280 para 398,83 ppm aconteceu principalmente no início da revolução industrial (Conway e Tans, 2013). As mudanças climáticas interferem nos impactos biológicos relacionados à capacidade dos organismos terrestres, das populações, das comunidades e dos ecossistemas em lidar com as alterações para que consigam ampliar suas respostas desde o nível molecular até o da biosfera (Peñuelas et al., 2013).

Através de estudos de modelagem juntamente com as projeções estatísticas, previsões para longo prazo dos cenários acometidos pelos impactos das mudanças climáticas indicam mudanças também nos rendimentos das produções das culturas. Elas são mais vulneráveis às alterações climáticas e sofrerão principalmente com a alta taxa de evapotranspiração devido ao aumento da temperatura atmosférica e à falta de água disponível no solo. Essa combinação de fatores negativos dificultará o desenvolvimento do ciclo biológico das culturas diminuindo a produtividade como foi observado para o trigo e a soja (Osborne et al., 2012).

Schimid et al (2013), verificaram que as mudanças climáticas estão diretamente relacionadas com as atividades humanas tais como: transporte, consumo de energia elétrica e a criação de gado. A produção dos gases do efeito estufa por estas atividades contribuem para o aumento médio da temperatura global acarretando impactos natural e social. Dessa maneira, os produtores rurais enfrentarão alterações terrestres que nos últimos tempos tem se agravado cada vez mais.

A avaliação do estado geral do planeta é feita pelo IPCC/ONU (Intergovernmental Panel on Climate Change - United Nations), instituído em 1988,

para averiguaras pesquisas da ciência do clima e produzir relatórios a cada cinco ou sete anos. No relatório de 2007, os cientistas relataram a responsabilidade dos humanos pelo aquecimento global. O mais recente relatório do IPCC alerta para os riscos de fome, inundações e conflitos, devido às alterações climáticas do planeta (Branco, 2015; Nações Unidas no Brasil, 2015).

Segundo Lobell (2012), de fato as mudanças climáticas estão muito presentes nestas últimas décadas, sendo constatadas através da tendência do aumento do CO₂ atmosférico, dos níveis de O₃, dos problemas com a precipitação e com a temperatura. Estas situações prejudicam a agricultura, pois provoca desequilíbrio no agroecossistema, principalmente na produção de grãos e na segurança alimentar. Quanto à segurança alimentar, o problema se relaciona a produção de alimentos de baixa qualidade nutricional, principalmente em regiões onde a seca é mais severa. Períodos prolongados de baixa ocorrência de precipitação ou exposição a temperaturas elevadas produzem desequilíbrio nos sistemas ecológico e hidrológico e têm impactos severos na produção agrícola (Kogan et al., 2003; Karnieli et al., 2010; Board e Kahlon, 2011).

Assim, as mudanças climáticas podem interferir na distribuição da produção agrícola e também nas técnicas de manejo do solo, das plantas daninhas e das pragas. Além disso, observou-se a presença de impactos indiretos nas culturas através das alterações das populações de fitófagos, dos inimigos naturais e dos patógenos, sendo que estas modificações aumentaram suas incidências e severidades, e dentre estas populações, as pragas estão entre os primeiros organismos a sofrerem com estes fatores climáticos no que se refere à quantidade de indivíduos (Gornall et al., 2010; Embrapa Meio Ambiente, 2015).

No Brasil podem ser observados os efeitos das mudanças climáticas relacionados principalmente à falta de chuva. Esta situação ocorreu na lavoura de soja na safra 2012/2013 quando se teve redução significativa na produção do grão em comparação com a safra de 2013/2014. De acordo com a Conab (2014), o estado do Paraná foi o estado mais atingido pelas alterações climáticas e a lavoura de soja foi atingida praticamente em todos os estádios do cultivo. No estado do Mato Grosso a situação foi diferente, pois a forte chuva no período da colheita prejudicou a qualidade do produto (Figura 1). No estado de Goiás ocorreram períodos de estiagem nos meses de janeiro e fevereiro, prejudicando o enchimento dos grãos (Andrea Parise, 2015).

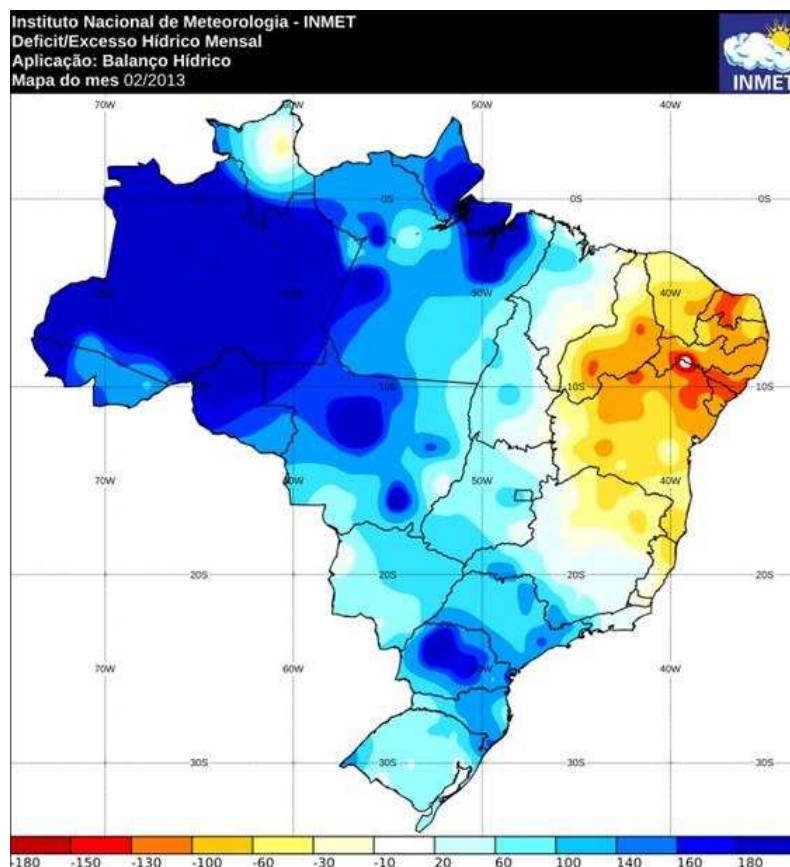


Figura 1: Precipitação no Estado do Mato Grosso em fevereiro de 2013. Fonte: INMET, 2015A.

A situação de déficit hídrico na cultura da soja foi também observada na safra de 2014/2015. A região Centro-Oeste, maior produtora do país, e as Regiões Sul e Sudeste sofreram com os transtornos da estiagem, tempo seco, chuvas localizadas e temperaturas elevadas no início do plantio. Desta forma, os produtores destas regiões, principalmente dos estados de Goiás, Distrito Federal, Paraná e Minas Gerais tiveram que atrasar o plantio. Esta situação trouxe como consequência, prejuízos na produtividade, que ocorreu devido à redução da “janela climática”, ou seja, colheu-se antes do período previsto, evitando o período chuvoso, sem comprometer a lavoura que seria plantada na sequência (Conab, 2015B) (Figura 2).

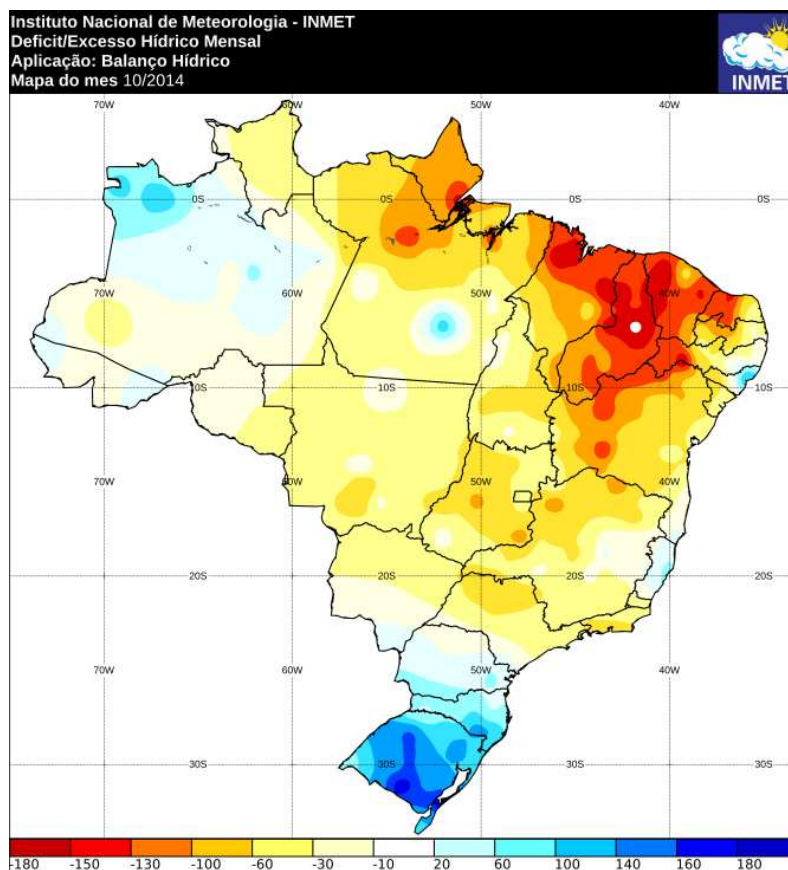


Figura 2: Precipitação nas Regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste em outubro de 2014. Fonte: INMET, 2015B.

As plantas de soja submetidas ao déficit hídrico na floração e enchimento dos grãos não atingem maturação fisiológica dos grãos e têm queda na produtividade (Arias et al., 2011; Pimentel, 2011; Silvente et al., 2012). A seca é um dos mais importantes estresses abióticos que limita a produção da soja (Specht et al., 1999; Purcel e Specht, 2004). Ela é altamente suscetível à seca, particularmente no que se refere ao estágio de crescimento e reprodução (Silvente et al., 2012).

A cultura da soja submetida ao déficit hídrico apresenta duas fases críticas bem definidas: 1) fase da semeadura à emergência das plântulas e 2) fase de enchimento dos grãos. Na germinação, tanto o excesso como a falta de água são prejudiciais ao estabelecimento da cultura. Neste período, os exageros hídricos são mais limitantes que o déficit hídrico (Salinas et al., 1989). No entanto, no período de enchimento dos grãos o déficit hídrico é mais prejudicial do que na floração (Doss et al., 1974; Sionit e Kramer, 1977).

2.3. Lagarta-da-Soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818)

Além dos problemas supracitados causados pelo o déficit hídrico, a cultura da soja também está sujeita aos fatores bióticos simultaneamente, como por exemplo, a infestação da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner,1818). Esta lagarta é considerada uma das principais pragas desfolhadora de plantas de soja (Hoffmann-Campo et al., 2000). Na fase larval, este inseto causa danos severos à soja em áreas cultivadas por todo o país (Moscardi e Souza, 2002; Vianna et al., 2011). Cada lagarta pode consumir em torno de 100 a 150 cm² de área foliar, e aproximadamente 96% desse consumo ocorre do 4º ao 6º instares larvais (Hoffmann-Campo et al., 2000), contribuindo para redução na produção de grãos (Mendonça et al., 2009; Vianna et al., 2011).

O ciclo biológico de *A. gemmatalis* é de aproximadamente 30 dias, dependendo das condições ambientais. A fase adulta dura em torno de 15 dias e a mariposa mede de 30 a 38 mm, apresentando coloração de cinza a marrom avermelhado ou amarelado, sem dimorfismo sexual (Figura 3). Estas mariposas encontram-se durante o dia em locais sombreados, principalmente na base das plantas, e seu processo reprodutivo ocorre durante o período noturno (Praça et al., 2006).



Figura 3: *Anticarsia gemmatalis* Hübner,1818 (Lepidoptera: Noctuidae): inseto adulto (Fonte: Sosa-Gómez et al.,2014).

As fêmeas ovipositam na face superior e inferior das folhas, nos pecíolos e nos caules das plantas. Os ovos possuem formato arredondado, porém achatados na

superfície inferior, medem de 1 a 2 mm de diâmetro e a coloração inicialmente é branca. Em seguida, adquirem coloração marrom-avermelhada e a incubação dura de três a cinco dias (Bárbara, 2000).

A lagarta-da-soja pode ter de cinco a seis instares larvais e medir de 40 a 50 mm de comprimento. Em alta população, elas apresentam coloração negra com listras brancas (Figura 4). As pupas podem apresentar cor verde ou marrom, são lisas e medem de 18 a 20 mm de comprimento, 4 a 6 mm de largura e são encontradas abaixo da superfície do solo a uma profundidade de 2 cm. A fase de pupa dura em média 7 dias, culminando com a emergência do adulto (Bárbara, 2000; Praça et al., 2006; Embrapa Soja, 2014)



Figura 4: Fase larval de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)

No Brasil a lagarta-da-soja ocorre em todos os locais de cultivo, sendo o desfolhador mais comum da cultura (Hoffmann-Campo et al., 2000). Por ser um inseto desfolhador, esta lagarta se alimenta tanto da epiderme inferior quanto do mesófilo das folhas jovens, e a partir do segundo instar, se alimenta vorazmente da folha inteira. Além do limbo, consome também as nervuras para completar seu desenvolvimento até a fase de pupa (Andrade et al., 2004).

2.4. Lipoxigenases (LOX)

As lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxidoreduases; EC 1.13.11.12) constituem uma família heterogênea de enzimas de peroxidação lipídica amplamente distribuída em plantas e no reino animal (Baysal e Demirdoven, 2007; Holkova et al., 2009). Estas enzimas formam derivados hidroperóxidos, catalisam a dioxigenação de ácidos graxos poliênicos contendo o sistema cis, cis-1,4-pentadieno, como por exemplo, o ácido

linoleico (LA), α -linolênico ou araquidônico. Os ácidos linolênico, linoleico e seus derivados são considerados os principais substratos das lipoxigenases da célula da planta, e, o ácido araquidônico e seus ésteres são os principais substratos para as lipoxigenases encontrados em células animais (Acosta et al., 2009).

Em plantas, o produto da dioxigenação dos ácidos graxos insaturados pelas lipoxigenases são os hidroperóxidos, que são transformados em diferentes compostos de atividade biológica, tais como ácido jasmônico, ácido traumático, alquenos, aldeídos e álcoois (Axelrod et al., 1981; Mack et al., 1987; Vick e Zimmerman, 1987; Browse, 2009; Wasternack e Kombrink, 2010; Yan et al., 2013). As lipoxigenases são cruciais na estratégia de defesa das plantas. Muitas plantas respondem tanto as injúrias causadas por insetos como as mecânicas por meio da produção de ácido jasmônico e da ativação de genes de inibidores de protease nas folhas (Guimarães, 2008; Scott et al.; 2010; Shivaji et al.; 2010).

Farmer e Ryan (1992) propuseram que, para a expressão dos inibidores de proteases em tomateiro, um sinal sistêmico é necessário para indução dos genes de defesa. Eles postularam que o ácido jasmônico é parte integral de um sistema de transdução de sinal intracelular que regula estes genes. Assim, ao ser ferida por insetos herbívoros, a planta produz sistemina, um peptídeo de dezoito resíduos de aminoácidos, ou, se a planta for injuriada por patógeno, serão produzidos oligouronídeos, polissacarídeos da parede celular das plantas (Figura 5).

Dentro deste arsenal, a defesa mediada pela Via das Lipoxigenases induz a produção de ácido jasmônico e culminará com a expressão dos inibidores de proteases contra as injúrias de herbívoros. A ingestão destes inibidores de proteases interfere no processo de degradação das proteínas no intestino médio dos insetos, pois possuem ação antimetabólica levando-os a deficiência de proteínas. Assim, haverá diminuição da disponibilidade dos aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (Silva-Filho e Falco, 2000; Farmer e Ryan, 2002).

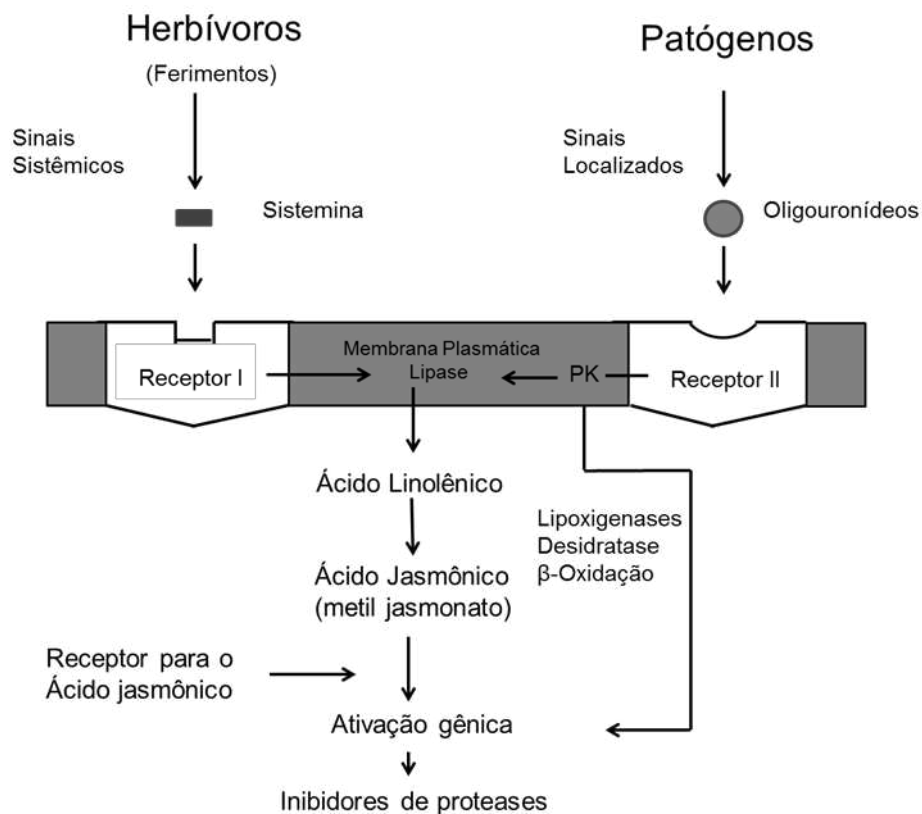


Figura 5- Modelo proposto para a sinalização que regula a expressão de genes inibidores de proteases induzidas por ferimento em folhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae) PK = Proteína Quinase (Adaptado de Farmer e Ryan, 1992).

2.5. Inibidores de Proteases (IPS)

Os inibidores de proteases são proteínas multifuncionais importantes por constituir um mecanismo de regulação da atividade proteolítica. Eles podem ser classificados de acordo com o mecanismo de reação (competitivos e não competitivos), ou, de acordo com a especificidade para aqueles que inibem diferentes classes de proteases, uma classe de protease, uma família de protease ou uma única protease. Conforme as classes de proteases que eles inibem, temos como exemplo, os inibidores de serino-protease (Salvesen e Nagase, 1989; Rawlings et al., 2004; Christeller, 2005; Rawlings, 2010).

Os inibidores também afetam o desenvolvimento dos insetos de forma indireta, via mecanismo de feedback, aumentando a produção de proteases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis, e, esses aminoácidos seriam deslocados para sínteses de mais proteases em detrimento de outras proteínas essenciais (Jongsma e Bolter, 1997). Os estudos sobre os inibidores de proteases em plantas têm aumentado as evidências de que estes não estão exclusivamente envolvidos

somente na proteção contra patógenos e herbívoros, mas também, no controle da atividade de proteólise da planta em condições de estresse abiótico (Figura 6) (Brzin e Kidric, 1995; Martinez e Diaz, 2008; Benchabane et al., 2010; Vaseva et al., 2012).

Devido à co-evolução dos insetos com as plantas, estes se defendem dos efeitos deletérios dos inibidores de proteases produzidos pelas plantas, aumentando a síntese de enzimas da classe inibida, e de outras classes, burlando a inibição (Jongsma e Bolter, 1997; Srinivasan et al., 2006; Pilon et al., 2006; Pilon et al., 2009; Jamal et al., 2012). Se o inseto tiver sucesso na adaptação aos inibidores de proteases, seu crescimento e desenvolvimento ocorrerão normalmente. Mas, pesquisas têm mostrado que alguns insetos herbívoros tiveram a digestão proteica prejudicada, devido à alteração das enzimas proteolíticas, tanto na presença de inibidores sintéticos quanto nos naturais obtidos das plantas, quando os mesmos foram inseridos em dietas alimentares (Macedo et al., 2010A e 2010B; Moreira et al., 2011; Mendonça 2012; Paixão et al., 2013).

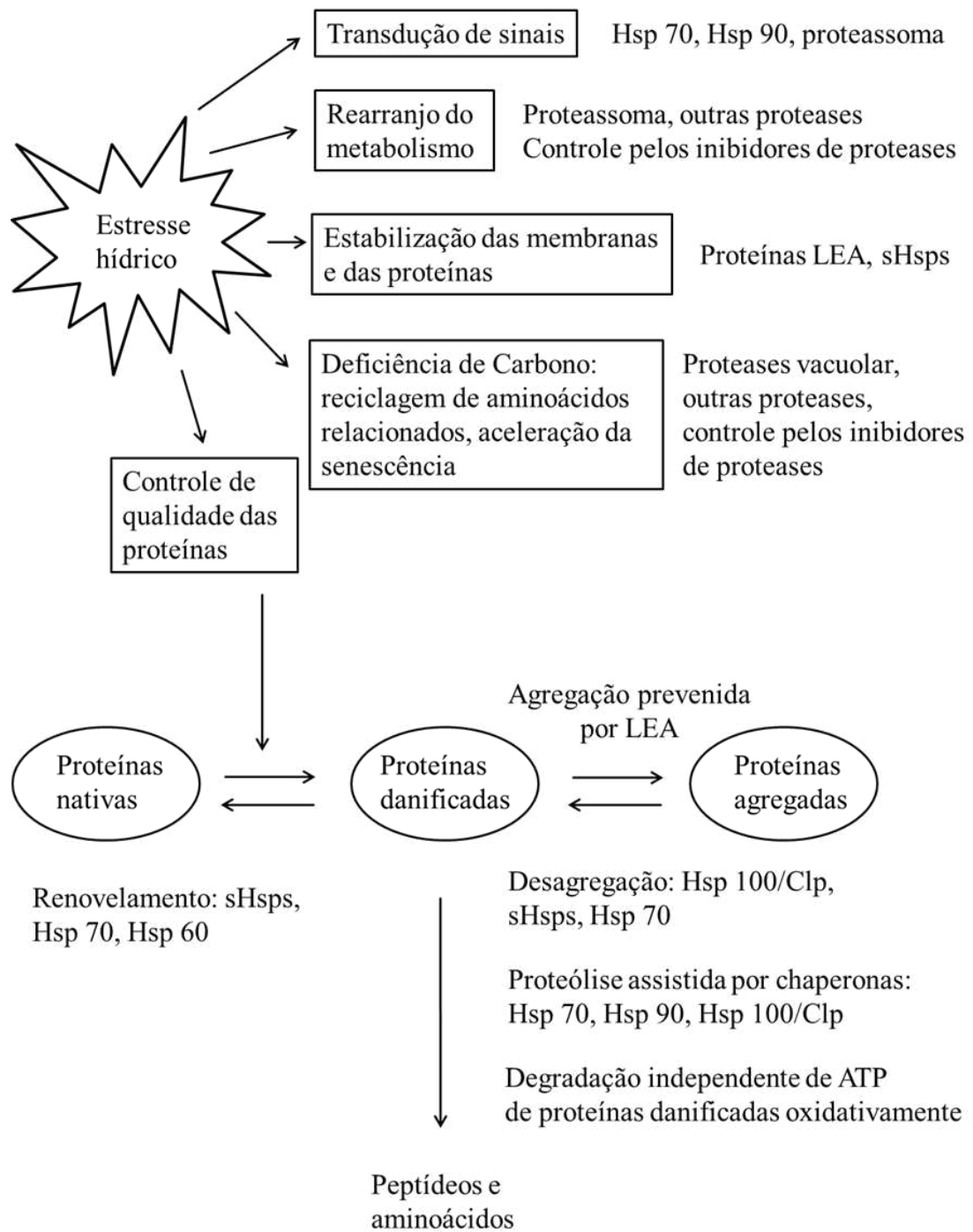


Figura 6 - Resposta ao déficit hídrico e cross-talk entre dehydrins, chaperonas (Hsps), proteases e inibidores de protease na manutenção da conformação e função da proteína celular (Adaptado de Vaseva et al., 2012).

2.6. Enzimas Proteolíticas do Intestino de Lagartas

A maioria das espécies na Terra são insetos e, assim, entender as suas relações evolutivas é a chave para a compreensão da evolução da vida. Os insetos são um dos grupos evolutivamente mais bem adaptados de organismos em todo o mundo, e grande parte da sua adaptação é devido a sua capacidade de explorar diversos habitats e fontes de energia. Uma das características responsáveis por esta capacidade se deve principalmente por suas enzimas digestivas que são capazes de degradar vários tipos de alimentos, desde materiais orgânicos até substâncias tóxicas (Terra et al., 1996; Trautwein et al., 2012).

As enzimas digestivas conhecidas também como proteases são subdivididas em dois grandes grupos, que são: as exopeptidases e as endopeptidases. As exopeptidases clivam a ligação peptídica próxima ao grupo amino ou carboxi da proteína, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas no interior da proteína. A degradação é iniciada por endopeptidases seguida por exopeptidases. As proteases são subdivididas em quatro subclasses, de acordo com o aminoácido alvo para a ação. Elas são proteases de serina, proteases de cisteína, proteases de aspartato e metalo-proteases (Terra et al., 1996; Rao et al., 1998; Kumar et al., 2014)

As proteases ou enzimas proteolíticas realizam modificações altamente específicas e seletivas de proteínas, tais como a ativação de enzimas por proteólise, e ainda, colaboram com o transporte de proteínas secretoras através das membranas (Kumar et al., 2014). Nos insetos, estas proteases digestivas são importantes para o seu crescimento e desenvolvimento, pois degradam as proteínas e peptídeos em aminoácidos, os quais são essenciais para a biossíntese das proteínas estruturais e funcionais (Dunse et al., 2010A e 2010B). As serino-proteases, em particular, são a principal classe de proteases digestivas, representando 95% da atividade digestiva na ordem Lepidoptera (Terra e Ferreira, 1994; Srinivasan et al., 2006).

Dentro da subclasse das serino-proteases, as tripsinas são as mais abundantes no intestino das lepidopteras e participam de diversos processos fisiológicos, incluindo a digestão, ativação de proteínas específicas, no desenvolvimento e produção de peptídeos biologicamente ativos, na transdução de sinais e ativação de hormônios (Page e Di Cera, 2008; Zhan et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o impacto do estresse hídrico no mecanismo de defesa da soja e nos parâmetros bioquímicos da lagarta *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a atividade de lipoxigenases e inibidores de proteases em plantas de soja submetidas ou não ao estresse hídrico, injuriadas ou não por lagartas;
- Determinar a atividade de enzimas do intestino das lagartas alimentadas com plantas de soja submetidas ou não ao estresse hídrico;
- Determinar a atividade de lipoxigenases e inibidores de proteases em plantas de soja irrigadas e reirrigadas;
- Determinar a atividade de enzimas do intestino das lagartas alimentadas com plantas de soja irrigadas e reirrigadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, em temperatura de $35 \pm 5^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 20\%$. As análises foram realizadas no laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (BIOAGRO).

4.1. Material Vegetal e Condução do Estresse Hídrico

As sementes da cultivar de soja UFV-16 foram disponibilizadas pelo Banco de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia (UFV). Esta cultivar foi escolhida devido ao melhor desempenho, mediante teste de germinação e teor de umidade, em comparação com outras quatro cultivares, nos potenciais hídricos de 0,0 MPa, -0,5 MPa, -1,0 MPa, -1,5 MPa e -2,0 MPa (Dados não apresentados).

O plantio da cultivar UFV-16 foi realizado em vasos de 10 litros. O substrato utilizado foi solo e substrato comercial Plantmax® na proporção (1:1). A calagem e a adubação foram feitas de acordo com os resultados de análise do solo e conforme a recomendação técnica para a cultura. Utilizou-se 12,5 g de calcário, 7,2 g de cloreto de potássio e 63,5 g de fósforo por vaso. Para obtenção do nitrogênio, as sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*. A seguir, foram semeadas seis sementes em cada vaso e após a germinação foi feito o desbaste, mantendo-se três plântulas por vaso.

O primeiro grupo de plantas, ao atingir o estágio de desenvolvimento V4, conforme a escala de desenvolvimento de Fehr e Caviness (1977), foram submetidas ao déficit hídrico suspendendo-se a irrigação. Os potenciais hídricos (Ψ_{am}) para cada tratamento foram: $-0,18 \pm 0,002$ MPa (controle), $-0,6 \pm 0,1$ MPa, $-1,0 \pm 0,08$ MPa e $-1,6 \pm 0,2$ MPa. O segundo grupo de plantas, que estava no estágio vegetativo V6 (Fehr e Caviness, 1977), também recebeu imposição do estresse hídrico até atingir o potencial hídrico de $-1,6 \pm 0,2$ MPa. Em seguida, estas plantas foram reirrigadas até voltarem ao estado de turgescência. Este grupo de plantas foi comparado com plantas controle que receberam irrigação diariamente. Os potenciais hídricos, para cada grupo, foram monitorados a partir do terceiro dia de suspensão da irrigação, com a bomba de Scholander (Scholander, 1965), no horário entre 4h e 5h da manhã nas folhas completamente expandidas.

4.2. Criação e Preparo da Dieta Artificial da Lagarta-da-Soja

4.2.1. Criação da Lagarta-da-Soja

As pupas de *A. gemmatalis* foram obtidas do Departamento de Entomologia (UFV). Em seguida, foram levadas para o Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFV), mantidas em temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$ até a emergência das mariposas. Os casais, mantidos em gaiolas (50 x 50 cm) fechadas lateralmente com tecido de organza, foram alimentados com solução nutritiva composta de mel (10,5 g), cerveja (350 mL), sacarose (60 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagin (1,05 g) e água destilada (1000 mL), embebida no pedaço de algodão colocado sobre a placa de Petri, no fundo da gaiola.

A postura das mariposas ocorreu após o terceiro dia, na superfície de folhas de papel A4 que revestia internamente a gaiola. Estas folhas foram retiradas, recortadas em tiras de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento e colocadas em potes plásticos de 500 mL. Estes potes foram cobertos com tampas que continham um orifício circular de 2 cm de diâmetro, coberto com organza. Os potes foram mantidos em estufas do tipo BOD, a 25°C de temperatura, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14h.

No segundo ou terceiro dia após a eclosão dos ovos, iniciou-se a alimentação das lagartas com dieta artificial (Greene et al., 1976; Hoffman-Campo et al., 1985) com modificações, colocando-se um pedaço da dieta em cada pote plástico.

4.2.2. Preparo da Dieta para a Lagarta-da-Soja

A dieta artificial foi preparada utilizando-se os diversos ingredientes conforme a composição apresentada na Tabela 1:

Tabela 1 – Composição da dieta artificial

| INGREDIENTES | QUANTIDADE | |
|--------------------------|------------------|---------|
| | Feijão Branco(g) | 75,00 |
| Germe de Trigo (g) | 60,00 | 200,00 |
| Proteína da Soja (g) | 30,00 | 100,00 |
| Caseína (g) | 30,00 | 100,00 |
| Levedura de Cerveja (g) | 37,50 | 125,00 |
| Ágar (g) | 22,50 | 75,00 |
| Ácido Ascórbico (g) | 3,96 | 13,20 |
| Ácido Sórbico (g) | 1,98 | 6,60 |
| Nipagim (g) | 3,30 | 11,00 |
| Tetraciclina (mg) | 124,00 | 413,40 |
| Formol 40% (mL) | 15,90 | 14,00 |
| Complexo Vitamínico (mL) | 9,90 | 33,00 |
| Água (mL) | 1200,00 | 4000,00 |

Todos os ingredientes, exceto ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagin, tetraciclina, formol e o complexo vitamínico, foram triturados, na ordem apresentada na Tabela 1, utilizando-se liquidificador industrial. A mistura foi autoclavada por 1 h à pressão de 1,5 kgf/cm², em seguida foi transferida novamente para o liquidificador, misturada e adicionada de ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagin (metilparabeno), tetraciclina, formol, água destilada e o complexo vitamínico composto por niacinamida (1 mg), pantoenato de cálcio (1 mg), tiamina (0,25 mg), riboflavina (0,50 mg), piridoxina (0,25 mg), ácido fólico (0,25 mg), biotina (0,02 mg), inositol (20 mg), até formar uma pasta homogênea. Essa pasta foi transferida ainda quente para recipientes plásticos com tampa, em seguida, resfriada em câmara germicida acondicionada com luz ultravioleta, e armazenada a 4°C.

4.3. Tratamentos com a Lagarta-da-Soja

As lagartas foram mantidas em jejum por 24 h, e em seguida, colocadas na terceira e quarta folha trifolioladas, no mesmo dia da medição do potencial hídrico antemanhã, mantendo-as nas plantas por 24 h. Em cada folha colocou-se uma lagarta do 5º instar, totalizando-se duas lagartas por planta, sendo quatro lagartas por vaso. As folhas foram envolvidas com bolsa de organza, evitando-se a fuga das lagartas (Figura 7 A e B). Após 24 h, as lagartas e as folhas injuriadas foram coletadas. A seguir, os intestinos das lagartas foram retirados, acondicionados em microtubos de 2 mL e congelados em nitrogênio líquido. As folhas injuriadas foram acondicionadas em pacotes de alumínio e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As amostras de folhas e intestinos foram armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) para análises posteriores.

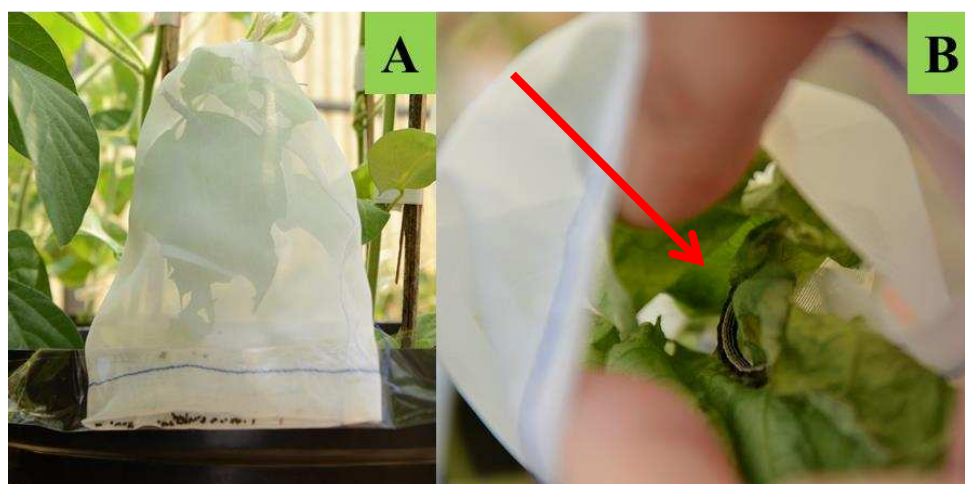


Figura 7 - Bolsa de organza envolvendo a folha da soja (A). Lagarta-da-soja dentro da bolsa de organza (B).

4.4. Determinação da Atividade de Lipoxigenases (LOX) em Folhas da Cultivar UFV-16

4.4.1. Obtenção do Extrato Foliar

O extrato vegetal foi obtido após a pulverização das folhas da cultivar UFV-16 com nitrogênio líquido, em almofariz e pistilo previamente resfriados, até obtenção do pó vegetal (Ohta et al., 1986). Imediatamente, adicionou-se ao pó vegetal, o tampão fosfato de sódio 50 mM; pH 6,5, na proporção de 1:3 (p/v) (1 g de folha:3 mL de tampão). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 17.200 g, por 30 min, a 4°C. O

sobrenadante foi utilizado para a atividade de lipoxigenases e determinação da concentração de proteínas.

4.4.2. Análise de Lipoxigenases (LOX)

A atividade de lipoxigenases sobre o ácido linoleico foi determinada de acordo com o método de Axelrod et al. (1981), pela formação do sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado, através do aumento da absorvância a 234 nm. O substrato foi utilizado a partir de uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM, preparada com ácido linoleico (SIGMA-ALDRICH®). Para este preparo, o béquer foi envolvido com papel-alumínio contendo aproximadamente 10 mL de água deionizada previamente fervida, a qual foram adicionados 78 µL de ácido linoleico e 90 µL de Tween 20 (SIGMA-ALDRICH®). Em seguida, a solução foi homogeneizada gentilmente com pipeta automática para evitar a formação de bolhas. O clareamento da solução foi feito adicionando-se gotas de NaOH 0,5 M. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, envolvido por papel-alumínio, e o volume foi completado com água deionizada fervida. A solução-estoque de linoleato de sódio foi armazenada a -20°C em microtubos de 1 mL envolvidos em papel-alumínio.

A atividade da lipoxigenase foi determinada em temperatura ambiente. A mistura de reação foi constituída de 1000 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM; pH 6,5, 10 µL do extrato vegetal e 20 µL de linoleato de sódio 10 mM. O branco foi constituído das mesmas quantidades de substrato e tampão.

A absorvância foi obtida a cada 30 s, a 234 nm, pelo período de 2,5min. Para o cálculo da velocidade foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 25.000 M⁻¹cm⁻¹ para o produto formado. As análises foram realizadas em triplicata nas cinco repetições de cada tratamento.

4.5. Determinação de Inibidores de Proteases em Folhas da Cultivar UFV-16

4.5.1. Obtenção do Extrato Foliar

O preparo do extrato vegetal foi realizado mediante pulverização das folhas da cultivar UFV-16 com nitrogênio líquido, em almofariz e pistilo previamente resfriados, obtendo-se o pó vegetal. A seguir, o pó obtido foi homogeneizado com o tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM, na proporção de 1:3 (p/v) (1 g de folha:3

mL de tampão). O homogenato foi centrifugado a 17.200 g por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado para a determinação dos inibidores de proteases e da concentração de proteínas.

4.5.2. Análise de Inibidores de Proteases

A presença de inibidores de proteases no extrato vegetal foliar foi determinada utilizando-se tripsina bovina. A atividade trípica, na presença de inibidores, foi realizada da seguinte forma: i) para o teste de inibição foram adicionados em um microtubo de 2 mL, 100 µL do extrato vegetal, 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl₂, e 100 µL da solução de tripsina 4,7 x 10⁻⁵ M; ii) para o controle da enzima, foram adicionados em outro microtubo de 2 mL, 600 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl₂ e 100 µL da solução de tripsina 4,7 x 10⁻⁵ M; iii) para o branco, utilizou-se 1000 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2, contendo 20 mM CaCl₂ e 500 µL de L-BApNA.

Estes meios de reação, em ambos microtubos (teste e controle da enzima, respectivamente), foram incubados por cinco min à temperatura ambiente. Em seguida, retirou-se 500 µL do tubo do teste de inibição e adicionou-se a outro microtubo contendo 500 µL de Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2 e 20 mM de CaCl₂ e 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM. O mesmo procedimento foi realizado para o controle da enzima. A absorvância das soluções foi determinada a 410 nm durante 2,5 min de reação. As análises foram realizadas em triplicata nas cinco repetições de cada tratamento.

Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{mg de tripsina inibida/g de proteína} = \frac{A \times B}{(C \times 1.000 \times P)},$$

Em que:

A = absorvância a 410 nm do controle – absorvância a 410 nm da amostra (diferença entre absorvância do controle e a absorvância da amostra);

B = diluição da amostra;

P = concentração de proteína dos extratos vegetais (g/mL);

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

4.6. Obtenção do Extrato Enzimático do Intestino da Lagarta-da-Soja

O extrato enzimático foi obtido através da pulverização dos intestinos com nitrogênio líquido, utilizando-se bastão de vidro estéril dentro do microtubo de 2 mL. Em seguida, adicionou-se 1 mL de HCl 10^{-3} M (4°C) e o homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 10 min, a 4°C. O sobrenadante, denominado extrato enzimático bruto, foi mantido em gelo e utilizado para atividade enzimática e determinação da concentração de proteínas, conforme Paixão et al. (2013) com modificações.

4.7. Determinação da Atividade de Proteases do Intestino da Lagarta-da-Soja

As atividades proteásicas foram determinadas segundo o método descrito por Tomarelli et al. (1949) utilizando-se azocaseína 2% (p/v) como substrato, em tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2 contendo CaCl_2 20 mM, 37°C. A mistura reacional continha 50 μL de substrato e 60 μL de extrato enzimático. Para o branco, utilizou-se água destilada em substituição ao extrato enzimático e as reações foram incubadas a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 240 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Após a parada de reação, as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas em repouso no gelo, por 15 min. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 g por cinco min a 25°C para remoção da proteína precipitada. Uma alíquota de 240 μL do sobrenadante foi transferida para microtubos contendo 280 μL de NaOH, 1 M, e a seguir, a absorvância foi obtida no comprimento de onda 440 nm. Os valores da absorvância foram divididos pela concentração de proteínas totais para a obtenção da atividade específica. As análises foram realizadas em triplicata nas cinco repetições de cada tratamento.

4.8. Determinação da Atividade Amidásica de Tripsina-like do Intestino da Lagarta-da-Soja

A atividade amidásica foi realizada pelo método descrito por Erlanger et al. (1961), utilizando-se o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil-p-nitroanilida (L-BApNA) para enzimas tripsina-like. O substrato L-BApNA foi preparado na concentração de 1,2 mM em tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2 contendo CaCl_2 20 mM, a 25°C. A mistura de reação continha 0,5 mL do substrato, 0,5 mL do tampão e 10 μL do extrato enzimático. O branco foi composto de 0,5 mL do substrato e 0,5 mL do tampão.

As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida no comprimento de onda de 410 nm em função do tempo (2,5 min). Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 8800 ($M^{-1} \times cm^{-1}$) para o produto. As análises foram realizadas em triplicata nas cinco repetições de cada tratamento.

4.9. Determinação da Atividade Esterásica de Tripsina-like do Intestino da Lagarta-da-Soja

A atividade esterásica foi realizada pelo método descrito por Hummel (1959), utilizando-se o substrato N- α -p-tosil-L-arginina metil éster (L-TAME) na concentração de 0,1 mM em tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2 contendo $CaCl_2$ 20 mM, a 25°C. A mistura de reação continha de 0,5 mL do substrato, 0,5 mL do tampão e 10 μ L do extrato enzimático. O branco foi composto de 0,5 mL do substrato e 0,5 mL do tampão.

As velocidades foram determinadas através da medida da absorvância a 247 nm em função do tempo (2,5 min). Para os cálculos utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 540 ($M^{-1} \times cm^{-1}$) do produto. As análises foram realizadas em triplicata nas cinco repetições de cada tratamento.

4.10. Determinação da Concentração das Proteínas

A concentração das proteínas totais nos extratos brutos das folhas e dos intestinos da lagarta-da-soja foi determinada conforme metodologia de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se albumina soro bovina (BSA) como proteína padrão. As análises foram realizadas no comprimento de onda de 595 nm, em triplicata nas cinco repetições de cada tratamento.

4.11. Análise Estatística

O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), e o experimento foi montado num esquema de parcela subdividida. A parcela foi composta pelos tratamentos com e sem lagarta, e a subparcela, pelos potenciais hídricos, com cinco repetições. Para o segundo grupo, foram mantidas plantas como controle irrigado e plantas reirrigadas. Em ambos os tratamentos colocou-se duas lagartas por plantas nas cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e

posteriormente foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividade de Lipoxigenases (LOX)

5.1.1. Determinação da Atividade de Lipoxigenases em Folhas da Cultivar UFV-16 Submetidas ou não ao Estresse Hídrico, Injuriadas ou não pela Lagarta *A. gemmatalis*

A atividade de lipoxigenases na cultivar UFV-16 submetida ao estresse hídrico e injuriada pelas lagartas *A. gemmatalis* não apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos CL -0,18; CL -0,6; CL -1,0 e CL -1,6 ($P>0,05$). Entretanto, nas plantas sob estresse hídrico e sem injúria da lagarta, a LOX apresentou diferença estatística significativa entre o SL -0,18 (controle) e os demais tratamentos: SL -0,6; SL -1,0 e SL -1,6 ($P<0,05$). Mas, entre os tratamentos SL -0,6; SL -1,0 e SL -1,6 não houve diferença estatística significativa (Figura 8).

De forma geral, a atividade de lipoxigenases na cultivar UFV-16 submetida ao estresse hídrico e sem a injúria da lagarta *A. gemmatalis* (SL -0,6; SL -1,0 e SL -1,6) foi mais alta em relação ao controle (SL -0,18). A atividade da LOX nas plantas submetidas ao estresse hídrico e à injúria pelas lagartas (CL) apresentou semelhança à das plantas submetidas ao estresse hídrico e sem injúria das lagartas (SL). Porém, nas plantas irrigadas (controle), CL -0,18 e SL -0,18, foi verificado um aumento de aproximadamente 45% no tratamento CL -0,18, devido à presença da lagarta, em relação ao SL -0,18, que não recebeu injúria da lagarta (Figura 8).

Desta forma, em relação ao estresse hídrico, este foi responsável pela ativação da defesa da cultivar UFV-16 pela Via das Lipoxigenases, conforme verificado nos tratamentos SL -0,6; SL -1,0 e SL -1,6, os quais foram submetidos ao estresse hídrico sem a injúria pelas lagartas. Assim, neste trabalho foi demonstrado que a cultivar UFV-16 foi capaz de induzir a expressão da lipoxigenase após ser submetida ao estresse abiótico, no caso, o estresse hídrico. Portanto, no que diz respeito às plantas quando foram submetidas ao estresse hídrico seguido da injúria pelas lagartas (CL -0,6; CL -1,0 e CL -1,6), a lipoxigenase já havia sido induzida e a cultivar UFV-16 contava com o arsenal de defesa mediante a Via das Lipoxigenases, contra a lagarta *A. gemmatalis*.

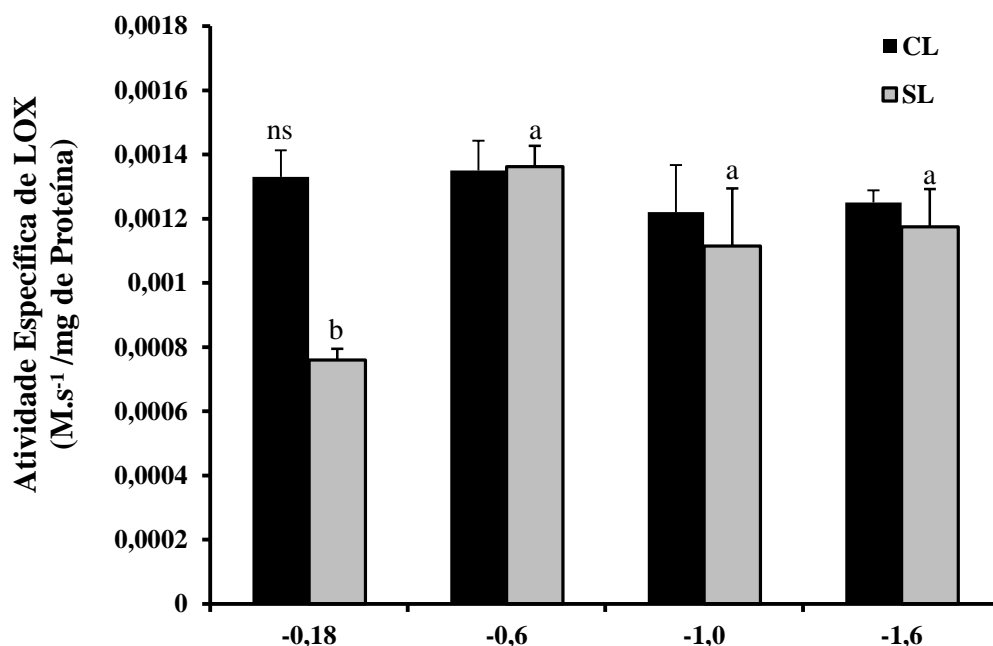


Figura 8 - Atividade de Lipoxigenases em extrato de folhas de soja. CL: Cultivar UFV-16 com lagartas *A. gemmatalis*. SL: Cultivar UFV-16 sem lagartas *A. gemmatalis*. Plantas com irrigação: Ψ_{am} = -0,18 MPa (controle). Plantas submetidas aos estresses hídricos Ψ_{am} = -0,6 MPa; Ψ_{am} = -1,0 MPa e Ψ_{am} = -1,6 MPa. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. ^{ns}As médias não diferem estatisticamente entre si. As barras representam o desvio padrão da média.

Copolovici et al. (2014) constataram que a atividade de lipoxigenase aumentou mediante o estresse hídrico imposto em *Alnus glutinosa*, planta da família Betulaceae. O estresse hídrico mais severo imposto à planta de arroz aumentou sua defesa, devido à produção do fitormônio ácido jasmônico em detrimento do ácido indol acético, sendo este, um produto da rota octadecanoide ou Via das Lipoxigenases (Farmer e Ryan, 1992; Du et al., 2013). Por esta via, o ácido linoleico é convertido em ácido jasmônico, desencadeando a defesa das plantas (Browse, 2009; Wasternack e Kombrink, 2010; Yan et al. 2013).

5.1.2. Determinação da Atividade de Lipoxigenases em Folhas da Cultivar UFV-16, Irrigada e Reirrigada, Injuriadas pela Lagarta *A. gemmatalis*

A atividade de lipoxigenases na cultivar UFV-16 irrigada (controle) e reirrigada, ambas injuriadas pela lagarta *A. gemmatalis*, não apresentou diferença estatística significativa ($P > 0,05$) (Figura 9).

A cultivar UFV-16, submetida ao estresse hídrico e após ter retomado o “status” hídrico, teve a Via das Lipoxigenases acionada mediante a injúria pela lagarta *A. gemmatalis*. Tal fato pôde ser observado devido à expressão das lipoxigenases, comparando-se ao controle irrigado. Ainda, foi verificado que as plantas reirrigadas exibiram 28% a mais de atividade da lipoxigenase em relação ao controle irrigado. Desta forma, este resultado demonstrou que ao passar pelo estresse abiótico de restrição hídrica, a cultivar UFV-16 após reidratada, não apresentou problema em ativar seu arsenal de defesa pela Via das Lipoxigenases contra a lagarta *A. gemmatalis*.

Fillipou et al. (2011) relataram que a planta *Medicago truncatula*, da família Fabaceae, mesma família da soja, ao ser submetida ao déficit hídrico, teve o metabolismo bioquímico, fisiológico, molecular e celular diminuído a níveis basais. Entretanto, quando se interrompeu o processo de déficit hídrico com a reidratação, a planta retornou ao seu metabolismo normal.

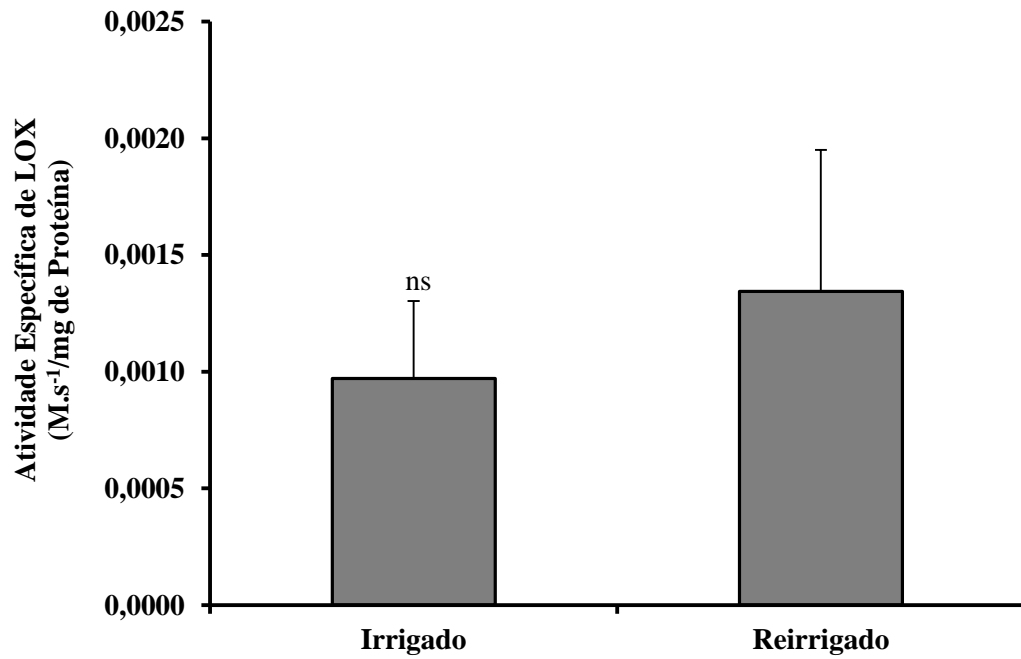


Figura 9 - Atividade de Lipoxigenases em extrato de folhas de soja. Tratamento Irrigado: Cultivar UFV-16 irrigada diariamente e submetida à injúria pela lagarta *A. gemmatilis* (controle). Tratamento Reirrigado: Cultivar UFV-16 submetida ao estresse hídrico até atingir o $\Psi_{am} = -1,6$ MPa, reirrigada e submetida à injúria pela lagarta *A. gemmatilis*. ^{ns}As médias não diferem estatisticamente entre si. As barras representam o desvio padrão da média.

5.2. Inibidores de Proteases (IPs)

5.2.1. Determinação de Inibidores de Proteases em Folhas da Cultivar UFV-16 Submetidas ou não ao Estresse Hídrico, Injuriadas ou não pela Lagarta *A. gemmatalis*

Ocorreram alterações nos inibidores de proteases nos extratos foliares da cultivar UFV-16 em função do estresse hídrico e das injúrias pela *A. gemmatalis*. Nos tratamentos com lagarta e sob estresse hídrico, não se verificou diferença estatística significativa entre CL -0,6 e CL -1,0 ($P > 0,05$), porém, houve diferença estatística entre estes tratamentos e o CL -1,6 ($P < 0,05$). Também não houve diferença significativa para CL -0,18 (controle) e CL -1,6 ($P > 0,05$), mas, houve diferença estatística significativa entre CL -0,18 (controle), CL -0,6 e CL -1,0 ($P < 0,05$) (Figura 10).

Este comportamento também foi verificado para os tratamentos sem lagarta e sob estresse hídrico. Não houve diferença estatística entre SL -0,6 e SL -1,0 ($P > 0,05$), entretanto, houve diferença estatística significativa entre eles e SL -1,6 ($P < 0,05$). O controle (SL -0,18) também não diferiu significativamente de SL -1,6, mas diferiu estatisticamente de SL -0,6 e SL -1,0 ($P < 0,05$) (Figura 10).

Os inibidores de proteases produzidos pelas plantas injuriadas (CL) e não injuriadas (SL) pela lagarta, ambas submetidas ao estresse hídrico, aumentaram até $\Psi_{am} = -1,0$ MPa, seguido do decréscimo no $\Psi_{am} = -1,6$ MPa, tanto para o tratamento CL quanto para o SL. Entretanto, nos tratamentos CL -0,6 e CL -1,0 observou-se maior produção dos inibidores de proteases em relação aos tratamentos SL -0,6 e SL -1,0, correspondendo ao acréscimo de aproximadamente 57% (Figura 10).

A cultivar UFV-16 foi induzida a produzir IPs pelo estresse hídrico tanto na presença quanto na ausência da lagarta *A. gemmatalis*. Embora a indução tenha ocorrido até o potencial hídrico -1,0 MPa nas duas situações, ela foi mais intensa na presença da lagarta. Contudo, independente da sua presença, no $\Psi_{am} = -1,6$ MPa, a produção dos IPs foi muito baixa, indicando que neste estresse hídrico a cultivar UFV-16 possivelmente acionou outra via de defesa. Além disto, o maior estresse hídrico imposto a esta cultivar pode ter sido responsável por via de defesa relacionada à proteção do seu próprio metabolismo.

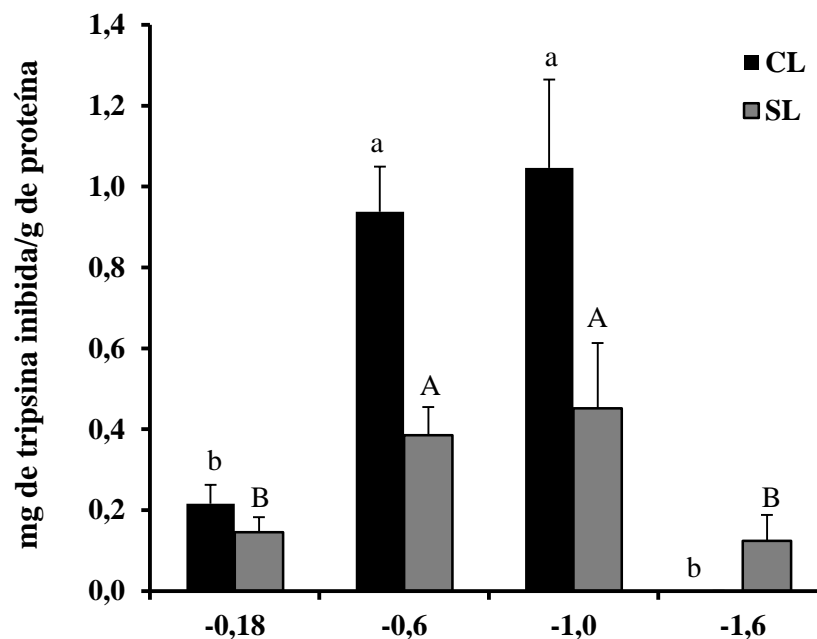


Figura 10 - Inibidores de proteases em extrato de folhas de soja. CL: Cultivar UFV-16 com lagartas *A. gemmatalis*. SL: Cultivar UFV-16 sem lagartas *A. gemmatalis*. Plantas com irrigação $\Psi_{am} = -0,18$ (controle). Plantas submetidas ao estresse hídrico: $\Psi_{am} = -0,6$ MPa; $\Psi_{am} = -1,0$ MPa e $\Psi_{am} = -1,6$ MPa. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As barras representam o desvio padrão da média.

Os estresses abióticos como seca, salinização e congelamento acarretam alterações na quantidade de proteínas inativas na planta. Assim, o estresse hídrico tem impacto negativo na manutenção das proteínas em sua conformação nativa. Devido a isto, a planta sob déficit hídrico responde de duas maneiras: síntese de proteínas protetoras (dehidrinas e chaperonas) e degradação de proteínas irreversivelmente danificadas por proteases (Vierstra, 1996; Feller, 2004).

Hieng et al. (2004) e Vaseva et al. (2012) demonstraram que a atividade de proteases nos extratos foliares de *Phaseolus vulgaris* cv. Zorin, planta da família Fabaceae, aumentou à medida que o déficit hídrico foi mais severo conforme a seguinte escala: pouco ($\Psi_w = -1,0$ MPa), levemente ($\Psi_w = -1,5$ MPa) e severamente ($\Psi_w = -2,0$ MPa) estressado. Kidrič et al. (2013) relataram que a planta *Ramonda serbica*, da família Gesneriaceae, submetida a prolongado período de déficit hídrico, produziu grande quantidade de proteases das classes endopeptidases e aminopeptidases, em comparação ao controle. Simova-Stoilova et al. (2010) e Vassileva et al. (2012), trabalhando com extratos foliares de plantas de trigo cultivadas sob condição de seca

prolongada, observaram que o aumento na atividade de proteases era de acordo com a tolerância dos cultivares ao déficit hídrico.

Em contrapartida, o excesso na produção de proteases endógenas em plantas sob estresse hídrico, induz a síntese de inibidores de proteases para regular sua atividade proteolítica, que estando descontrolada rompe membranas celulares, degrada a maioria das proteínas celulares e, por último, desencadeia a senescência prematura da planta (Vaseva et al., 2012). As pesquisas relacionando a resposta da planta à seca em níveis moleculares demonstraram que os inibidores de proteases são proteínas multifuncionais envolvidas não só na proteção das plantas contra patógenos e herbívoros, mas também, no controle da proteólise endógena sob condições de estresses abióticos (Brzin e Kidrič, 1995; Martinez e Diaz, 2008; Benchabane et al., 2010).

Ryan (1990) verificou que os inibidores de proteases foram ativados quando a planta foi injuriada por insetos herbívoros, e estes inibidores foram responsáveis pela inibição das enzimas proteolíticas dos insetos dificultando seu crescimento e desenvolvimento. Fortunato et al. (2007) e Paixão et al. (2013) demonstraram que, o período de 24h de permanência da lagarta *A. gemmatilis* nas folhas de soja, foi suficiente para aumentar a produção de inibidores de proteases em relação às plantas não injuriadas pela lagarta.

Os inibidores de proteases produzidos pela cultivar UFV-16, submetida ao estresse hídrico, atuaram na sua defesa contra as injúrias da lagarta e, além disto, possivelmente foram utilizados pela planta para ajuste do seu metabolismo celular. No entanto, no maior estresse hídrico, não houve quantidade significativa de inibidores de proteases, e estes podem ter sido produzidos e utilizados primeiramente para inibir o excesso das proteases endógenas, estando indisponíveis para a defesa contra a lagarta. E também, a cultivar UFV-16 possivelmente pode ter acionado outra via de defesa, a dos metabólitos secundários, como forma de defesa contra a lagarta.

Os metabólitos secundários são compostos de defesa, antinutritivos e antidigestivos para uma grande maioria de insetos herbívoros. As plantas produzem uma série de metabólitos secundários defensivos em resposta aos insetos fitófagos, infecções patogênicas e outros tipos de estresse. Os metabólitos secundários não afetam o crescimento e o desenvolvimento normal da planta, mas reduzem a palatabilidade dos seus tecidos para os herbívoros (Boerjan et al., 2003).

5.2.2. Determinação de Inibidores de Proteases em Folhas da Cultivar UFV-16 Irrigada e Reirrigada, Injuriadas pela Lagarta *A. gemmatalis*

A cultivar UFV-16, irrigada (controle) e reirrigada, ambas injuriadas pela lagarta *A. gemmatalis* não apresentou diferença estatística significativa na produção dos inibidores de proteases ($P > 0,05$) (Figura 11).

Estes resultados demonstraram que a cultivar UFV-16, após ter passado por restrição hídrica ($\Psi_{am} = -1,6$ MPa), manteve sua capacidade de defesa ao produzir os inibidores de proteases contra a lagarta-da-soja. Isto foi devido à recuperação do seu estado normal de hidratação após este estresse hídrico. Situação semelhante ocorreu com *Medicago truncatula*, planta da família Fabaceae, que estando sob estresse hídrico retomou seu metabolismo normal após a reidratação (Fillipou et al., 2011).

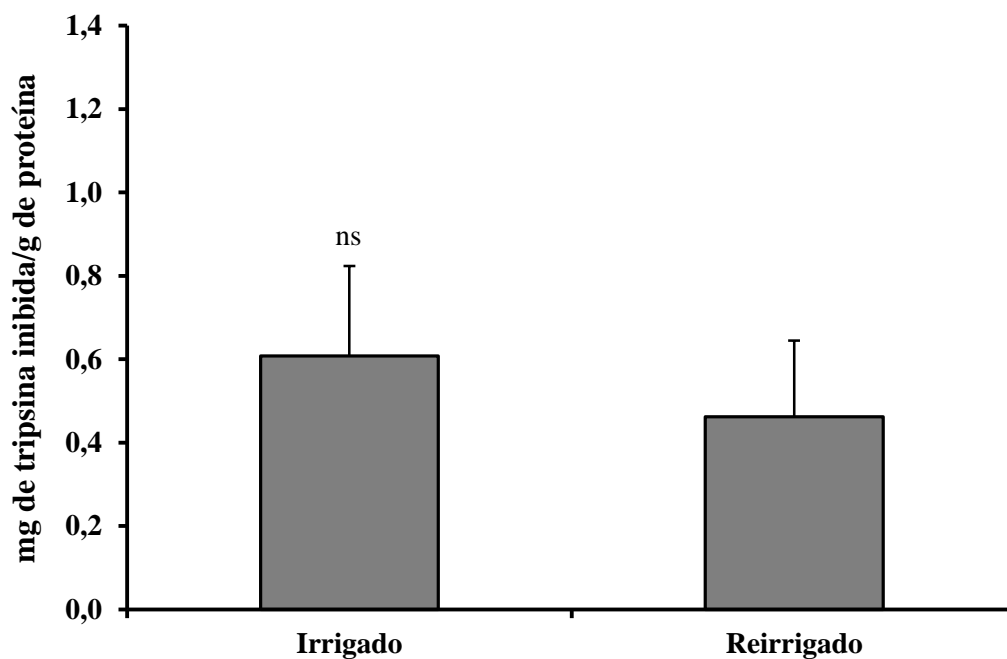


Figura 11 - Inibidores de proteases em extrato de folhas de soja. Tratamento Irigado: Cultivar UFV-16 irrigada diariamente e submetida à injúria pela lagarta *A. gemmatalis* (controle). Tratamento Reirrigado: Cultivar UFV-16 submetida ao estresse hídrico até atingir o $\Psi_{am} = -1,6$ MPa, reirrigada e submetida à injúria pela lagarta *A. gemmatalis*. ^{ns}As médias não diferem estatisticamente entre si. As barras representam o desvio padrão da média.

5.3. Atividade de Enzimas e Proteína Total do Intestino de Lagartas *A. gemmatalis*

5.3.1. Atividade de Protease Total do Intestino de *A. gemmatalis* Alimentadas com Plantas da Cultivar UFV-16 Submetidas ou não ao Estresse Hídrico

Houve alteração na atividade específica da protease total no intestino das lagartas *A. gemmatalis* em função dos potenciais hídricos impostos à cultivar UFV-16. Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos CL -0,18; CL -0,6 e CL -1,0 ($P > 0,05$). Entretanto, houve diferença estatística entre estes tratamentos e o CL -1,6 ($P < 0,05$) (Figura 12).

Foi observado que a menor atividade de protease total ocorreu no menor potencial hídrico (CL -1,6). Neste tratamento houve decréscimo de 85,29% desta atividade em relação ao controle (CL -0,18). Estes resultados demonstraram a influência do estresse hídrico sobre a cultivar UFV-16 que, por conseguinte, reagiu produzindo defesas capazes de alterarem a atividade das proteases totais do intestino das lagartas. A redução de atividade proteásica ocorre mediante produção de inibidores de proteases, e também, de metabólitos secundários.

O decréscimo da atividade proteolítica no intestino de lagarta tem sido verificado mediante a utilização de inibidores em dieta (Moreira et al., 2011; Paixão et al., 2013). A ingestão de inibidores de proteases por insetos herbívoros provoca insuficiência no aproveitamento dos aminoácidos essenciais, interferindo no crescimento e desenvolvimento dos insetos, levando-os à morte (Jongsma e Bolter, 1997; Pompermayer et al., 2001). Porém, neste trabalho, não foi verificado o decréscimo na atividade proteásica no intestino das lagartas até o tratamento CL -1,0. Entretanto, o decréscimo ocorreu no estresse hídrico mais severo (CL -1,6) e tal fato indica que a via de metabólitos secundários foi acionada pela cultivar UFV-16, e estes reduziram a atividade da protease total.

Joshi et al. (2014) utilizaram o ácido cafeico na concentração de 200 ppm em dieta para a lagarta *Helicoverpa armigera*, e foi verificado que este metabólito secundário reduziu a atividade de protease total do intestino desta lagarta em aproximadamente 35%.

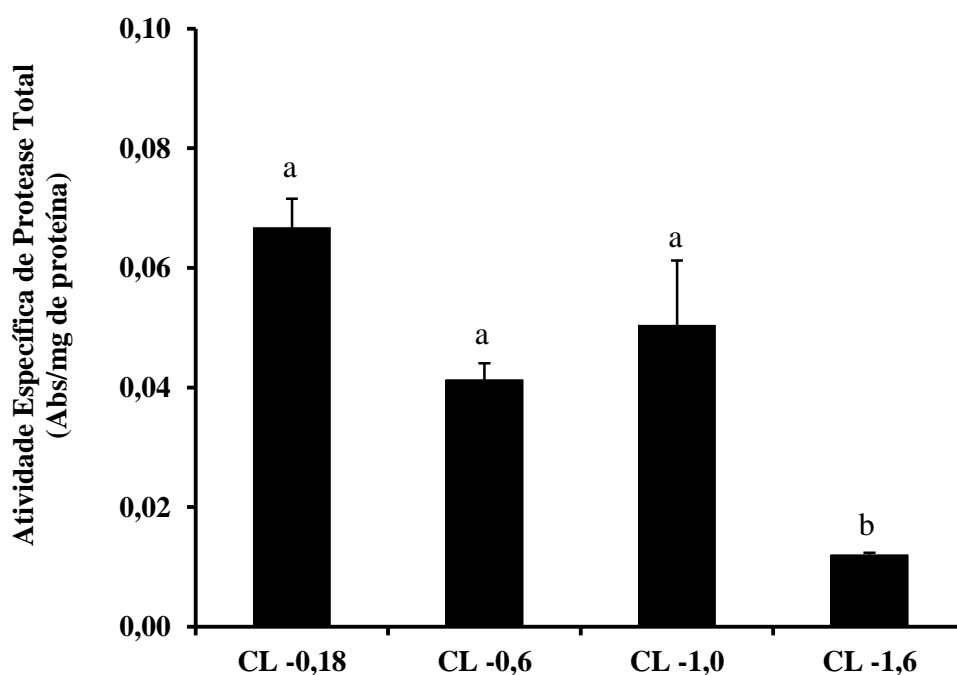


Figura 12 - Atividade de protease total do intestino das lagartas *A. gemmatalis*, alimentadas com folhas da cultivar UFV-16, em função do estresse hídrico. CL: Plantas de soja com lagartas *A. gemmatalis*. Plantas com irrigação: $\Psi_{am} = -0,18$ MPa (controle). Plantas submetidas ao estresse hídrico: $\Psi_{am} = -0,6$ MPa; $\Psi_{am} = -1,0$ MPa e $\Psi_{am} = -1,6$ MPa. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As barras representam o desvio padrão da média.

5.3.2. Atividade de Tripsina-like do Intestino de *A. gemmatalis* Alimentadas com Plantas de Soja Submetidas ou não ao Estresse Hídrico

A atividade da tripsina-like amidásica decresceu conforme foi aumentando o estresse hídrico nas plantas da cultivar UFV-16. A atividade amidásica de tripsina-like em extratos dos intestinos da lagarta *A. gemmatalis* diferiu estatisticamente entre os tratamentos CL -0,18 e CL -1,6 ($P < 0,05$). Os tratamentos CL -0,18 e CL -1,6 também diferiram significativamente de CL -0,6 e CL -1,0 ($P < 0,05$). Nos tratamentos intermediários, CL -0,6 e CL -1,0, não foi verificada diferença estatística significativa para a atividade da enzima ($P > 0,05$) (Figura 13 A).

A atividade esterásica da tripsina-like, à semelhança da atividade amidásica, também decresceu conforme aumentou-se o estresse hídrico na cultivar UFV-16. Houve diferença estatística significativa entre CL -0,18 e CL -0,6, e entre estes tratamentos e CL -1,0 e CL -1,6 ($P < 0,05$). Porém, para os tratamentos CL -1,0 e CL -1,6 não houve diferença estatística significativa para esta enzima ($P > 0,05$) (Figura 13 B).

Tanto a atividade amidásica quanto a esterásica da tripsina-like do intestino da lagarta diminuiu em função do estresse hídrico imposto a cultivar UFV-16. A atividade amidásica apresentou maior redução para o tratamento com menor potencial hídrico ($\Psi_{am} = -1,6$ MPa) e esta redução foi de 87,10% em relação ao controle ($\Psi_{am} = -0,18$ MPa) (Figura 13 A). No entanto, para a atividade esterásica, a cultivar UFV-16 submetida aos potenciais hídricos de $-1,0$ MPa e $-1,6$ MPa, promoveu redução de 78,00% da atividade desta enzima, nestes tratamentos, em relação às plantas controle (Figura 13 B).

A atividade amidásica e esterásica da tripsina-like presente no intestino das lagartas foi reduzida por ação dos inibidores de proteases, produzidos pelas plantas de soja sob estresse hídrico, possivelmente até o potencial hídrico de $-1,0$ MPa, conforme verificado nos inibidores de proteases (Figura 10). As plantas submetidas ao estresse hídrico e injuriadas pelas lagartas, tiveram a expressão dos inibidores aumentada até o potencial hídrico $-1,0$ MPa, denotando assim, que os IPs foram responsáveis pela inibição das enzimas supracitadas até este ponto do estresse hídrico.

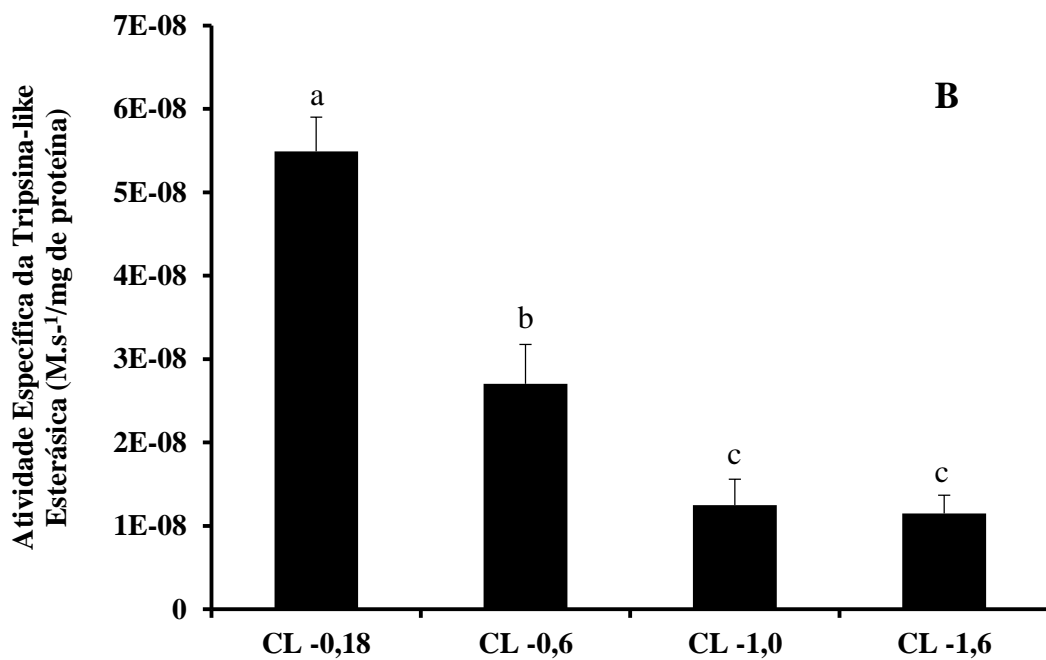
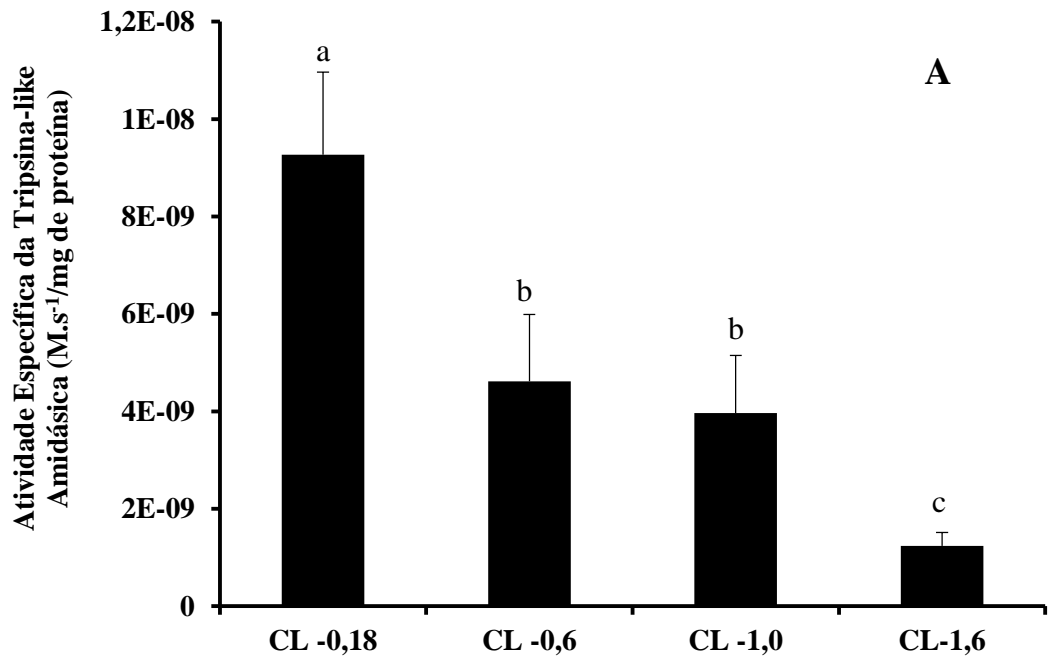


Figura 13 - Atividade amidásica (A) e esterásica (B) de tripsina-like do intestino das lagartas *A. gemmatalis*, alimentadas com folhas da cultivar UFV-16, em função do estresse hídrico. CL: Plantas de soja com lagartas *A. gemmatalis*. Plantas com irrigação: $\Psi_{am} = -0,18$ MPa (controle). Plantas submetidas ao estresse hídrico $\Psi_{am} = -0,6$ MPa; $\Psi_{am} = -1,0$ MPa e $\Psi_{am} = -1,6$ MPa. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As barras representam o desvio padrão da média.

A introdução de inibidores sintéticos na dieta da lagarta-da-soja reduziu drasticamente a atividade amidásica e esterásica da tripsina-like no intestino das lagartas à medida que aumentou-se a concentração dos inibidores (Pereira et al., 2005; Moreira et al., 2011; Paixão et al., 2013). A atividade da tripsina-like no intestino das lagartas *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879), *Corcyra cephalonica* (Stainton, 1865), *Diatraea saccharalis* (Fabricius 1794) e *A. gemmatalis* foi inibida quando se usou o inibidor natural *Sapindus saponaria* trypsin inhibitor (SSTI) e de *Talisia esculenta* (Talisin) na presença de BapNa como substrato (Macedo et al., 2010AB). Pandey e Jamal (2014) verificaram que a atividade enzimática no intestino de *Helicoverpa armigera* (Hübner) diminuiu devido à inibição promovida por *Tamarindus trypsin inhibitor* (TTI) da semente de *Tamarindus indica*.

A menor atividade da tripsina-like, amidásica e esterásica, ocorreu quando as lagartas foram alimentadas com a cultivar UFV-16 submetida ao menor potencial hídrico ($\Psi_{am} = -1,6$ MPa). Esta menor atividade provavelmente está correlacionada a outro tipo de defesa que não aquela promovida pelos IPs, uma vez que eles foram pouco expressos no maior estresse hídrico (Figura 10). É possível que a cultivar UFV-16 tenha acionado outra via de defesa, como a da produção de metabólitos secundários, e estes foram responsáveis pela menor atividade das enzimas tripsina-like, excepcionalmente nas plantas sob maior estresse hídrico.

War et al. (2012), verificaram que, ao incorporarem na dieta da lagarta *H. armigera*, os metabólitos secundários: ácidos clorogênicos, cafeico, ferúlico, gentísico, protocatecuico, cinâmico e o composto trihydroxyflavone, ambos na concentração de 1.000 ppm, houve redução na atividade da tripsina em relação ao controle.

5.3.3. Concentração de Proteína Total do Intestino de *A. gemmatalis*, Alimentadas com Plantas da Cultivar UFV-16 Submetidas ou não ao Estresse Hídrico

A concentração de proteína total no extrato do intestino das lagartas *A. gemmatalis*, alimentadas com a cultivar UFV-16, foi crescente nos respectivos tratamentos CL -0,18; CL -0,6; CL -1,0 e CL -1,6, em função do estresse hídrico. A concentração de proteínas apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos extremos, CL -0,18 e CL -1,6, ($P < 0,5$). Porém, entre os tratamentos intermediários, CL -0,6 e CL -1,0, a concentração de proteínas não apresentou diferença estatística significativa ($P > 0,05$). Também, não houve diferença estatística significativa entre CL -0,18 e CL -0,6 (Figura 14).

A concentração de proteínas presente no intestino das lagartas foi aproximadamente cinco vezes maior do que o controle, quando estas se alimentaram das folhas da cultivar UFV-16 sob maior estresse hídrico (CL -1,6). As proteínas nos intestinos dos insetos nessas condições não foram degradadas. Isto tem implicação na fisiologia do inseto, uma vez que, as lagartas precisam mudar para o estágio de pupa, o que não ocorreria com sucesso, pois faltariam aminoácidos necessários para dar continuidade ao seu desenvolvimento (Oliveira et al., 2005; Pilon et al., 2009).

Estes resultados refletiram a interferência ocorrida na atividade das enzimas proteolíticas do intestino da lagarta, devido à ação na defesa produzida pela cultivar UFV-16. A diminuição da atividade das enzimas proteolíticas, ocorridas pela ação dos inibidores de proteases ou por outras moléculas, como as do metabolismo secundário, foi responsável pela baixa degradação das proteínas, mantendo-as em alta concentração no intestino das lagartas. Desta forma, pode haver atraso no crescimento acompanhado de defeitos na mudança de fases da lagarta, e também para o estágio pupa, com consequente interferência no seu ciclo de vida.

Macedo et al. (2010) observaram que as lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com dieta suplementada com inibidor Talisin se tornaram pupas com crescimento e desenvolvimento prejudicados, apresentando deformações abdominal e torácica. Guimarães et al. (2014) verificaram que larvas de *A. kuehniella* alimentadas com 1% de PpyTI, inibidor de tripsina presente em sementes de *Poincianella pyramidalis*, da família da Fabaceae, apresentaram redução acentuada na sobrevivência (70%) e no peso médio (80%). Moreira et al. (2011) trabalharam com o inibidor sintético bis-benzamidina e verificaram que o desenvolvimento das larvas foi prolongado e o peso das pupas foi drasticamente reduzido.

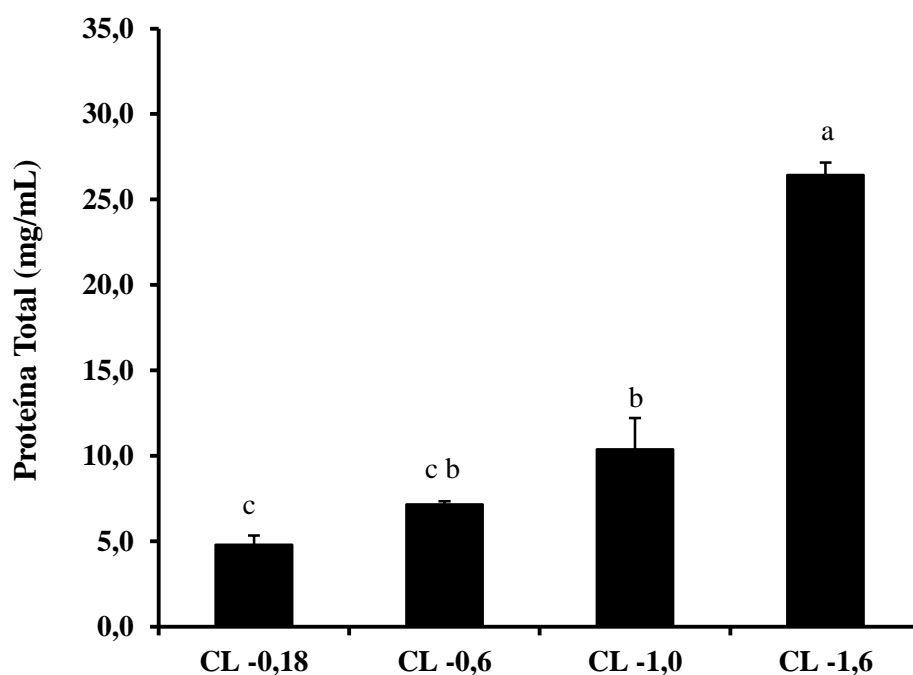


Figura 14 - Concentração de proteína total do intestino das lagartas *A. gemmatalis*, alimentadas com folhas da cultivar UFV-16, em função do estresse hídrico. CL: Plantas de soja com lagartas *A. gemmatalis*. Plantas com irrigação: $\Psi_{am} = -0,18$ MPa (controle). Plantas submetidas ao estresse hídrico: $\Psi_{am} = -0,6$ MPa; $\Psi_{am} = -1,0$ MPa e $\Psi_{am} = -1,6$ MPa. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As barras representam o desvio padrão da média.

5.3.4. Atividade de Enzimas e Concentração de Proteína Total do Intestino de Lagartas *A. gemmatalis*, Alimentadas com Folhas da Cultivar UFV-16 Irrigada e Reirrigada

A atividade da protease total não apresentou diferença significativa entre os tratamentos irrigado e reirrigado ($P > 0,05$) (Figura 15A), bem como não houve diferença estatística significativa para as enzimas tripsina-like amidásica e esterásica ($P > 0,05$), respectivamente (Figuras 15B e C). De igual modo, também não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) para a concentração de proteínas entre os tratamentos irrigado e reirrigado (Figura 15D).

As enzimas proteolíticas e a concentração de proteína total do intestino das lagartas *A. gemmatalis* não foram alteradas, quando as mesmas se alimentaram da cultivar UFV-16 reirrigada em relação ao controle irrigado. Ao se alimentarem destas plantas, as lagartas podem ter sido prejudicadas quanto ao aproveitamento das proteínas. Estes resultados revelaram que a cultivar UFV-16 suportou o potencial hídrico de -1,6

MPa, e ao ser reirrigada, foi capaz de ativar defesas para interferir no processo digestivo das lagartas, diminuindo o aproveitamento das proteínas para seu desenvolvimento.

Assim, a via de defesa induzida pela LOX culminou com a ativação para expressão de IPs, contribuindo com o arsenal de defesa da cultivar UFV-16, após a recuperação do seu “status” hídrico.

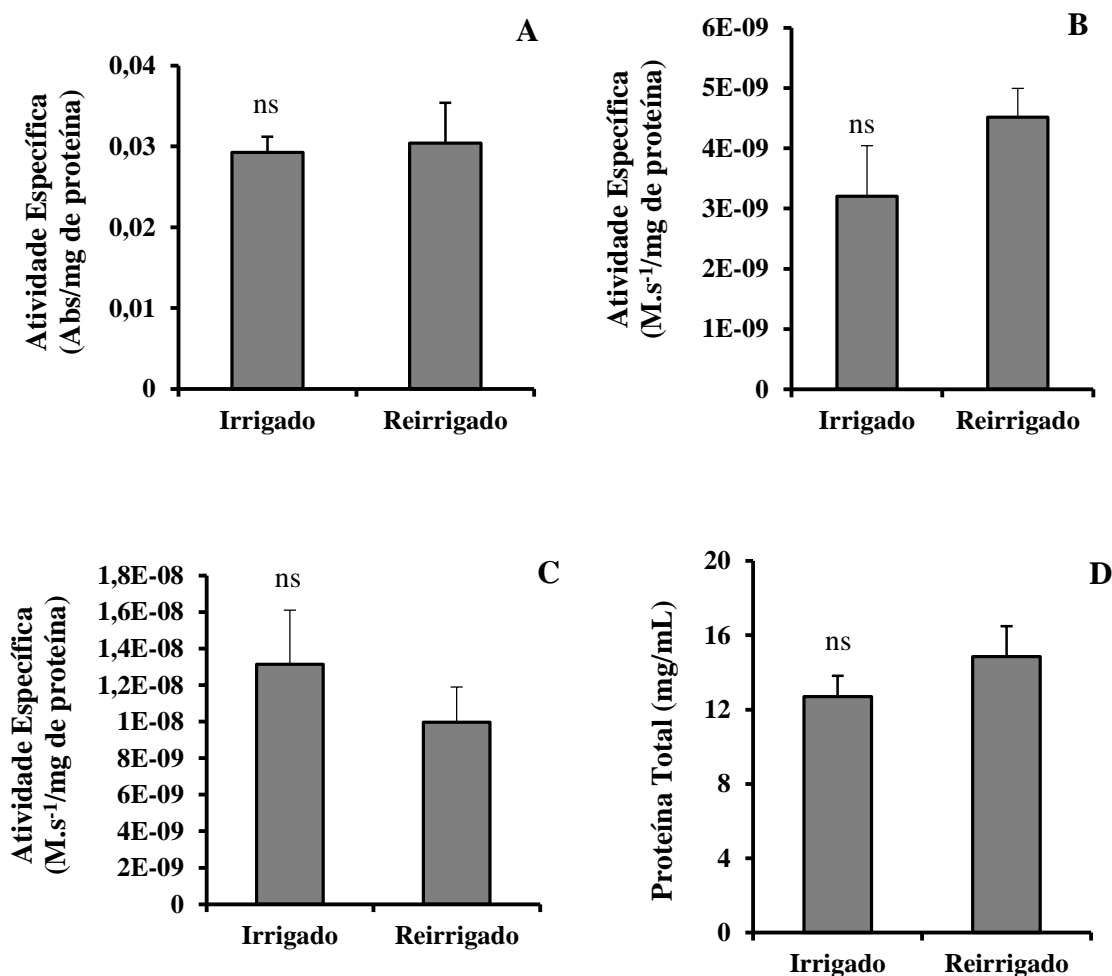


Figura 15 - Atividade de enzimas e concentração de proteína total do intestino das lagartas *A. gemmatalis*: **A**- Protease Total; **B**- Tripsina-like amidásica; **C**- Tripsina-like esterásica; **D**- Proteína Total. Tratamento Irrigado: Cultivar UFV-16 irrigada diariamente e submetida à injúria pela lagarta *A. gemmatalis* (controle). Tratamento Reirrigado: Cultivar UFV-16 submetida ao estresse hídrico até atingir o $\Psi_{am} = -1,6$ MPa, reirrigadas e submetidas à injúria pela lagarta *A. gemmatalis*.^{ns}As médias não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As barras representam o desvio padrão da média.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitam a verificação da capacidade da cultivar de soja UFV-16 em acionar as defesas. Mediante o estresse hídrico crescente, foi acionada a Via das Lipoxigenases e a expressão dos inibidores de proteases. O estresse hídrico extremo indica o acionamento de outra via de defesa, independente dos inibidores de proteases, possivelmente a dos metabólitos secundários. No maior estresse hídrico, sendo reidratada, a cultivar UFV-16 retoma o metabolismo de defesa tanto para a lipoxigenase quanto para os inibidores de proteases.

A lagarta-da-soja tem a atividade das enzimas proteolíticas do seu intestino alterada, em resposta à defesa da cultivar UFV-16 submetida ao estresse hídrico crescente. A redução nas enzimas proteolíticas implica em baixa digestibilidade da fonte de proteínas. Com baixa disponibilidade de aminoácidos, as lagartas têm o ciclo de vida alterado, ocasionando a morte.

A cultivar UFV-16 tolera o estresse hídrico imposto e aciona mecanismos de defesa capazes de atuar no intestino da lagarta *A. gemmatalis*.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Acosta, I. F., Laparra, H., Romero, S.P., Schmelz, E., Hambeg, M., Mottinger, J. P., Moreno, M.A., Dellaporta, S.L. Tasselseed1 Is a Lipoyxygenase Affecting Jasmonic Acid Signaling in Sex Determination of Maize. **Science**, v. 323, n. 5911, p. 262-265, 2009.

Alliprandini, L. F.; Abatti, C.; Bertagnolli, P. F.; Cavassim, J. E.; Gabe, H. L.; Kurek, A.; Steckling, C. Understanding soybean maturity groups in Brazil: environment, cultivar classification, and stability. **Crop science**, v. 49, n. 3, p. 801-808, 2009.

Andrade, F.G.; Negreiro, M.C.C.; Falleiros, Â.M.F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner,1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). **Arq. Inst. Biol**, v.71, p.391-398, 2004.

Arias, C. A. A.; Oliveira, M.F.; Pípolo, A.E.; Carneiro, E.S.; Moreira, J.U. V.; Kaster, M. Desenvolvimento de Cultivares de Soja com Tolerância à Deficiência Hídrica. **Simpósio sobre Tolerância à Deficiência Hídrica em Plantas**, 2011.

Ashley, D. A.; Ethridge, W. J. Irrigation effects on vegetative and reproductive development of three soybean cultivars. **Agronomy Journal**, v. 70, n. 1, p. 467-471, 1978.

Awad, M.; Castro, P. R. C. Introdução à fisiologia vegetal. São Paulo: **Nobel**, 1989.

Axelrod, B.; Cheesbrough, T.M.; Laasko, S. Lipoyxygenases from soybeans. **Methods Enzymology**. v.71, p.441-451,1981.

Barbara, K.A. Velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepdoptera: Noctuidae) 2000. Disponível em: <
<http://entnemdept.ifas.ufl.edu/creatures/field/velvetbean.htm> >. Acessado em 15 de Novembro de 2015.

Baysal, T.; Demirdoven, A. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 491-496, 2007.

Benchabane, M; Schlüter, U.; Vorster, J.;Goulet, M.C.; Michaud, D. Plant cystatins.**Biochimie**, v. 92, p. 1657-1666, 2010.

Board, J.E.; Kahlon, C. S.; Soybean yield formation: what controls it and how it can be improved. In: El-Shemy, H.A. (Ed.) **Soybean Physiology and Biochemistry**, InTech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, p.1-36, 2011.

Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p. 519-546, 2003

Boletim do Agronegócio Internacional. Superintendência de Relações Internacionais. Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/sites/default/files/boletim-agronegocio-internacional-n8_0.pdf>. Acessado em 15 de Novembro de 2015.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

Branco, M. C. A Cassandra de nosso tempo? Disponível em: <<http://www.iniciativaverde.org.br/comunicacao-artigos-e-noticias-detalhes/a-cassandra-de-nosso-tempo>>. Acessado em 12 de Novembro de 2015.

Browse, J. The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. **Phytochemistry**, v. 70, n. 13-14, p. 1539-1546, 2009.

Brzin, J.; Kidrič, M. Proteinases and Their Inhibitors in Plants: Role in Normal Growth and in Response to Various Stress Conditions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 421-468, 1996

Bueno, R. C. O. F.; Bueno, A. F.; Moscardi, F.; Parra, J.R.P.; Hoffmann-campo, C.B. Lepidopteran larvae consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-

species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science**, v. 67, p. 170-174, 2011.

Christeller, J. T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. **FEBS Journal**, v. 272, p. 5710-5722, 2005.

CISoja (Centro de Inteligência da Soja). Disponível em <<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=historico>>. Acessado em 11 de Novembro de 2015A.

CISoja (Centro de Inteligência da Soja). Disponível em <http://www.cisoja.com.br/index.php?p=aspectos_botanicos>. Acessado 11 em Novembro de 2015B.

Conab (Companhia Nacional de Abastecimento). Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>>>. Acessado em 11 de Novembro de 2015A.

Conab (Companhia Nacional de Abastecimento). Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_11_10_42_03_boletim_graos_setembro_2015.pdf>. Acessado em 12 de Novembro de 2015B.

Conway, T.; Tans, P. Globally averaged marine surface annual mean data. U.S. National Oceanic and Atmospheric Administration, Earth System Research Laboratory. Disponível em: <<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html>> Acesso em: 12 de Novembro. 2015.

Doss, B. D.; Pearson, R. W.; Roggers, H. T. Effect of soil water stress of various growth stages on soybeans yield. **Agronomy Journal**.v.66, p.297-9. 1974.

Dunse, K. M.; Stevens, J.A.; Laya, F.T.; Gasparb, Y. M.; Heath, R. L.; Anderson, M. A. Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. **PNAS**, v 107, n. 34, p.15011-15015, 2010A.

Dunse, K. M.; Q. Kaasc, Q.; Guarinoa, R. F.; Bartond, P. A.; D. J. Craik, D. J.; Anderson, M. A. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. **PNAS**, v. 107, n. 34, p. 15016-15021, 2010B.

Embrapa Meio Ambiente. **Mudanças Climáticas Globais e Agricultura**. Disponível em <<http://www.cnpma.embrapa.br/unidade/index.php3?id=242&func=unid>>. Acessado em: 12 Novembro 2015.

Embrapa Soja. **Tecnologia de Produção de Soja Paraná 2004**. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosojaPR/manejoi.htm>>. Acessado em 10 de outubro de 2015.

Erlanger, B. F.; Kokowsky, N.; Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271-278, 1961.

Farias, J. R. B.; Assad, E. D.; Almeida, I. R.; Evangelista, B. A.; Lazarotto, C.; Neumaier, N.; Nepomuceno, A. L. Caracterização de risco de déficit hídrico nas regiões produtoras de soja no Brasil. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.9, n.2, 2001.

Farias, J. R. B.; Nepomuceno, A.L.; Neumaier, N. Ecofisiologia da Soja. **Embrapa Soja. Circular Técnica 48**.p.1-9, 2007.

Farmer, E.E.; Ryan, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell**.v.4, p.129-134, 1992.

Fehr, W. R.; Caviness, C. E. **Stages on soybean development**. Ames: Iowa State University/Cooperative Extension Service, 1977. 11p. (Special Report, 80).

Feller, U. Proteolysis. **Plant Cell Death Processes**. p. 107-123, 2004.

Filippou, P.; Antoniou, C.; Fotopoulos, V. Effect of drought and rewatering on the cellular status and antioxidant response of *Medicago truncatula* plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 2, p. 270-277, 2011.

Fortunato, F.S., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Silva, C.H.O., Guedes, R.N.C., Moreira, M.A.M. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Journal of Pest Science**, v. 80, n. 4, p. 241-247, 2007.

Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; Batista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramin, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. **Manual de Entomologia Agrícola**, Piracicaba: FEALQ, 920p., 2002.

Gornall, J.; Betts, R.; Burke, E.; Clark, R.; Camp, J.; Willett, K.; Wiltshire, A. Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 365, p. 2973-2989, 2010.

Greene, G. L.; Leppla, N. C.; Dickerson, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **J. Econ. Entomol**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

Guimaraes, L. C.; Oliveira, C. F. R.; Marangoni, S.; Oliveira, D. G. L.; Macedo, M.L.R. Purification and characterization of a Kunitz inhibitor from *Poincianella pyramidalis* with insecticide activity against the Mediterranean flour moth. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v 118, p. 1-9, 2015.

Guimarães, L.M.P.; Pedrosa, E.M.R.; Coelho, R.S.B.; Chaves, A.; Maranhão, S.R.V.L.; Miranda, T.L. Efeito do metil jasmonato e silicato de potássio no parasitismo de *Meloidogyne incógnita* e *Pratylenchus zea* em cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**. v.32, n.1, p.50-55, 2008.

Hieng, B. Ugrinovi, K.; Šuštar-Vozli, J.; Kidri, M. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 5, p. 519–530, 2004.

Hirakuri, M. H.; Lazzarotto, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Documentos/Embrapa Soja**; n. 349, p. 70, 2014.

Hoffman-Campo, C. B.; Oliveira, E. B.; Moscardi, F. **Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, Documentos, 10, 1985. 23p.

Hoffmann-Campo C. B.; Harbone J. B.; Mcaffery A. R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia nigrowth*. **Entomol Exp Applic**, v.98, p.181-194, 2001.

Hoffmann-Campo C. B.; Ramos Neto J. A.; Oliveira M. C. N.; Oliveira L. J. (2006) Detrimental effect of rutina on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p.1453-1459, 2006.

Hoffmann-Campo, C. B; Moscardi, F; Corrêa-Ferreira, B. S; Oliveira, L. J; Sosa-Gómez, D. R; Panizzi, A. R; Corso, I. C; Gazzoni, D. L; Oliveira, E. B. *Pragas da soja no Brasil e seu Manejo Integrado*. Londrina: **Embrapa Soja**, 2000.

Holkova, I.; Bezakova, L.; Vanko, M.; Bilka, F.; Oblozinsky, M. Lipoxygenases and their significance in biochemical processes in plant organisms. v. 103 n. 6, p. 487-495, 2009.

Hummel, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin, **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 1393-1399, 1959.

INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=agrometeorologia/boletimAgroclimatologico>>. Acessado em 12 de Novembro de 2015A.

INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/climatologia/bol_agro/mapas.php>. Acessado em 12 de Novembro de 2015B.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). **Organization**. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/organization/organization.shtml>>. Acessado em: 10 de Novembro de 2015.

Jamal, F.; Pandey, P.K.; Singh, D.; Khan, M.Y. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. **Phytochem** Ver. Publicação online: 14 novembro 2012.

Jongsma, M.A.; Bolter, C. The adaptations of insects to plant proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**. v.43, p.885-895, 1997.

Joshi, R. S.; Gupta, V. S.; Giri, A. P. Differential antibiosis against *Helicoverpa armigera* exerted by distinct inhibitory repeat domains of *Capsicum annuum* proteinase inhibitors. **Phytochemistry**, v. 101, p. 16-22, 2014.

Kakade, M. L.; Rackis, J. J.; McGhee, J. E. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v. 51, p. 376-382, 1974.

Karnieli, A.; Nurit A.; Pinker, T. R.; Anderson, M.; Imhoff, M.L.; Gutman, G.G.; Panov, N.; Goldberg, A. Use of NDVI and Land Surface Temperature for Drought Assessment: Merits and Limitations. **Journal of Climate**, v. 23, p. 618-633, 2010.

Kidrič, M.; Sabotič, J.; Stevanović, B. Desiccation tolerance of the resurrection plant *Ramonda serbica* is associated with dehydration-dependent changes in levels of proteolytic activities. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 12, p. 998-1002, 2014.

Kogan, F.N.; Gitelson, A.; Zakarin, E.; Spivak, L.; Lebed, L. AVHRR-Based Spectral Vegetation Index for Quantitative Assessment of Vegetation State and Productivity: Calibration and Validation. **Photogrammetric Engineering & Remote Sensing**, v.69, p. 899-906, 2003.

Korte, L. L.; Williams, J. H.; Specht, J. E.; Sorensen, R. C. Irrigation of soybean genotypes during reproductive ontogeny I: agronomic responses. **Crop Science**. v. 23, n. 3, p. 521-527, 1983.

Kramer, D. M.; Johnson G.; Kiirats O.; Edwards, G. E. New Fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. **Photosynth Res**. v. 79, p. 209-218, 2004.

Kron, A. P.; Souza, G. M.; Ribeiro, R. V. Water deficiency at different developmental stages of Glycine max can improve drought tolerance. **Bragantia**.v.67, n.1, p.43- 49, 2008.

Kumar, P. K. P.; Sivanandham, M.; Karthick, J.; Priyadarshini, C. V. Protease-an important enzyme in detergent industry.**Everyman's Science**, v.49, n.4, p. 222-226, 2014.

Lobell, D. B.; Gourdji, S. M.The influence of climate change on global crop productivity.**Plant Physiol.**, v. 160, p. 1686-1697, 2012.

Macedo, M. L. R., Freire, M. G. M., Kubo, C. E. G., Parra, J R P. Bioinsecticidal activity of Talisia esculenta reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of Anticarsia gemmatalis. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 24–33, 2011A.

Macedo, M. L. R., Diz Filho, E. B.S., Freire, M. G. M., Oliva, M. L.V., Sumikawa, J.T., Toyama, M. H., Marangoni, S. A Trypsin Inhibitor from Sapindus saponaria L. Seeds: Purification, Characterization, and Activity Towards Pest Insect Digestive Enzyme. **The Protein Journal**, v. 30, n 1, p, 9-19.

Mack, A.J.; Peterman, T.K.; Siedow, J.N.; Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. *Current Topics in Biological Medical Research*. v.13, p.127-154, 1987.

Maehler, A. R.; Pires, J. L. F.; Costa, J. A.; Ferreira, F. G. Potencial de rendimento da soja durante a ontogenia em razão da irrigação e arranjo de plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**.v.38, p.225-231, 2003.

Martinez, M.; Diaz, I. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. **BMC evolutionary biology**, v. 8, p. 198, 2008

Mendonça, E.G., Oliveira, M.G.A., Visôto, L. V., Guedes, R.N., Ribeiro, F.R. Oliveira, J. Determinação da atividade enzimática e do número de bactérias associadas ao

intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, criada em diferentes dietas. **Revista Ceres**, v 56, n 1, p,18-24, 2009.

Mendonça, E. G.; Oliveira, M. G. A.; Visôto, L. E.; Guedes, R. N. C. Midgut cysteine-proteinase activity in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* (Hübner)), **Journal of Pest Science**, v. 85, p. 117-123, 2012.

Ministério da Agricultura. Safra de grãos 2014/2015 é estimada em 206,3 milhões de toneladas. Disponível em<<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2015/07/safra-de-graos-20142015-e-estimada-em-206-milhoes-de-toneladas> >. Acessado em 11 de Novembro de 2015A.

Ministério da Agricultura. Safra brasileira de grãos pode chegar a 213,5 milhões de t em 2015/2016 Disponível em<<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2015/11/soja-deve-representar-quase-metade-da-safra-brasileira-de-graos-20152016>>. Acessado em 11 de Novembro de 2015B.

Moreira, L. F.; Campos, W.G.; Ribeiro, F. R.; Guedes, R. N. C.; Oliveira, M. G. A. Survival and developmental impairment induced by the trypsin inhibitor bis-benzamidine in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*). **Crop Protection**, v. 30, n. 10, p. 1285-1290, 2011.

Moscardi, F.; de Souza, M.L. Baculovírus para o controle de pragas. **Biociência & Desenvolvimento**, n. 24, p. 22–29, 2002.

Nações Unidas no Brasil. Mudanças climáticas aumentam riscos globais de fome, inundações e conflitos, alerta IPCC. < <http://nacoesunidas.org/mudancas-climaticas-aumentam-riscos-globais-de-fome-inundacoes-e-conflitos-alerta-ipcc/> >. Acessado em 18 de Novembro de 2015.

Ohta, H.; Ida, S.; Mikami, B.; Morita, Y. Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination, **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 911-918, 1986.

Oliveira, M. G. A.; Simone, S. G.; Xavier, L. P.; Guedes, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 3, p. 369-380, 2005.

Osborne, T.; Rose, G.; Wheeler, T. Variation in the global-scale impacts of climate change on crop productivity due to climate model uncertainty and adaptation. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 170, p. 183–194, 2013

Paixao, G. P., Lourenção, A. L., Silva, C. R., Eduardo G. Mendonça, E. G., Silva, P. L., Oliveira, J.A., Zanuncio, J. C., Oliveira, M. G. A. Biochemical responses of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars sprayed with the protease inhibitor berenil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 34, p. 8034–8038, 2013.

Page, M. J.; Di Cera, E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, p. 1220-1236, 2008.

Peñuelas, J.; Sardans, J.; Estiarte, M.; Áogaya, R.; Carnicer, J.; Coll, M.; Barbeta, A.; Rivas-Ubach, A.; Lusià, J.; Garbulsky, M.; Filella, I.; Jump, A. S. Evidence of current impact of climate change on life: a walk from genes to the biosphere. **Glob.Chang.Biol.**, v. 19, p. 2303-2338, 2013.

Paul, M.J.; Foyer, C.H. Sink regulation of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**.v.52, p.1383-1400, 2001.

Parise, A. Safra 2013/2014 de soja fecha 5,6% maior que ciclo anterior: Crescimento é menor que o previsto devido a problemas climáticos e pragas, mas rentabilidade do produtor segue positiva. Disponível em: <<http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2014/05/safra-2013-14-de-soja-fecha-5-6-maior-que-ciclo-anterior-4492592.html>>. Acessado em 15 de Novembro de 2015.

Pereira, M. E., F.A. Dörr1, F. A., Peixoto, N. C., Lima-Garcia, J. F., Dörr, F., Brito, G. G. Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the

- trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 38, p. 1633–1641, 2005
- Pilon, A. M.; Oliveira, M. G. A.; Guedes, R. N. C. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 23-29, 2006.
- Pilon, A. M.; Oliveira, M. G. A.; Pilon, F. M.; Guedes, R. N. C.; Oliveira, J. A.; Fazollo, A. Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepdoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. **Revista Ceres**, v. 56, p. 744-748, 2009.
- Pimentel, C. Metabolismo de carbono de plantas cultivadas e o aumento de CO₂ e de O₃ atmosférico: situação e previsões. **Bragantia**, v. 70, n.1, p. 1-12, 2011.
- Piubelli, G. C.; Hoffmann-Campo, C. B.; Moscardi, F.; Miyakubo, S. H.; Oliveira, M. C. N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *A. gemmatalis*? **J Chem Ecol**, v. 31, p.1509-1524, 2005.
- Piubelli, G. C; Hoffmann – Campo, C. B; Arruda, I. C; Frachini, J. C; Lara, F. M. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect – feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, 2003.
- Pompermayer, P., Terra, W.R., Parra, J.R.P., Falco, M.C., Silva-Filho, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, suevival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomology Experimental and Applied**, v, 99, p, 79-85.
- Porter, P. M; Banwart, W. L; Hassett, J. J. Phenolic acids and flavonoids in soybean root and leaf extracts.**Environmental and Experimental Botany**, v. 26, n. 1, p. 65-73, 1986.
- Praça, L.B.; Silva-Neto, S.P.; Monnerat, R.G. *Anticarsia gemmatalis*/ Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae. Biologia, amostragem e métodos de controle. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, (Série Documento, 196), 2006.

Purcell, L. C., Specht, J. E. Physiological Traits for Ameliorating Drought Stress. **Soybeans: Improvement, Production, and Uses. Agronomy Monographs**, 3(ed), n, 16, p. 569 – 620.

Rawlings, N. D.; Tolle, D. P.; Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **The Biochemical journal**, v. 378, n. Pt 3, p. 705-716, 2004.

Rao, M.B.; Aparna, M.T.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Vol.62, p.597-635, p. 1998.

Rawlings, N. D. Peptidase inhibitors in the MEROPS database. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1463-1483, 2010.

Ryan, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 425–449, 1990.

Salinas, A. R.; Santos, D. S. B.; Santos, F. B. G.; Gomes, A. S.; Mello, V. D. C.; Zonta, E. P. Comportamiento de genotipos de soja, hasta el estadio de plantulas, en diferentes niveles de humedad. IN: Conferencia Mundial de Investigacion en soja, 4. 1989, Buenos Aires. **Actas**. Buenos Aires: AASOJA, p.376-382.1989.

Salvador, M. C.; Boiça Jr, A. L.; Oliveira, M. C. N.; Graça, J. P.; Silva, D. M.; Hoffmann-Campo, C. B. Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v.39, n.5, p.774-783, 2010.

Salvesen G, Nagase H. **Inhibition of proteolytic enzymes**. Beynon, RJ, Bond JS. (Eds) *Proteolytic enzymes a practical approach*. Oxford:IRL, p. 83-104, 1989

Schmidt, A., Ivanova, A., Schafer, M.S. Media attention for climate change around the world: A comparative analysis of newspaper coverage in 27 countries. **Global Environmental Change**, v 23, p. 1233-1248, 2013.

Scholander, P. F.; Hammel, H.T.; Bradstreet E. D.; Hemingsen, E. A. Sap pressure in vascular plants, **Science**, v. 148, p. 339-345, 1965.

Scott, I.M.; Thaler, J.S.; Scott, J.G. Response of a generalist herbivore Trichoplusiani to jasmonate-mediated induced defense in tomato. **Journal of Chemical Ecology**.v.36, p.490-499, 2010.

Shivaji, R.; Camas, A.; Ankala, A.; Engelberth, J.; Tumlinson, J.H.; Williams, W.P.; Wilkinson, J.R.; Luthe, D.S. Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in carterpillar-resistant maize. **Journal of Chemical Ecology**. v.36, p.179-191, 2010.

Silva-Filho, M.C.; Falco, M.C. Interação planta inseto- Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. **Biotecnologia-Ciência e Desenvolvimento**.v.12, p. 38-42, 2000.

Silvente, S., Sobolev, A. P., Lara, M. Metabolite Adjustments in Drought Tolerant and Sensitive Soybean Genotypes in Response to Water Stress. **Plos One**.v. 7, ed. 6, 2012.

Simova-Stoilova, L.; Vaseva, I.; Grigorova, B.; Demirevska, K.; Feller, U. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. **Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 48, n. 2-3, p. 200-206, 2010.

Sionit, N.; Kramer, J. P. Effect of water stress during different stages of growth of soybeans. **Agronomy Journal**. v.69, p.274-8, 1977.

Sosa-Gómez, D. R.; Corrêa-ferreira, B. S.; Hoffmann-campo, C. B.; Corso, I. C.; Oliveira, L.J.; Moscardi, F.; Panizzi, A.R.; Bueno, A. de F.; Hirose, E. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 89 p. (Embrapa Soja. Documentos, 269)A.

Sosa-Gómez, D. R.; Corrêa-ferreira, B. S.; Hoffmann-campo, C. B.; Corso, I. C.; Oliveira, L.J.; Moscardi, F.; Panizzi, A.R.; Bueno, A. de F.; Hirose, E. **Manual de**

identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja, 2014. (Ed) 3º, 89 p. (Embrapa Soja. Documentos, 269)B.

Specht, J. E.; Hume, D. J.; Kumudini, S. V.; 1999: Soybean yield potential – a genetic and physiological perspective. **Crop Science Society of America**, v. 39, n. 6, p.1560-1570, 1999.

Srinivasan, Giri, A.P.; Gupta, V.S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular e Molecular Biology Letters**, v.11, p.132-154, 2006.

Stamp, N. E.; Skrobola, C. M. Failure to avoid rutin diets results in altered food utilization and reduced growth rate of *Manduca sexta* larvae. **Entomol Exp Appl**, v.68, p.127-142, 1993.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. 4^{ed} Ed. Porto Alegre: Artmed. 819 p. 2009.

Terra, W R.; F, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1-62, 1994.

Terra, W.; Ferreira, C.; Baker, J.E. Digestive enzymes. In: Lehane, M.J.; Billingsley, P.F. (ed). *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, p. 206-235, 1996.

Tomarelli, R. M.; Charney, J.; Harding, M. L. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity, **Journal Laboratory Clinical Medical**, v. 34, p. 428-433, 1949.

Trautwein, Michelle D. . Wiegmann, B. M.; Beutel, R., Kjer; K. M.; Yeates, D. K. Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. **Annual review of entomology**, v. 57, p. 449-468, 2012.

Vaseva, I.; Sabotič, J.; Šustar-Vozlič, J.; Meglič, V.; Kidrič, M.; Demirevska, K.; Simova-Stoilova, L. **The response of plants to drought stress: the role of dehydrins, chaperones, proteases and protease inhibitors in maintaining cellular protein function** Neves, D.F.; Sanz, J.D. (Eds.), Droughts: New Research, Nova Science Publishers, Inc., New York, p. 1-45, 2012

Vassileva, V. K.; L, D.; Simova-Stoilova, T.; Petrova.; Tsenov, N.; Feller, U. Long-term field drought affects leaf protein pattern and chloroplast ultrastructure of winter wheat in a cultivar-specific manner. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 198, n. 2, p. 104–117, 2012.

Vianna, U.R.; Pratisoli, D.; Zanuncio, J.C.; Alencar, J.R.C.C. de; Zinger, F.D. Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (hymenoptera: trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (lepidoptera: noctuidae), **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo. v.78, n.1, p.81-87.

Vick, B.; Zimmerman, D.C. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: Stumpf, P. K. Conn, E. E. (Eds.). *The Biochemistry of Plants*. Orlando: **Academic Press**. v. 9, p.53-97, 1987.

Vierstra, R. D. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. **Plant molecular biology**, v. 32, n. 1-2, p. 275–302, 1996.

War, A. R.; Paulraj, M. G.; Hussain, B.; Buhroo, A. A.; Ignacimuthu, S.; Sharma, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

Wasternack, C.; Kombrink, E. Jasmonates: Structural Requirements for Lipid-Derived Signals Active in Plant Stress Responses and Development. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p.63-77.

Xavier, L.P.; Oliveira, M.G.A.; Guedes, R.N.C.; Santos, A.V.; De Simone, S.G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **European Journal of Biochemistry**.v.102, p.147-153, 2005.

Yan, L.; Zhai, Q.; Wei, J.; Li, S.; Wang, B.; Huang, T.; Du, M.; Sun, J.; Kang, L.; Li, C-B.; Li, C. Role of Tomato Lipoxigenase D in Wound-Induced Jasmonate Biosynthesis and Plant Immunity to Insect Herbivores. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 12, p.1-16, 2013.

Zhan, Q.; Zheng, S.; Feng, Q.; Liu, L. A midgut-specific chymotrypsin cDNA (Slctlp1) from *Spodoptera litura*: cloning, characterization, localization and expression analysis. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 76, n. 3, p. 130-143, 2011.

Zhu-Salzman, K., Luthe, D.S., Felton, G.W., Arthropod-inducible proteins, broad spectrum defenses against multiple herbivores. **Plant Physiology**.v.146, p.852-858, 2008.