

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESISTÊNCIA EM SOJA A *Spodoptera cosmioides*
(WALKER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) MEDIADA POR
COMPOSTOS SECUNDÁRIOS EXPRESSOS
CONSTITUTIVAMENTE OU INDUZIDOS POR HERBIVORIA**

Marcelo Mueller de Freitas

Engenheiro Agrônomo

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESISTÊNCIA EM SOJA A *Spodoptera cosmioides*
(WALKER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) MEDIADA POR
COMPOSTOS SECUNDÁRIOS EXPRESSOS
CONSTITUTIVAMENTE OU INDUZIDOS POR HERBIVORIA**

Marcelo Mueller de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Entomologia Agrícola).

2020

F866r

Freitas, Marcelo Mueller de

Resistência em soja a *Spodoptera cosmioides* (Walker)
(Lepidoptera: Noctuidae) mediada por compostos secundários
expressos constitutivamente ou induzidos por herbivoria / Marcelo
Mueller de Freitas. -- Jaboticabal, 2020

103 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Arlindo Leal Boiça Júnior

1. Glycine max. 2. Lagarta-das-vagens. 3. Metabólitos secundários.
4. Resistência constitutiva. 5. Resistência induzida. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RESISTÊNCIA EM SOJA À *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)
MEDIADA POR COMPOSTOS SECUNDÁRIOS EXPRESSOS CONSTITUTIVAMENTE
OU INDUZIDOS POR HERBIVORIA

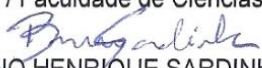
AUTOR: MARCELO MUELLER DE FREITAS

ORIENTADOR: ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR

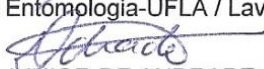
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA
(ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:



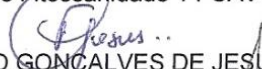
Prof. Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR
Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP



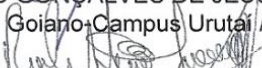
Prof. Dr. BRUNO HENRIQUE SARDINHA DE SOUZA
Departamento de Entomologia-UFLA / Lavras/SP



Prof. Dr. DANIEL JUNIOR DE ANDRADE
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FLÁVIO GONÇALVES DE JESUS
Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí / Urutaí/GO



Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 19 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARCELO MUELLER DE FREITAS – Natural de Araguari, MG, nascido em 26 de julho de 1991, filho Luiz Donizete de Freitas e Celina de Fátima Mueller de Freitas. Engenheiro Agrônomo graduado pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Câmpus Urutaí, GO, no ano de 2014. De 2011 a 2012, durante o curso de graduação desenvolveu atividades de pesquisa na área de concentração em Entomologia Agrícola, subárea Resistência de Plantas a Insetos, sendo bolsista de iniciação científica (PIVIC/IF Goiano), sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Gonçalves de Jesus. Entre agosto de 2012 e julho 2013 cursou graduação sanduíche pelo Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa – Portugal através do programa Ciência sem Fronteiras e, durante um ano, estagiou no Laboratório de Entomologia sob a orientação do Prof. Dr. José Carlos Franco. De 2013 a 2014 foi bolsista de iniciação científica (ITI – IC/CNPq) desenvolvendo trabalhos na área de Entomologia Agrícola. Em março de 2015, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola) pela Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal, SP, onde atuou com pesquisas em Resistência de Plantas a Insetos, sob a orientação do Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior, com bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. Em agosto de 2016, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia (Entomologia Agrícola) pela Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal, SP, onde atuou com pesquisas em resistência de plantas a insetos, sob a orientação do Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior, com bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Atualmente, realiza pós-doutorado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, em cooperação com o Conselho de Pesquisa em Biotecnologia e Biociências do Reino Unido – BBSRC, conduzido na UNESP/FCAV e “University of Stirling”, Escócia, na linha de pesquisa de controle microbiano de pragas.

“Whether you think you can, or you think you can’t – you are right!”

Henry Ford

DEDICO...

Ao meu pai **Luiz Donizete de Freitas**
e minha mãe **Celina Mueller de
Freitas**, pela educação exemplar que
recebi, pelo amor incondicional, e por
todo o incentivo para chegar até aqui.

OFEREÇO...

À minha companheira **Paulini Vieira
Mundim Luciano**, por todo amor,
carinho, mensagens de incentivo,
e apoio em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha fonte de inspiração e sabedoria.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP/FCAV, por toda estrutura fornecida para a condução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Entomologia Agrícola, pela oportunidade de realização do doutorado e sólida formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado (Processos: 142324/2016-7 e 142509/2019-1).

Ao Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior, pela oportunidade, valiosa orientação, enorme contribuição para minha formação e amizade.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Entomologia Agrícola, pelos conhecimentos transmitidos e enorme dedicação para a melhor formação de seus alunos.

Aos Professores Dr. Raphael de Campos Castilho e Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, pela participação e colaboração em meu Exame Geral de Qualificação.

Ao Programa de Melhoramento Genético de Soja da Universidade Federal de Uberlândia, pelo fornecimento de sementes de genótipos comerciais de soja utilizadas neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos LARPI - UNESP/FCAV, Prof. Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza, Dr. Eduardo Neves Costa, Eng. Agr^a. Franciele Cristina da Silva, Me. Lucas Adjuto Ulhoa, Dr. Luciano Nogueira, Dra. Mirella Marconato Di Bello, Me. Paulo Henrique Soares Barcelos, Dr. Renato Franco de Oliveira Moraes, Ma. Sandy Sousa Fonseca, Ma. Stéfane Carolina Quista da Silva Faria e Ma. Thaise Mylena Pascutti, pela amizade, discussões sobre assuntos relacionados à Entomologia e Resistência de Plantas.

Ao professor Dr. Moacir Rossi Forim e sua orientada, Ma. Maria Clara Santana Aguiar, pela realização das análises químicas de metabólitos secundários e suporte na interpretação e revisão destes dados.

Ao amigo, Dr. Carlos Alessandro de Freitas, pela fundamental colaboração em todas as etapas deste trabalho, contribuindo diretamente para os valiosos resultados encontrados. Agradeço também, pelo convívio agradável, conselhos valiosos, suporte em momentos de dificuldade, parceria e amizade sincera, que tornaram esta caminhada mais fácil.

Aos amigos, Dr. Wellington Ivo Eduardo e Dr. Zulene Antônio Ribeiro, pelo auxílio em todos os momentos necessários, convívio, conselhos e, principalmente pela grande amizade construída ao longo destes anos.

Ao meu orientador de graduação, Prof. Dr. Flávio Gonçalves de Jesus, pela amizade, incentivo ao iniciar os trabalhos de pesquisa na área de Entomologia e Resistência de Plantas, pelos ensinamentos valiosos e exemplo de pessoa e profissional que sempre me espelhei.

À minha companheira, Paulini Vieira Mundim Luciano, por todo o amor, compreensão, incentivo, paciência, companheirismo, apesar de todos os momentos difíceis e a distância, sempre esteve presente e apoiou todas as minhas decisões.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da UNESP/FCAV, pela convivência e participação junto às disciplinas e cursos realizados.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	3
2.1. A cultura da soja.....	3
2.2. Aspectos bioecológicos de <i>Spodoptera cosmioides</i>	7
2.3. Resistência constitutiva e induzida de plantas a insetos-praga.....	9
2.4. Resistencia de soja a insetos-praga.....	10
2.5. Mecanismos químicos de defesa de plantas a insetos.....	12
2.6. A metabolômica como ferramenta em resistência de plantas	15
3. Referências.....	17
CAPÍTULO 2 - Caracterização de perfis metabólicos e resistência constitutiva em genótipos de soja a <i>Spodoptera cosmioides</i> (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)	28
1. Introdução.....	30
2. Material e Métodos	32
2.1. Condições experimentais	32
2.2. Insetos.....	32
2.3. Plantas	32
2.4. Preferência alimentar de <i>Spodoptera cosmioides</i>	34
2.5. Índices nutricionais de <i>Spodoptera cosmioides</i>	34
2.6. Análise de metabólitos secundários em soja.....	36
2.7. Análise de dados	38
3. Resultados.....	39
3.1. Preferência alimentar de <i>Spodoptera cosmioides</i>	39
1.1. Índices nutricionais de <i>Spodoptera cosmioides</i>	45

1.2. Análise de metabólitos secundários em soja.....	47
2. Discussão	50
4. Referências.....	55
CAPÍTULO 3 - Alterações de perfis metabólicos em genótipos de soja revelam a ação de compostos secundários mediando resistência constitutiva e induzida a <i>Spodoptera cosmioides</i>	
1. Introdução	62
2. Material e métodos	64
2.1. Insetos.....	64
2.2. Plantas	64
2.3. Condições experimentais	65
2.4. Herbivoria prévia em plantas de soja	66
2.5. Preferência alimentar de <i>Spodoptera cosmioides</i>	67
2.6. Parâmetros biológicos/nutricionais de <i>Spodoptera cosmioides</i>	68
2.7. Análise de metabólitos secundários em soja.....	69
2.8. Análise de dados	71
3. Resultados.....	72
3.1. Preferência alimentar de <i>Spodoptera cosmioides</i>	73
3.2. Parâmetros biológicos/nutricionais de <i>Spodoptera cosmioides</i>	76
3.3. Análise de metabólitos secundários em plantas de soja	81
4. Discussão	87
5. Referências.....	95
CAPÍTULO 4 – Considerações finais	
	101

RESISTÊNCIA EM SOJA A *Spodoptera cosmioides* (WALKER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) MEDIADA POR COMPOSTOS SECUNDÁRIOS EXPRESSOS CONSTITUTIVAMENTE OU INDUZIDOS POR HERBIVORIA

RESUMO – O manejo de pragas na cultura da soja tem sido realizado principalmente através de plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) e inseticidas químicos. Entretanto, estes métodos de controle não têm apresentado controle satisfatório, uma vez que a soja Bt cultivada no Brasil não possui especificidade para *S. cosmioides*. Embora alguns eventos Bt contendo outras proteínas tenham sido aprovados para cultivo, a maioria destas proteínas também são expressas em algodão Bt e a exposição contínua pode aumentar a seleção de indivíduos resistentes. O controle químico tem sido considerado ineficiente devido às características bioecológicas de espécies deste gênero, e o número reduzido de ingredientes ativos registrados para o controle de *S. cosmioides* na cultura da soja, o que também eleva os riscos de evolução de resistência. Assim, o uso de genótipos com características de resistência torna-se uma alternativa promissora, uma vez que as plantas possuem sofisticados mecanismos morfológicos e bioquímicos de defesa contra herbívoros. Portanto, foram avaliados oito genótipos comerciais de soja quanto à resistência constitutiva e induzida por herbivoria a *S. cosmioides* em dois estudos distintos em que metodologias específicas foram utilizadas para avaliar ambos os modos de expressão. No primeiro estudo, a resistência constitutiva de plantas em estágio reprodutivo R1-R2 dos genótipos foi avaliada através de testes de preferência alimentar com e sem chance de escolha e desenvolvimento biológico por meio dos índices nutricionais de *S. cosmioides*. O segundo estudo avaliou a resistência induzida por herbivoria prévia em plantas em estágio vegetativo V3 dos genótipos no comportamento e desenvolvimento de lagartas conspecíficas, conforme descrito no primeiro estudo. Em ambos os estudos, foram realizadas análises químicas dos metabólitos secundários expressos nas plantas, que foram comparados aos resultados dos bioensaios. Diferenças significativas no perfil metabólico destes genótipos e efeito negativo no comportamento alimentar e desenvolvimento de *S. cosmioides* revelaram que diversos compostos secundários estão envolvidos na expressão de ambos os tipos de resistência. De acordo com os resultados do primeiro estudo, alguns genótipos de soja, como UFUS Carajás, UFUS Xavante e UFUS Milionária, apresentaram resistência constitutiva a *S. cosmioides*. Por outro lado, os resultados do segundo estudo demonstraram que alguns genótipos expressaram resistência induzida, em que destacaram-se UFUS Xavante e UFUS Milionária por expressarem altos níveis de resistência após a herbivoria e afetarem significativamente o comportamento e desenvolvimento das lagartas. Este trabalho fornece resultados interessantes quanto aos diferentes modos de expressão de resistência, a correlação entre eles e a importância da metabolômica em estudos que avaliaram resistência de plantas a insetos e sugere como trabalhos futuros poderão complementar os resultados já encontrados, além de ser discutido como estas características podem ser efetivamente utilizadas no manejo de *S. cosmioides* na cultura da soja.

Palavras-chave: *Glycine max*, lagarta-das-vagens, metabólitos secundários, metabolômica, resistência constitutiva, resistência induzida

**CONSTITUTIVE AND HERBIVORY-INDUCED RESISTANCE IN SOYBEAN TO
Spodoptera cosmioides (WALKER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) MEDIATED
BY SECONDARY COMPOUNDS**

ABSTRACT – Pest management in soybean has been mainly done through genetically modified plants expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticidal proteins and chemical insecticides. However, these control methods have not shown satisfactory control, as Bt soybean grown in Brazil has no specificity for *S. cosmioides*. Although some Bt events containing other proteins are being approved, most of them are either expressed or will be expressed in Bt cotton and continuous exposure increases the selection pressure of resistant individuals. The chemical control has been considered inefficient due to the bioecological characteristics of species of this genus, and the reduced number of active ingredients registered for the control of *S. cosmioides* in soybean crop, which also increases the risk of resistance evolution. Thus, the use of genotypes with resistance characteristics becomes a promising alternative, as plants have sophisticated morphological and biochemical defense mechanisms against herbivores. Therefore, eight commercial soybean genotypes were evaluated for constitutive and herbivory-induced resistance to *S. cosmioides* in two separate studies in which specific methodologies were used to evaluate both modes of expression. In the first study, the constitutive resistance of the soybean plants at reproductive stage R1-R2 was evaluated by feed preference with choice and no-choice tests and biological development through the nutritional indexes of *S. cosmioides*. The second study evaluated the resistance induced by previous herbivory in plants at vegetative stage V3 on the behavior and development of conspecific larvae, as described in the first study. In both studies, chemical analyzes of the secondary metabolites expressed in plants were performed and compared to the results of the bioassays. Significant differences in the metabolic profile of these genotypes and negative effects on feeding behavior and development of *S. cosmioides* revealed that several secondary compounds are involved in the expression of both types of resistance. According to the results of the first study, some soybean genotypes, such as UFUS Carajás, UFUS Xavante and UFUS Millionária, showed constitutive resistance to *S. cosmioides*. On the other hand, the results of the second study showed that some genotypes expressed induced resistance, especially UFUS Xavante and UFUS Millionaire genotypes that expressed high levels of resistance after herbivory, significantly affecting the behavior and development of larvae. This study provides interesting results regarding the different modes of resistance expression, the correlation between them and the importance of metabolomics in studies evaluating plant resistance to insects and suggests how future work may complement these results, and discuss how these characteristics may effectively be used for the management of *S. cosmioides* in soybean.

Keywords: Black armyworm, constitutive resistance, *Glycine max*, induced resistance, metabolomics, secondary metabolites

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

A coexistência entre plantas e artrópodes em interações contínuas ao longo de 400 milhões de anos de evolução levou à seleção natural de plantas com sofisticados mecanismos de defesa contra herbívoros (Martinez, 2012; Santamaria et al., 2013; Aljbory e Chen, 2016) que representam mais de 50% de cerca de um milhão de espécies de insetos conhecidos no mundo (Ortego, 2012). Em contraste, a domesticação envolvendo a seleção artificial de mais de 2500 espécies de plantas de interesse econômico em todo o mundo possibilitou a inserção de características desejáveis, como aumento de produtividade e qualidade do produto cultivado (Meyer et al., 2012; Mitchell et al., 2016). Embora o melhoramento genético tenha alcançado com sucesso altos níveis de produtividade nas grandes culturas, a baixa variabilidade genética tem limitado a capacidade destas variedades em se adaptarem aos fatores bióticos e abióticos, como os mecanismos naturais de defesa contra o ataque de insetos-praga Chen et al. (2015).

Assim, apesar da evolução na agricultura de uma forma geral, com aumento no potencial produtivo das culturas ao longo dos anos, as perdas decorrentes da combinação de ocorrência de pragas, doenças e plantas daninhas devido à ausência de características intrínsecas de resistência de plantas domesticadas podem ser acima de 40% (Oerke e Dehne, 2004), sendo os herbívoros, responsáveis por cerca 14 % das perdas (Oerke, 2006). Para reduzir as perdas causadas por insetos-praga, o uso de inseticidas sintéticos, alguns deles com amplo espectro de ação, tem sido a principal tática adotada pelos agricultores nas principais culturas (Pimentel e Burgess, 2014; Parisi et al., 2016).

Tem sido observado maior ocorrência de efeitos adversos sobre organismos não alvo, a presença de resíduos em alimentos, o ressurgimento de pragas anteriormente consideradas ocasionais devido ao desequilíbrio ecológico, a evolução da resistência de espécies-praga e a poluição ambiental decorrentes do uso intensivo e muitas vezes inadequado destes inseticidas (Sharma, 2008; Savary et al., 2019).

Entre as principais culturas de interesse econômico, a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] destaca-se como um dos mais importantes vegetais cultivados em todo o mundo (Hartman et al., 2011). Comercializada internacionalmente em larga escala, esta cultura corresponde à maior área colhida entre as demais “commodities”, sendo o Brasil, o segundo maior produtor desta leguminosa, atrás apenas dos Estados Unidos, e somado aos cinco maiores produtores representam mais de 90% da produção mundial de soja (USDA, 2019).

Na cultura da soja, o uso de plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas com ação inseticida de *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner tem sido uma tática alternativa ao controle químico para o manejo de pragas em diversos países (Parisi et al., 2016). No Brasil, a soja transgênica que expressa a proteína Cry1Ac de Bt (evento MON87701 X MON89788), aprovada para o cultivo em 2010 (CTNBio, 2010), teve rápida adoção pelos sojicultores (Capalbo e Suzuki, 2017) devido ao desempenho eficaz no manejo da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ), e lagarta-falsa-medideira *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidæ) (Bernardi et al., 2016), espécies consideradas pragas-chave da cultura no Brasil.

Embora seja efetiva para estas espécies, a proteína Cry1Ac não desempenha controle satisfatório em espécies do gênero *Spodoptera*, incluindo *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidæ) (Bernardi et al., 2014). Além disso, devido à redução no uso de inseticidas que antes eram utilizados para o controle das pragas primárias, reduções nas competições interespecíficas (Qaim, 2009), e baixa eficiência de controle da tecnologia Bt sobre estas pragas (Bernardi et al., 2014). Assim, as espécies do gênero *Spodoptera* antes consideradas pragas secundárias da cultura, têm assumido grande importância em soja Bt no Brasil.

O controle das espécies de *Spodoptera* tem sido realizado principalmente através inseticidas sintéticos; no entanto, há apenas um ingrediente ativo registrado no Brasil para o controle desta praga na cultura da soja (MAPA, 2019). Adicionalmente, a levada frequência de casos de resistência para espécies deste gênero (Diez-Rodriguez e Omoto, 2001; Huang e Han, 2007; Carvalho et al., 2013; Su e Sun, 2014; Saleem et al., 2016) sugere que tolerância natural das espécies pode

favorecer a evolução de populações resistentes às moléculas inseticidas (Alyokhin e Chen, 2017).

Além disso, devido à característica polífaga de *S. cosmioides*, uma ampla gama de hospedeiros entre culturas de interesse econômico e plantas daninhas (Bavaresco et al., 2004; Michereff-Filho et al., 2008; Santos et al., 2010) contribuem para o aumento da importância desta praga em áreas de cultivo de soja no Brasil (Bueno et al., 2010b).

Portanto, a baixa eficiência dos principais métodos de controle utilizados atualmente contra *S. cosmioides* ressalta a necessidade de abordagens alternativas e sustentáveis que atuem de forma integrada às táticas já empregadas, contribuam para a manutenção das populações abaixo do nível de dano econômico da cultura e minimizem as perdas ocasionadas por *S. cosmioides*. Assim, o uso de genótipos que expressam características de resistência torna-se uma alternativa promissora, uma vez que contribuem diretamente para a redução das populações de insetos, e podem ainda, agir de forma sinérgica a outras táticas de controle.

Assim, trabalhos direcionados para o estudo de fontes de resistência de genótipos de soja a *S. cosmioides* podem se tornar métodos alternativos aos utilizados atualmente, contribuindo para o manejo desta importante praga na cultura da soja. Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar potenciais características de resistência constitutiva e induzida por herbivoria prévia a *S. cosmioides* em genótipos comerciais de soja em diferentes estágios de desenvolvimento e caracterizar e correlacionar os perfis metabólicos com os efeitos no comportamento e desenvolvimento biológico de lagartas de 3º ínstar de *S. cosmioides*.

2. Revisão de Literatura

2.1. A cultura da soja

A soja pertence à classe das plantas dicotiledôneas, família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* (L.) Merrill. O seu sistema radicular é do tipo pivotante, com ramificações e presença de nódulos como consequência do mutualismo entre a planta e bactérias fixadoras de nitrogênio

presentes no solo (Müller, 1981; Kumudini, 2010). A soja é uma planta autógama, herbácea, anual, com caule ereto e porte variável de 0,60 m a 1,50 m. É bastante ramificada, com os ramos inferiores mais alongados e todos os ramos com formação ângulos variáveis com o caule principal (Sediyama, 1996; Missão, 2006).

A planta possui quatro diferentes estruturas foliares: folhas cotiledonares, folhas primárias (unifolioladas), folhas trifolioladas e profilos. O par de folhas de sementes é arranjado de maneira oposta e ocorre primeiro na planta. A seguir, um par de folhas primárias (unifolioladas), ovais e opostas. O nó refere-se à parte do caule onde as folhas se ligam. Os dois primeiros tipos de folhas ocorrem nos dois primeiros nós. Todos os nós subsequentes têm as folhas trifolioladas dispostas alternadamente (Kumudini, 2010). Estas folhas são alternadas, longas, pecioladas, compostas de três folíolos ovalados ou lanceolados, de comprimento variável entre 0,5 e 12,5 cm. Na maioria dos genótipos, as folhas amarelecem à medida que os frutos amadurecem, e caem quando as vagens estão maduras (Müller, 1981; Gomes, 1986; Missão, 2006). Os profiliados são o quarto tipo de folha e ocorrem como pequenos pares de folhas simples, encontradas na base dos ramos laterais e na parte inferior do pedúnculo de cada flor (Kumudini, 2010).

As flores são dispostas em racínios axilares e terminais, geralmente com 9 a 10 flores, de coloração variada; dependendo do genótipo podem ser amarelas, brancas ou violetas (Müller, 1981; Gomes, 1986; Missão, 2006). Os frutos são vagens achatadas, pubescentes, deiscentes, de cor cinza, amarelo-palha ou preta, dependendo do genótipo. Apresentam duas a cinco sementes, sendo possível encontrar até 400 vagens por planta. Estas possuem formato liso, ovoide, globoso ou elíptico, com hilo pequeno (Bergamin et al., 1999; Missão, 2006).

O ciclo total compreende a fase vegetativa, que é o período da emergência da plântula até a abertura das primeiras flores, e a fase reprodutiva, denominada como o período do início da floração até a maturidade, com duração média de 75 a 200 dias, influenciado pelas condições ambientais da região e do genótipo utilizado (Müller, 1981; Farias et al., 2007; Borém e Miranda, 2009). Fehr e Caviness (1977) desenvolveram um sistema de classificação em que os estádios vegetativos são denominados com a letra "V", e estádios reprodutivos com a letra "R". A fase inicial da planta é definida pelos estádios "VE" (emergência) e "VC" (folhas cotiledonares).

Todos os estágios vegetativos após VE e VC são designados como Vn, onde n é determinado pela contagem do número de nós no caule principal, com início dos nós unifoliolados que têm ou tiveram uma folha completamente desenvolvida. Uma folha é considerada completamente desenvolvida quando a folha no nó diretamente acima dela se expandiu o suficiente para que as bordas dos folíolos não se toquem mais (Kumudini, 2010).

A fase reprodutiva inicia-se com o estágio “R1” caracterizado pela ocorrência da primeira flor aberta no caule principal e os estágios reprodutivos subsequentes são categorizados com base no florescimento, desenvolvimento de vagens, desenvolvimento de sementes e estágios de maturação das plantas. Os dois primeiros estágios (R1 e R2) referem-se aos estágios de floração. Os próximos dois estágios – (R3 e R4) referem-se ao desenvolvimento de vagens. O desenvolvimento das sementes começa quando as vagens se aproximam do seu máximo desenvolvimento. Os estágios R5 e R6 referem-se às fases de desenvolvimento das sementes, enquanto os estágios R7 e R8 referem-se às fases de maturação das plantas (Kumudini, 2010).

A soja constitui uma das maiores fontes de óleo vegetal e proteína para alimentação animal no mundo, destaca-se pelo maior teor proteico (~40%) entre os vegetais cultivados para alimentação e o segundo maior teor oleico (~20%) entre as leguminosas (Robert, 1986; Sugiyama et al., 2015; Silva et al., 2017b). Além disso, a soja tem sido utilizada na aquicultura, produção de biocombustível, como fonte de proteína para alimentação humana e diversas outras aplicações industriais e farmacêuticas (Masuda e Goldsmith, 2009; Singh, 2010).

Cultivada mundialmente, a soja é muito diferente dos ancestrais que lhe deram origem; espécies de plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do Rio Amarelo, na China. Sua evolução iniciou-se com o aparecimento de plantas originadas de cruzamentos naturais, entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China. Sua importância na dieta alimentar da antiga civilização chinesa era tal que a soja, juntamente com o trigo, o arroz, o centeio e o milheto, era considerada um grão sagrado, com direito a cerimônias ritualísticas na época da semeadura e da colheita (Farias et al., 2007; Singh, 2010). Apesar de conhecida e explorada no Oriente há

mais de 5.000 anos, seu cultivo foi ignorado até a segunda década do século XX, quando os Estados Unidos iniciaram sua exploração comercial (Embrapa, 2004; Singh, 2010).

No Brasil, a soja foi introduzida na Bahia em 1882, onde fracassou comercialmente. Seu insucesso deveu-se ao fato de a soja, então cultivada pelo mundo, ser adaptada a climas temperados ou subtropicais, predominantes em latitudes próximas ou superiores a 30°. A região onde a soja foi cultivada na Bahia caracteriza-se por apresentar clima tropical e baixa latitude (12°S). Por essa razão, a cultura obteve êxito no Brasil aproximadamente 60 anos após a introdução, quando foi cultivada pela primeira vez, em condições de clima subtropical, no estado do Rio Grande do Sul (RS), cuja latitude varia entre 27° e 34°S (Embrapa, 2004, 2005).

Assim como ocorreu nos Estados Unidos durante os anos de 1920 a 1940, o objetivo de estudo dos primeiros genótipos de soja introduzidas no RS era avaliar o seu desempenho como plantas forrageiras, e não para produção de grãos (Gazzoni e Dall'agnol, 2018). Neste período, a soja era cultivada prioritariamente para produzir feno para bovinos de leite. Os poucos grãos produzidos eram usados internamente nas propriedades para alimentação animal, visto que o comércio dos grãos era precário (Dall'agnol, 2016; Gazzoni e Dall'agnol, 2018). A partir de 1941, a leguminosa se destacou economicamente quando atingiu uma produção de 450 toneladas em uma área cultivada de 640 hectares, com produtividade de 700 kg ha⁻¹ (Embrapa, 2004, 2005; Dall'agnol, 2016).

Entretanto, apenas durante as décadas de 1960/1970 a soja se tornou economicamente importante para o Brasil, uma vez que foi beneficiada com a política de incentivos fiscais à triticultura no país nessa época. Assim, cultivava-se nas mesmas áreas, trigo no inverno e soja durante o verão com mesma mão de obra e maquinário (Embrapa, 2004, 2005).

A cultura da soja representa a maior área cultivada entre os produtos agrícolas no Brasil, mais de 35 milhões de hectares, com produção média de 117 milhões de toneladas na safra 2018/19, equivalente a mais de 55% do total da produção nacional de grãos e 35% da produção mundial de soja. Essa produção confere ao Brasil a condição de segundo maior produtor mundial da leguminosa (Conab, 2019; USDA, 2019).

Um dos principais fatores que impactam negativamente a produção desta cultura é o ataque de artrópodes-praga, que pode ocorrer em todo o ciclo de cultivo da soja. Dos insetos que causam desfolha, os lepidópteros compreendem um dos grupos de pragas mais importantes, e a ocorrência de lagartas do gênero *Spodoptera*, como a espécie de *S. cosmioides*, tem aumentado na cultura da soja e causado reduções significativas na produtividade (Bueno et al., 2010a; Silva et al., 2017a; Piovesan et al., 2019).

2.2. Aspectos bioecológicos de *Spodoptera cosmioides*

A espécie *S. cosmioides*, conhecida popularmente como lagarta-das-vagens, é nativa da América do Sul e relatada em diversas regiões do continente, com exceção do sul da Argentina, Chile e regiões do Peru situadas a oeste dos Andes (Silvain e Lalanne-Cassou, 1997). Originalmente descrita no gênero *Prodenia* Guenée, 1852, *S. cosmioides* foi considerada sinônimo de *Spodoptera latifascia* (Walker, 1856) até o ano de 1997, período em que estudos sobre a morfologia da genitália, feromônios e DNA mitocondrial de um complexo de espécies neotropicais do gênero revalidaram a identidade específica de *S. cosmioides* (Silvain e Lalanne-Cassou, 1997).

A ocorrência de *S. cosmioides* no Brasil tem sido relatada desde a década de 1980 e, devido ao hábito polífago, alimenta-se de diversas plantas nativas e cultivadas. Entre as plantas de interesse econômico hospedeiras desta espécie, estão o amendoim, batata-doce, girassol, palma-forrageira, soja e algodão. Além das culturas mencionadas, ataques de *S. cosmioides* também já foram observados em abacaxizeiro, alfafa, arroz, aspargo, aveia, batata, berinjela, beterraba, cafeeiro, cebola, couve-nabo, ervilha, eucalipto, feijão, feijão-caupi, fumo, fumo-cheiroso, gerânio, linho, macieira, mamona, mangueira, milho, pimentão, tomate e trigo (Gallo et al., 2002; Bavaresco et al., 2003; Zenker et al., 2007; Silva et al., 2011; Silvie et al., 2013)

Os adultos de *S. cosmioides* são mariposas de hábito noturno, com envergadura média de 40 mm, e asas membranosas cobertas por escamas, sendo as posteriores brancas e as anteriores pardas (mais amareladas nos machos), com desenhos em mosaico (Bavaresco et al., 2002; Gallo et al., 2002; Bavaresco et al.,

2003; Zenker et al., 2007). Há dimorfismo sexual entre os adultos: o macho difere da fêmea pela presença de uma mancha clara na asa anterior entre as linhas antimedial e pós-medial e abaixo da nervura mediana. A longevidade média dos adultos varia de 11 a 13 dias na faixa de temperatura entre 26 e 28°C (Santos et al., 1980; Habib et al., 1982). As fêmeas ovipositam nas folhas do terço inferior das plantas, em camadas de ovos sobrepostas, o quais têm coloração inicialmente amarronzada. As massas de ovos são irregulares, e uma fêmea pode depositar até 500 ovos por dia em condições favoráveis. O período de incubação dos ovos é de aproximadamente três a quatro dias, em uma faixa de temperatura entre 25 e 28°C (Bavaresco et al., 2003; Bavaresco et al., 2004).

Lagartas recém-eclodidas apresentam coloração marrom clara e cabeça preta. Com o passar dos ínstaes, as lagartas passam a apresentar tonalidade parda a negro-acinzentada, com três listras longitudinais predominantemente alaranjadas, sendo uma dorsal e duas laterais, com pontos brancos. Acima dos pontos brancos estão presentes triângulos pretos direcionados para o dorso do inseto. Ao atingirem o último ínstar, as lagartas tornam-se pardas, com uma faixa mais escura entre o terceiro par de pernas torácicas e o primeiro par de falsas-pernas abdominais, além de outras duas faixas na extremidade do abdome. Lagartas desenvolvidas atingem 40 a 48 mm de comprimento, e geralmente passam por seis ínstaes; no entanto, isso pode variar entre quatro e oito dependendo da planta hospedeira (Bavaresco et al., 2002; Bavaresco et al., 2003; Bavaresco et al., 2004; Zenker et al., 2007). A duração da fase larval é em média de 15 a 19 dias, em uma faixa de temperatura de 25 e 28°C (Bavaresco et al., 2002). Posteriormente, as lagartas se transformam em pupas, próximo à superfície do solo, permanecendo nessa fase por 14 a 18 dias (Bavaresco et al., 2004), quando emergem os adultos.

No Brasil a espécie *S. cosmioides* atingiu o “status” de praga-chave em soja a partir do início do cultivo em larga escala da soja geneticamente modificada que expressa a proteína Cry1Ac de Bt (evento MON87701 X MON89788) (CTNBio, 2010), uma vez que esta espécie apresenta baixa suscetibilidade à esta proteína Bt (Bernardi et al., 2014). Além disso, a redução no uso de inseticidas para o controle de pragas primárias, e menor competição interespecífica (Qaim, 2009) em razão do uso de

plantas Bt, são fatores que contribuíram para a ocorrência frequente de *S. cosmioides* em soja.

Além das folhas, *S. cosmioides* também causam injúrias às vagens de soja, assumindo importância significativa devido aos danos diretos no produto final (Santos et al., 2005; Bueno et al., 2011; Moscardi et al., 2012; Panizzi et al., 2012). Além disso, essa espécie se destaca entre as demais do gênero *Spodoptera* devido a sua voracidade durante a fase larval, por consumir aproximadamente o dobro de área foliar em comparação às outras espécies de lepidópteros de importância econômica para a cultura da soja no Brasil (Moscardi et al., 2012).

2.3. Resistência constitutiva e induzida de plantas a insetos-praga

Ao longo de milhares de anos, as plantas desenvolveram estratégias de defesa herdadas geneticamente que as permitiram minimizar os danos em seu desenvolvimento causados pelo ataque de herbívoros. Tais estratégias envolvem a expressão de características físicas/morfológicas e bioquímicas, que podem agir de forma independente ou em combinação e permitem às plantas se defenderem contra herbívoros, evitá-los ou tolerá-los. Estas características são denominadas mecanismos de resistência, e podem agir diretamente ou indiretamente contra os insetos (Boiça Júnior et al., 2019).

A ação direta destes mecanismos de defesa pode afetar adversamente (i) o comportamento, levar à aceitação tardia e possível rejeição do herbívoro durante a seleção do hospedeiro; ou (ii) o seu desenvolvimento ao se alimentar da planta. A estratégia de defesa direta também pode ser expressa através de mecanismos que permitem à planta suportar ou recuperar-se de injúrias causadas por herbívoros e apresentar produtividade semelhante à de plantas não atacadas, dispostas em situações de igualdade, sem qualquer efeito sobre os herbívoros (Boiça Júnior et al., 2018). Por outro lado, plantas que expressam resistência indireta não afetam o comportamento e desenvolvimento do herbívoro, mas promovem a efetividade de inimigos naturais através do fornecimento de abrigo, produção de compostos voláteis que os orientam até suas presas, e nectários extraflorais que são usados como alimento alternativo por estes inimigos naturais (Schaller, 2008).

Os mecanismos de defesa podem ser expressos continuamente pelas plantas, independentemente de estímulos extrínsecos e caracteriza a resistência constitutiva. As plantas, entretanto, têm a capacidade de expressar estas defesas ou expressá-las com maior intensidade em resposta à estímulos de origem biótica e abiótica, como o ataque de herbívoros e, portanto, é denominada resistência induzida (Boiça Júnior et al., 2019).

Assim, uma planta é considerada resistente quando expressa características fenotípicas codificadas por genes específicos em seu genoma, que implicam em menor injúria e, por consequência, menor dano por uma ou mais espécies de herbívoros em comparação a outras plantas submetidas às mesmas condições (Boiça Júnior et al., 2017b). Portanto, a resistência de plantas a artrópodes deve ser sempre medida em uma escala relativa, e o nível de resistência deve ser utilizado como base de comparação com plantas suscetíveis, as quais são severamente danificadas ou mortas sob condições experimentais semelhantes, além de plantas com níveis conhecidos de resistência (Smith, 2005).

A resistência de plantas possui diversas vantagens, como a redução e manutenção de populações de insetos-praga abaixo do nível de dano econômico, redução do custo de produção associado à aplicação de inseticidas e nos riscos de desequilíbrios no agroecossistema, persistência de controle em baixas populações da praga, além de possibilitar na maioria das vezes sua utilização harmoniosa com outras táticas de controle dentro de um programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Smith, 2005; Boiça Júnior et al., 2013). Portanto, a avaliação da resistência em genótipos de soja a *S. cosmíoides* para fins de seleção e melhoramento torna-se necessária, uma vez que as demais táticas de controle têm mostrado baixa eficiência a esta espécie.

2.4. Resistencia de soja a insetos-praga

Diversos trabalhos que avaliaram a resistência de genótipos de soja a insetos-praga têm sido relatados na literatura, entre o quais, destacam-se alguns relacionados às principais pragas que ocorrem na cultura no Brasil. Fugi et al. (2005) observaram que os genótipos IAC 17 e IAC 24 causaram efeitos antibióticos para a lagarta-da-

soja, *A. gemmatilis*, como baixa sobrevivência larval e pupal, baixa viabilidade de ovos, redução do número de ovos por fêmea e deformação de adultos.

Estudos que avaliaram características de resistência em soja à lagarta-falsa-medideira, *C. includens*, demonstraram que o genótipo Benso 1RR prolongou o ciclo de vida desta espécie e causou redução nos pesos larval e pupal (Wille et al., 2017). Moraes (2017) concluiu que os genótipos IAC 100 e PI 227682 foram menos preferidos para alimentação de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae); além disso, houve prolongamento no período larval e menor viabilidade de lagartas desta espécie, respectivamente. Efeitos negativos no desenvolvimento de *H. armigera* também foram observadas nos genótipos M8230 RR e PI 227687, com o prolongamento no período larval e ciclo total, respectivamente (Moraes, 2017).

Outros trabalhos também observaram características de resistência de genótipos para espécies do gênero *Spodoptera*, consideradas importantes pragas da cultura, principalmente em áreas de cultivo sucessivo. Souza et al. (2014) observaram que os genótipos PI 227687 e PI 227682 prolongaram o período larval, pupal e de lagarta a adulto, além de ocasionarem redução no peso larval e pupal e sobrevivência larval de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). Os genótipos PI 227687, PI 227682 e 'IAC 100' também afetaram o desenvolvimento de *S. cosmioides* (Boiça Júnior et al., 2015). De acordo com os resultados, estes genótipos ocasionaram 100% de mortalidade larval e os menores pesos de lagartas. Boiça Júnior et al. (2017a), avaliaram a habituação e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) submetida à experiência prévia em genótipos de soja e observaram que os genótipos PI227687 e IAC 100 afetaram o desenvolvimento desta espécie-praga.

Alguns trabalhos avaliaram a resistência em soja após injúria prévia e observaram que os genótipos PI 227682 (Freitas et al., 2017) e P 4906 RR (Souza, 2014) aumentaram seus níveis de resistência para *S. cosmioides* e *S. frugiperda*, respectivamente. A resistência foi elicitada pela injúria prévia causada pelos insetos e caracterizou a resistência induzida nestes genótipos.

A capacidade das plantas em minimizar os danos em seu desenvolvimento, causados por fatores bióticos ou abióticos, ocorre através mecanismos físicos/morfológicos e bioquímicos de resistência herdados geneticamente que

interferem na seleção hospedeira, oviposição ou alimentação de herbívoros (Schaller, 2008; Boiça Júnior et al., 2018). Portanto, a investigação das características intrínsecas de defesa é de fundamental importância para o manejo de pragas, uma vez que, através do melhoramento genético convencional e por meio de engenharia genética é possível utilizar a resistência de plantas como estratégia adicional de manejo.

2.5. Mecanismos químicos de defesa de plantas a insetos

Como abordado anteriormente, os mecanismos de resistência podem ser expressos constitutivamente ou induzidos após estímulos extrínsecos. Os mecanismos morfológicos correspondem às variações estruturais da planta que influenciam negativamente o comportamento e desenvolvimento do inseto ou permitem maior exposição do herbívoro aos inimigos naturais, através da arquitetura da planta, disponibilidade de refúgios, densidade de tricomas e espinhos, espessura, dureza das folhas e presença de cera epicuticular como camada protetora (Schoonhoven et al., 2005; Schaller, 2008; Boiça Júnior et al., 2013).

Os mecanismos químicos de resistência ocorrem através da ação de compostos químicos sintetizados nas plantas através do metabolismo secundário que representam um papel importante na defesa contra os herbívoros. Os efeitos dos compostos secundários impactam no desempenho dos herbívoros e ocasionou repelência, deterrência alimentar e/ou efeitos antibióticos, provocados por déficit nutricional ou toxicidade (Schoonhoven et al., 2005; Schaller, 2008; Boiça Júnior et al., 2013). As plantas sintetizam ampla gama de compostos secundários, estimados em mais de 200.000 moléculas em quatro grupos químicos principais: os compostos terpenoides, os compostos nitrogenados, os compostos fenólicos e as proteínas de defesa (Schoonhoven et al., 2005; Douglas, 2018).

Os terpenos representam o maior e mais diverso grupo de compostos secundários de origem vegetal, com mais de 30 mil metabólitos já identificados. Os terpenos geralmente ocorrem nas plantas em misturas complexas, e incluem substâncias que desempenham diversas funções, incluindo antibióticos, hormônios, odores, lipídios constituintes de membranas celulares, vitaminas, entre outras

(Schoonhoven et al., 2005). Estes metabólitos são classificados de acordo com o número de átomos de carbonos (C) que constituem suas moléculas ou número de blocos de isoprenos, isto é, de unidades formadas por cinco átomos de carbono. Assim, os terpenos podem ser classificados em monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), triterpenos (30C), tetraterpenos (40C) e politerpenos (>40C) (Humphrey e Beale, 2006).

Os compostos nitrogenados são sintetizados em grande maioria a partir de aminoácidos através do metabolismo secundário. Essas substâncias, que possuem átomos de nitrogênio em sua estrutura, estão geralmente relacionadas com a defesa das plantas. Existem vários compostos conhecidos nesse grupo, como os alcaloides, glicosídeos e os aminoácidos não proteicos que totalizam mais de 15 mil substâncias já identificadas (Schoonhoven et al., 2005; Boiça Júnior et al., 2013).

Entre os metabólitos secundários, os compostos fenólicos constituem um dos grupos mais comuns e distribuídos entre os compostos de defesa contra insetos, microrganismos e plantas competidoras (War et al., 2012). Aproximadamente 10 mil moléculas são descritas na literatura, todas caracterizadas por possuírem ao menos um anel aromático contendo uma hidroxila, além de grupos funcionais. Os compostos fenólicos geralmente estão ligados à defesa contra herbívoros, rigidez dos tecidos vasculares e caracterização organoléptica dos vegetais. Podem ser divididos em três grandes grupos: (i) compostos poucos distribuídos na natureza, como os derivados do ácido benzoico e constituintes dos óleos essenciais; (ii) polímeros, como os taninos e as ligninas; e (iii) compostos muito distribuídos na natureza, como os flavonoides e as cumarinas (Ribéreau-Gayon, 1968).

Os flavonoides são amplamente distribuídos no reino vegetal, e constituem a maior classe de compostos fenólicos. Várias classes de flavonoides são encontradas nas plantas, como os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e calconas. Em geral, os compostos polifenólicos são importantes componentes do metabolismo secundário das plantas e atuam na redução dos estresses causados por fatores abióticos e bióticos. Nos insetos, os compostos fenólicos podem reduzir as taxas de alimentação, oviposição e desenvolvimento (Simmonds, 2003).

Algumas proteínas de origem vegetal também podem exercer efeitos negativos no desenvolvimento de herbívoros, incluindo os insetos. Os requerimentos nutricionais dos insetos são similares aos de outros animais, e qualquer desbalanço na digestão e utilização das proteínas vegetais, resulta em efeitos drásticos na fisiologia dos insetos. Além disso, algumas proteínas conhecidas como inibidores de proteinases são encontradas em diversos vegetais e atuam inibindo a ação de enzimas digestivas proteolíticas específicas no intestino dos insetos. A formação do complexo proteinase-protease resulta na inibição da atividade enzimática, redução da quebra de moléculas de proteína em aminoácidos, e consequentemente menor absorção desses nutrientes e crescimento dos insetos (Ryan, 1990; War et al., 2012).

Outro grupo de proteínas amplamente encontradas em animais, vegetais e microrganismos, são as lectinas. Em insetos, as lectinas se ligam a carboidratos, glicoproteínas e outros glicosídeos das células do intestino médio, agindo como substâncias anti-nutritivas. As lectinas são conhecidas por causarem efeitos antibióticos em coleópteros, lepidópteros e hemípteros. Além disso, alguns estudos demonstram que as lectinas também podem causar deterrência na alimentação e oviposição de alguns insetos (Gatehouse et al., 1995; War et al., 2012).

Diversos compostos secundários expressos constitutivamente ou induzidos por herbivoria têm sido relatados em genótipos de soja resistentes a insetos-praga. Os flavonoides, importante grupo de compostos fenólicos é encontrado em diversas estruturas de plantas de soja e conhecido por causar efeitos no comportamento e desenvolvimento de insetos (Kogan e Fischer, 1991; Hoffmann-Campo, 1995; Hoffmann-Campo et al., 2001; Souza, 2014).

Efeitos negativos foram observados em lagartas de *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) alimentadas em folhas do genótipo PI227687, que expressa constitutivamente os flavonoides rutina e genistina (Hoffmann-Campo et al., 2001; Hoffmann-Campo et al., 2006). Estes compostos também foram observados em plantas do genótipo IAC 100 que apresenta resistência à diversas pragas da soja (Piubelli et al., 2005). Os compostos daidzeína e rutina também foram encontrados em sementes de plantas do genótipo PI227687 injuriadas pelo percevejo *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae) e influenciaram negativamente a preferência

alimentar da praga (Piubelli et al., 2003). Além destes, outros flavonoides como, hesperidina e isoquercitina já foram encontrados em genótipos de soja envolvidos na resistência a insetos (Salunke et al., 2005; Eduardo et al., 2016; Eduardo, 2018).

2.6. A metabolômica como ferramenta em resistência de plantas

Devido à enorme diversidade de compostos secundários, estimada em mais de 200.000 moléculas sintetizadas pelas plantas, abordagens com análises químicas analíticas em larga escala, como a metabolômica, têm auxiliado o avanço em pesquisas relacionadas à resistência de plantas a insetos. Estudos que investigam a expressão de compostos químicos em plantas, em geral, têm sido focados em abordagens direcionadas, em que há a mensuração de grupos de metabólitos conhecidos, por exemplo, a análise de alcaloides e seus efeitos em insetos. No entanto, a metabolômica em plantas têm permitido novas abordagens (Cajka e Fiehn, 2015; Marcel e Van Dam, 2018).

O metaboloma é definido como o conjunto de todos os metabólitos presentes em um organismo e, portanto, a metabolômica tem como objetivo investigar ampla gama desses metabólitos, que são classificados em diferentes grupos de compostos com diversas propriedades químicas e variadas funções (Fiehn et al., 2001). As técnicas analíticas utilizadas são através da ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, em dois tipos principais de metabolômica; não direcionada e direcionada (Cajka e Fiehn, 2015).

A metabolômica não direcionada realiza ampla triagem de metabólitos presentes na planta, com identidades conhecidas ou não e, portanto, o objetivo principal está na qualificação do maior número de compostos quanto possível (Leiss et al., 2009). Esta técnica também pode ser aplicada para confirmar que determinados metabólitos identificados previamente são de fato os únicos ou mais importantes compostos nas respostas de defesa das plantas a insetos (Glauser et al., 2011). Já a metabolômica direcionada busca a quantificação de grande conjunto de metabólicos com identidades definidas. Entretanto, em contraste com as abordagens direcionadas tradicionais, que geralmente analisam apenas uma classe de compostos (por exemplo, glucosinolatos ou alcaloides), a metabolômica direcionada oferece a

possibilidade de analisar simultaneamente diversas classes de compostos conhecidos (Cajka e Fiehn, 2015).

Portanto, se em determinada espécie de planta os compostos químicos de resistência não são amplamente conhecidos, a metabolômica não direcionada pode ser uma ferramenta útil na procura por compostos envolvidos na expressão de resistência de plantas. Além disso, para a utilização de marcadores químicos de resistência, por exemplo, para triagem fenotípica em larga escala de genótipos resistentes, não é necessário conhecer a função ou identidade exata de um metabólito, desde que haja correlação com a característica de resistência de interesse (Marcel e Van Dam, 2018).

Com o avanço tecnológico nos métodos analíticos, a detecção de grande número de compostos em determinada amostra é relativamente simples. No entanto, para muitos metabólitos, mesmo os de espécies vegetais modelo, a função fisiológica ou ecológica na planta ainda é desconhecida (Weckwerth, 2003). Portanto, a metabolômica não direcionada geralmente não apenas detecta metabólitos com identidade desconhecida mas também metabólitos conhecidos, com função desconhecida (Marti et al., 2013). Assim, diferentes métodos, como bioensaios e a transformação genética têm sido utilizados para auxiliar os estudos em metabolômica quanto à identificação de compostos e suas funções (Marcel e Van Dam, 2018).

Os bioensaios em resistência de plantas normalmente são realizados através de testes que avaliam o comportamento, preferência alimentar e desenvolvimento do inseto-praga alvo alimentado em estruturas vegetativas e/ou reprodutivas das plantas em estudo. Os resultados podem ser comparados aos encontrados em análises metabolômicas realizadas nas plantas para elucidar os compostos secundários que possam estar diretamente envolvidos nos efeitos negativos causados nos insetos.

Modificação genética, silenciamento de genes por RNAi, ou edição de genoma via CRISPR / Cas9 são outras abordagens que podem ser aplicadas, por exemplo, para estudar o efeito de classes específicas de compostos na resistência de plantas a insetos (Beekwilder et al., 2008; Weeks et al., 2016). No entanto, a modificação genética só pode ser aplicada se os genes envolvidos na biossíntese dos compostos de interesse forem conhecidos, o que geralmente é o caso de plantas modelo e classes de compostos bem estudados (Simó et al., 2014; Shepherd et al., 2015).

Assim, a metabolômica pode ser uma ferramenta bastante útil em estudos que buscam novas fontes de resistência, especialmente nas etapas iniciais de pesquisa. A rápida adoção desta tecnologia na área de resistência de plantas é justificada pela eficiência analítica em explorar os compostos químicos expressos nas plantas, assim como a identificação e funções dos metabólitos envolvidos na resistência a insetos.

3. Referências

Aljbory Z, Chen MS (2016) Indirect plant defense against insect herbivores: a review. **Insect Science** 25:2-23.

Alyokhin A, Chen YH (2017) Adaptation to toxic hosts as a factor in the evolution of insecticide resistance. **Current Opinion in Insect Science** 21:33-38.

Bavaresco A, Garcia MS, Gruetzmacher AD, Foresti J, Ringenberg R (2002) Biology and thermal requirements of *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology** 31:49-54.

Bavaresco A, Silveira MG, Grützmacher AD, Foresti J, Ringenberg R (2003) Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamona, soja e feijão. **Ciência Rural** 33:993-998.

Bavaresco A, Garcia MS, Grützmacher AD, Ringenberg R, Foresti J (2004) Adequação de uma dieta artificial para a criação de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. **Neotropical Entomology** 33:155-161.

Beekwilder J, Van Leeuwen W, Van Dam NM, Bertossi M, Grandi V, Mizzi L, Soloviev M, Szabados L, Molthoff JW, Schipper B (2008) The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on insect herbivory in Arabidopsis. **PLoS One** 3:e2068.

Bergamin M, Cancian MA, Castro PRC (1999) Soja (*Glycine max* (L.) Merrill). In.: Castro PRC, Kluge RA (Eds.) **Ecofisiologia dos cultivos anuais: trigo, milho, soja, arroz, mandioca**. São Paulo: Nobel. p. 73-89.

Bernardi O, Bernardi D, Horikoshi RJ, Omoto C (2016) **Manejo da resistência de insetos a plantas Bt**. Engenheiro Coelho/SP: PROMIP. 46p.

Bernardi O, Sorgatto RJ, Barbosa AD, Domingues FA, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Head GP, Omoto C (2014) Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*,

Spodoptera eridania and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop Protection** 58:33-40.

Boiça Júnior A, Souza B, Lopes G, Costa E, Moraes R, Eduardo W (2013) Atualidades em resistência de plantas a insetos. In.: Busoli A, Alencar J, Fraga D, Souza L, Souza B, Grigolli J (Eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola - VI**. Jaboticabal: Multipress Ltda. p. 207-224.

Boiça Júnior AL, Souza BH, Costa EN, Paiva LB (2017a) Influence of fall armyworm previous experience with soybean genotypes on larval feeding behavior. **Arthropod-Plant Interactions** 11:89-97.

Boiça Júnior AL, Bottega DB, Souza BHS, Rodrigues NEL, Michelin V (2015) Determinação dos tipos de resistência a *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de soja. **Semina: Ciências Agrárias** 36:607-618.

Boiça Júnior AL, Freitas MM, Nogueira L, Di Bello MM, Freitas CA, Barcelos PHS, Faria SCQdS (2017b) Resistência de plantas a insetos em culturas agrícolas. In.: Castilho RC, Barilli DR, Truzzi CC (Eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola - x**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda. p. 97-122.

Boiça Júnior AL, Freitas CA, Freitas MM, Nogueira L, Di Bello MM, Fonseca SS, Eduardo WI (2018) Estratégias de defesa de plantas a insetos. In.: Castilho RC, Truzzi CC, Pinto CPG (Eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola - xi**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda. p. 71-93.

Boiça Júnior AL, Freitas MM, Freitas CA, Di Bello MM, Ulhoa LA, Pascutti TM, Souza BHSd (2019) Respostas induzidas de defesa das plantas e implicações no manejo integrado de pragas. In.: Castilho RC, Barilli DR, Truzzi CC (Eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola - x**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda. p. 97-122.

Borém A, Miranda GV (2009) **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV. 529p.

Bueno AF, Corrêa-Ferreira B, Bueno R (2010a) Controle de pragas apenas com o MIP. **A Granja** 1:76-79.

Bueno RCOF, Bueno AF, Moscardi F, Parra JRP, Hoffmann-Campo CB (2011) Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science** 67:170-174.

Bueno RCOF, Carneiro TR, Bueno AF, Pratissoli D, Fernandes OA, Vieira SS (2010b) Parasitism capacity of *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) on *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) eggs. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 53:133-139.

Cajka T, Fiehn O (2015) Toward merging untargeted and targeted methods in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics. **Analytical Chemistry** 88:524-545.

Capalbo DMF, Suzuki MT (2017) The Importance of *Bacillus thuringiensis* in the Context of Genetically Modified Plants in Brazil. In.: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.) ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus***. Switzerland: Springer. p. 259-271.

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C (2013) Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One** 8:e62268.

Chen YH, Gols R, Benrey B (2015) Crop domestication and its impact on naturally selected trophic interactions. **Annual Review of Entomology** 60:35-58.

CONAB (2019) **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. Brasília: CONAB, 107 p. (CONAB. Documento, 11).

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (2010) **Technical Opinion N°2542/2010-Commercial Release of Genetically Modified Insect-resistant and Herbicide-tolerant Soy Containing Genetically Modified Events MON 87701 and MON 89788**. Brasília: CTNBio. Disponível em: <<http://www.ctnbio.mcti.gov.br>>. Acessado em: 02 ago. 2019.

Dall'Agnol A (2016) **A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições**. Brasília: Embrapa, 2016. 71p.

Diez-Rodriguez GI, Omoto C (2001) Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology** 30:311-316.

Douglas AE (2018) Strategies for enhanced crop resistance to insect pests. **Annual Review of Plant Biology** 69:637-660.

Eduardo WI (2018). **Metodologia de pesquisa, níveis nas categorias de resistência constitutiva em genótipos de soja e resistência induzida a *Heliothis virescens* e os mecanismos de defesas envolvidos**. 135 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Entomologia Agrícola) - Unesp Jaboticabal.

Eduardo WI, Júnior ALB, Moraes RFO, Chiorato AF, Perlatti B, Forim MR (2016) Antibiosis levels of common bean genotypes toward *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) and its correlation with flavonoids. **Journal of Stored Products Research** 67:63-70.

Embrapa S (2004) **Tecnologias de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 224 p. (Embrapa Soja. Documento, 1).

Embrapa S (2005) **Tecnologias de Produção de Soja: Região Central do Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 237 p. (Embrapa Soja. Documento, 1).

Farias JRB, Nepomuceno AL, Norman N (2007) **Ecofisiologia da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 9 p. (Embrapa Soja. Documento, 48).

Fehr WR, Caviness CE (1977) **Stages of soybean development**. Iowa: State University of Science and Technology, 11 p. (State University of Science and Technology. Documento, 80).

Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey R, Willmitzer L (2001) Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology** 18:1157-1161.

Freitas MM, Souza BHS, Nogueira L, Di Bello MM, Boiça Júnior ALB (2017) Soybean defense induction to *Spodoptera cosmioides* herbivory is dependent on plant genotype and leaf position. **Arthropod-Plant Interactions** 12:85-96.

Fugi CGQ, Lourenção AL, Parra JRP (2005) Biology of *Anticarsia gemmatilis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. **Scientia Agricola** 62:31-35.

Gallo D, Nakano O, Neto SS, Carvalho R, Batista G, Berti Filho E, Parra J, Zuchi R, Alves S, Vendramin J, Marchini L, Lopes J, Omoto C (2002) **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920p.

Gatehouse AM, Powell KS, Peumans WJ, Van Damme EJ, Gatehouse JA (1995) Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. In.: Pustai A, Bardocz S (Eds.) **Lectins: biomedical perspectives**. London: Thaylor & Francis. p. 35-57.

Gazzoni D, Dall'agnol A (2018) **Soja: quebrando recordes**. Sorocaba Comitê Estratégico Soja Brasil. 216p.

Glauser G, Marti G, Villard N, Doyen GA, Wolfender JL, Turlings TC, Erb M (2011) Induction and detoxification of maize 1, 4-benzoxazin-3-ones by insect herbivores. **The Plant Journal** 68:901-911.

Gomes P (1986) **A soja**. São Paulo: Nobel. 152p.

Habib M, Paleari L, Amaral M (1982) Effect of three larval diets on the development of the armyworm, *Spodoptera latifascia* Walker, 1856 (Noctuidae, Lepidoptera). **Revista Brasileira de Zoologia** 1:177-182.

Hartman GL, West ED, Herman TK (2011) Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security** 3:5-17.

Hoffmann-Campo C (1995). **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusi ni* (Hübner)**. 165 f. Tese Doutorado em Botânica - The University of Reading Reading.

Hoffmann-Campo CB, Ramos Neto JA, Oliveira MCN, Oliveira LJ (2006) Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatilis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41:1453-1459.

Hoffmann-Campo C, Harborne J, McCaffery A (2001) Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 98:181-194.

Huang S, Han Z (2007) Mechanisms for multiple resistances in field populations of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 87:14-22.

Humphrey AJ, Beale MH (2006) Terpenes. In.: Crozier A, Clifford MN, Ashihara H (Eds.) **Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet**. Oxford: Blackwell Publishing. p. 47-101.

Kogan M, Fischer D (1991) Inducible defenses in soybean against herbivorous insects. In.: Tallamy DWR, M. J (ed.) **Phytochemical induction by herbivores**. New York: Wiley. p. 347-378.

Kumudini S (2010) Soybean growth and development. In.: Singh G (ed.) **The soybean: botany, production and uses**. Oxfordshire: CABI. p. 48-73.

Leiss KA, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R, Klinkhamer PG (2009) Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. **Plant Physiology** 150:1567-1575.

MAPA - (2019). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: **Agrofit: sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em: 18 de dezembro de 2019.

Marcel M, Van Dam NM (2018) Metabolomics of plant resistance to insects **The Biology of Plant-Insect Interactions**. Boca Raton: Taylor & Francis. p. 129-149.

Marti G, Erb M, Boccard J, Glauser G, Doyen GR, Villard N, Robert CAM, Turlings TC, Rudaz S, Wolfender J-L (2013) Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. **Plant, Cell & Environment** 36:621-639.

Martinez M (2012) Co-evolution of Genes for Specification in Arthropod-Plant Interactions: A Bioinformatic Analysis in Plant and Arthropod Genomes. **Arthropod-Plant Interactions**. Dordrecht: Springer. p. 1-14.

Masuda T, Goldsmith PD (2009) World soybean production: area harvested, yield, and long-term projections. **International Food and Agribusiness Management Review** 12:1-20.

Meyer RS, DuVal AE, Jensen HR (2012) Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. **New Phytologist** 196:29-48.

Michereff-Filho M, Torres JB, Andrade LN, Nunes MUC (2008) Effect of some biorational insecticides on *Spodoptera eridania* in organic cabbage. **Pest Management Science** 64:761-767.

Missão MR (2006) Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais** 3:7-15.

Mitchell C, Brennan RM, Graham J, Karley AJ (2016) Plant defense against herbivorous pests: exploiting resistance and tolerance traits for sustainable crop protection. **Frontiers in Plant Science** 7:1132.

Moraes RFO (2017). **Técnicas de avaliação do desempenho alimentar e de oviposição, categorias e mecanismos de resistência de genótipos de soja à**

***Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: noctuidae).** 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Entomologia Agrícola) - Unesp Jaboticabal.

Moscardi F, Bueno A, Sosa-Gómez DR, Roggia S, Hoffmann-Campo CB, Pomari AF, Corso IC, Yano SAC (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In.: HOFFMANN-CAMPO CBC-F, B. S.; MOSCARDI, F. (ed.) **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa. p. 859.

Müller L (1981) Taxonomia e morfologia. In.: MIYASAKA SM, J. C. (ed.) **A soja no Brasil**. Campinas: IAC. p. 73-104.

Oerke E-C (2006) Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science** 144:31-43.

Oerke E-C, Dehne H-W (2004) Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. **Crop Protection** 23:275-285.

Ortego F (2012) Physiological adaptations of the insect gut to herbivory. In.: Smagghe G, Diaz I (Eds.) **Arthropod-Plant Interactions**. Dordrecht: Springer. p. 75-88.

Panizzi AR, Bueno AF, Silva F (2012) Insetos que atacam vagens e grãos. In.: Hoffmann-Campo CBC-F, B. S.; Moscardi, F. (ed.) **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa. p. 335-420.

Parisi C, Tillie P, Rodríguez-Cerezo E (2016) The global pipeline of GM crops out to 2020. **Nature Biotechnology** 34 31-36.

Pimentel D, Burgess M (2014) Pesticides applied worldwide to combat pests. In.: Peshin R, Pimentel G (Eds.) **Integrated Pest Management**. Dordrecht: Springer. p. 1-12.

Piovesan M, Carneiro E, Specht A, Casagrande MM (2019) Where and when? How phenological patterns of armyworm moths (Lepidoptera: Noctuidae) change along a latitudinal gradient in Brazil. **Bulletin of Entomological Research** 109:490-499.

Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, De Arruda IC, Franchini JC, Lara FM (2003) Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology** 29:1223-1233.

Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Miyakubo SH, De Oliveira MCN (2005) Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? **Journal of chemical ecology** 31:1509-1525.

Qaim M (2009) The economics of genetically modified crops. **Annual Review of Resource Economics** 1:665-694.

Ribéreau-Gayon P (1968) **Les composés phénoliques des végétaux**. Paris: Dunod. 254p.

Robert JW (1986) **The soybean solution: meeting world food needs**. Champaign: NIT-College of Agriculture, University of Illinois at Urbana, 4-27 p. (NIT-College of Agriculture, University of Illinois at Urbana. Documento, 1).

Ryan CA (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 28:425-449.

Saleem M, Hussain D, Ghouse G, Abbas M, Fisher SW (2016) Monitoring of insecticide resistance in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from four districts of Punjab, Pakistan to conventional and new chemistry insecticides. **Crop Protection** 79:177-184.

Salunke B, Kotkar H, Mendki P, Upasani S, Maheshwari V (2005) Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae), a post-harvest pest of grain legumes. **Crop Protection** 24:888-893.

Santamaria ME, Martínez M, Cambra I, Grbic V, Diaz I (2013) Understanding plant defence responses against herbivore attacks: an essential first step towards the development of sustainable resistance against pests. **Transgenic Research** 22:697-708.

Santos G, Cosenza G, Albino J (1980) Biology of *Spodoptera latifascia* (Walker, 1856) (Lepidoptera: Noctuidae) on eucalyptus leaves. **Revista Brasileira de Entomologia** 24:153-155.

Santos KB, Meneguim AM, Neves PM (2005) Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. **Neotropical Entomology** 34:903-910.

Santos KB, Meneguim AM, dos Santos WJ, Neves PM, dos Santos RB (2010) Caracterização dos Danos de *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) em Estruturas de Algodoeiro. **Neotropical Entomology** 39:626-631.

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution** 3:430-439.

Schaller A (2008) **Induced Plant Resistance to Herbivory**. Dordrecht: Springer. 462p.

Schoonhoven LM, Van Loon JJ, Dicke M (2005) **Insect-Plant Biology**. Oxford: Oxford University Press. 412p.

Sediyama TP, M. G.; Sediyama, C. S.; Gomes, J. L. L. (1996) **Cultura da soja**. Viçosa: UFV. 96p.

Sharma HC (2008) **Biotechnological approaches for pest management and ecological sustainability**. Taylor and Francis: New York. 526p.

Shepherd LVT, Hackett CA, Alexander CJ, McNicol JW, Sungurtas JA, Stewart D, McCue KF, Belknap WR, Davies HV (2015) Modifying glycoalkaloid content in transgenic potato—Metabolome impacts. **Food Chemistry** 187:437-443.

Silva DM, Zimmermann Ao, Bueno AF, Moscardi F (2011) Aspectos biológicos de *Spodoptera cosmíodes* Walk.(Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes plantas hospedeiras. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, **Anais**. Londrina: Embrapa, p. 42-45.

Silva DM, Freitas Bueno A, Santos Stecca C, Andrade K, Neves PMOJ, Oliveira MCN (2017a) Biology of *Spodoptera eridania* and *Spodoptera cosmíodes* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. **Florida Entomologist** 100:752-761.

Silva FL, Borém A, Sediyama T, Ludke WH (2017b) **Soybean Breeding**. Viçosa: Springer. 458p.

Silvain JF, Lalanne-Cassou B (1997) Distinction entre *Spodoptera latifascia* (Walker) et *Spodoptera Cosmíodes* (Walker), bona species (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Francesa de Entomologia** 19:95-97.

Silvie P, Thomazoni D, Soria M, Saran P, Bélot J (2013) **Pragas e seus danos em algodoeiro**. Cascavél: Gráfica Igol, 185 p. (Gráfica Igol. Documento, 1).

Simmonds MS (2003) Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge. **Phytochemistry** 64:21-30.

Simó C, Ibáñez C, Valdés A, Cifuentes A, García-Cañas V (2014) Metabolomics of genetically modified crops. **International Journal of Molecular Sciences** 15:18941-18966.

Singh G (2010) **The soybean: botany, production and uses**. London: CABI. 494p.

Smith CM (2005) **Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches**. Dordrecht: Springer. 423p.

Souza B, Silva A, Janini J, Júnior AB (2014) Antibiosis in soybean genotypes and the resistance levels to *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology** 43:582-587.

Souza BHS (2014). **Fatores e mecanismos que influenciam a resistência em soja a *Anticarsia gemmatilis* Hübner e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 142 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Entomologia Agrícola) - Unesp Jaboticabal.

Su J, Sun X-X (2014) High level of metaflumizone resistance and multiple insecticide resistance in field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangdong Province, China. **Crop Protection** 61:58-63.

Sugiyama A, Ueda Y, Takase H, Yazaki K (2015) Do soybeans select specific species of *Bradyrhizobium* during growth? **Communicative & Integrative Biology** 8:e992734.

USDA (2019) **World agricultural production**. Washington: Foreign Agricultural Service, 36 p. (Foreign Agricultural Service. Documento, WAP 8-19).

War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC (2012) Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior** 7:1306-1320.

Weckwerth W (2003) Metabolomics in systems biology. **Annual Review of Plant Biology** 54:669-689.

Weeks DP, Spalding MH, Yang B (2016) Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. **Plant Biotechnology Journal** 14:483-495.

Wille PE, Pereira BA, Wille CL, Restelatto SS, Boff MIC, Franco CR (2017) Natural resistance of soybean cultivars to the soybean looper larva *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 52:18-25.

Zenker MM, Specht A, Corseuil E (2007) Immature stages of *Spodoptera cosmioides* (Walker)(Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Zoologia** 24:99-107.

CAPÍTULO 2 - Caracterização de perfis metabólicos e resistência constitutiva em genótipos de soja a *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)

Resumo – Os principais métodos de controle de pragas na cultura da soja no Brasil têm sido através do uso de plantas geneticamente modificadas que expressam a proteína Cy1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Bt) e controle químico. No entanto, devido à baixa suscetibilidade de *Spodoptera cosmioides* à proteína Cy1Ac de Bt e alta capacidade de evolução de populações resistentes a inseticidas químicos, *S. cosmioides* tornou-se uma das principais pragas da soja no Brasil. Portanto, a resistência de plantas torna-se uma estratégia promissora que pode ser integrada às demais táticas utilizadas, uma vez que as plantas possuem sofisticados mecanismos morfológicos e bioquímicos de defesa contra herbívoros. Assim, foram avaliados oito genótipos comerciais de soja para resistência constitutiva à *S. cosmioides* através de testes de preferência alimentar com e sem chance de escolha e desenvolvimento biológico através da avaliação de índices nutricionais de *S. cosmioides* alimentadas nestes genótipos. Além disso, foram realizadas análises químicas dos metabólitos secundários expressos em plantas que possam afetar o comportamento e desenvolvimento de lagartas de *S. cosmioides*. Resultados interessantes foram observados neste estudo, uma vez que alguns genótipos comerciais de soja, como UFUS Carajás, UFUS Xavante e UFUS Milionária, apresentaram resistência a *S. cosmioides* e diferenças significativas no perfil metabólico destes genótipos revelaram que diversos compostos secundários estão envolvidos na expressão da resistência a *S. cosmioides*. Este trabalho fornece resultados importantes em relação a novas fontes de resistência para uma das principais pragas da soja no Brasil e discute como estes recursos podem ser utilizados no manejo de *S. cosmioides*. Além disso, este trabalho enfatiza a importância da metabolômica como ferramenta promissora na busca de características de resistência de plantas a insetos e seu uso em programas de melhoramento.

Palavras-chave: *Glycine max*, lagarta-das-vagens, metabólitos secundários, metabolômica, resistência de plantas a insetos

CHAPTER 2 – Characterization of metabolic profiles and constitutive resistance in soybean genotypes to *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)

Abstract – The main soybean pest control methods in Brazil have been through the use of genetically modified plants expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cy1Ac protein and chemical control. However, due to the low susceptibility of *Spodoptera cosmioides* to Bt Cy1Ac protein and high capacity for development of resistant populations to chemical insecticides, *S. cosmioides* has become one of the main soybean pests in Brazil. Therefore, plant resistance becomes a promising alternative strategy that can be integrated with other tactics as plants have sophisticated morphological and biochemical defense mechanisms against herbivores. Thus, eight commercial soybean genotypes were evaluated for constitutive resistance to *S. cosmioides* in feeding preference on choice and no-choice tests and biological development by evaluating nutritional indices of *S. cosmioides* fed on these genotypes. In addition, chemical analyzes of secondary metabolites expressed in plants that may affect the behavior and development of *S. cosmioides* larvae were performed. Interesting results were observed in this study, as some commercial soybean genotypes, such as UFUS Carajás, UFUS Xavante and UFUS Millionária, showed resistance to feeding and antibiosis to *S. cosmioides* and significant differences in the metabolic profile of these genotypes revealed that several secondary compounds are found to be involved in the expression of resistance to this species. This study provides important results regarding new sources of resistance to one of the main soybean pests in Brazil and discusses how these resources can be used in the management of *S. cosmioides*. In addition, this work emphasizes the importance of metabolomics as a promising tool in the search for insect resistance characteristics and its use in breeding programs.

Keywords: Black armyworm, *Glycine max*, metabolomics, plant resistance to insects, secondary metabolites

1. Introdução

A ocorrência de insetos-praga destaca-se entre os principais fatores limitantes na produção mundial de soja (Pagano e Miransari, 2016). O uso de plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas com ação inseticida de *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner têm sido uma das principais estratégias no manejo de pragas em diversos países (Parisi et al., 2016; Chaudhary e Singh, 2019). No Brasil, a soja transgênica que expressa a proteína Cry1Ac de Bt (evento MON87701 X MON89788) aprovada para o cultivo em 2010 teve rápida adoção pelos sojicultores (Capalbo e Suzuki, 2017) devido à eficiência no controle de lepidópteros pragas-chave da cultura (Bernardi et al., 2012). Entretanto, *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae), assim como outras espécies do gênero que eram consideradas pragas secundárias da soja, apresenta baixa suscetibilidade à proteína Cry1Ac (Bernardi et al., 2014) e devido à redução no uso de inseticidas para o controle de pragas primárias, esta espécie têm assumido grande importância na cultura no Brasil.

Outros eventos transgênicos contendo as proteínas Cry1Ac + Cry1F e Cry1A.105 + Cry2Ab + Cry1Ac de Bt em soja têm sido aprovados para cultivo no Brasil, no entanto, com exceção de Cry1A.105, todas as demais proteínas também são expressas em algodão Bt (Cry1Ac; Cry2Ab, Cry1F) (CTNBio, 2019). Além da soja, a espécie *S. cosmioides* também ocorre no algodoeiro, e o fato de ambas as culturas serem cultivadas simultaneamente e em sucessão, principalmente na região central do Brasil, há a disponibilidade de hospedeiro durante a maior parte do ano e exposição das populações desta espécie a elevada pressão de seleção por proteínas Bt, o o que possibilita a evolução de resistência cruzada e afeta a longevidade da tecnologia e eficiência no controle da praga (Bernardi et al., 2016).

Além disso, a levada frequência de casos de resistência para espécies deste gênero (Diez-Rodriguez e Omoto, 2001; Huang e Han, 2007; Carvalho et al., 2013; Su e Sun, 2014; Saleem et al., 2016) sugere que a baixa eficácia no controle químico é comum devido à tolerância natural das espécies, que pode ocorrer através de diversos mecanismos fisiológicos (Alyokhin e Chen, 2017). Portanto, a baixa eficiência dos principais métodos de controle utilizados atualmente contra *S. cosmioides* ressalta a

necessidade de abordagens alternativas e sustentáveis que atuem de forma integrada às táticas já empregadas, contribua para a manutenção das populações abaixo do nível de dano econômico da cultura, e busque minimizar as perdas ocasionadas por *S. cosmioides*. O uso de genótipos que expressam características de resistência torna-se uma alternativa promissora, uma vez que contribuem diretamente para a redução das populações de insetos, e podem ainda, agir de forma sinérgica a outras táticas de controle.

As plantas possuem sofisticados mecanismos morfológicos e bioquímicos de defesa contra herbívoros. Os mecanismos bioquímicos de defesa são, em geral, metabólitos secundários originados de diversos grupos químicos como os terpenos, compostos fenólicos, compostos nitrogenados e proteínas de defesa (Bernays e Chapman, 1994; Schoonhoven et al., 2005; Douglas, 2018). Portanto, o uso de tecnologias como a metabolômica tem sido fundamental para auxiliar a compreensão dos complexos processos bioquímicos e expressão de metabólitos secundários envolvidos nos mecanismos de defesa, que são essenciais para melhor utilização da resistência de plantas como tática efetiva no manejo de pragas (Marcel e Van Dam, 2018).

Estudos em metabolômica permitem observar as alterações no perfil de metabólitos e compreender o seu papel na regulação de defesas diretas ou indiretas a herbívoros. Assim, através do perfil metabólico é possível a interpretação de interações entre as plantas e os herbívoros mediante a regulação de compostos secundários (Chaudhary et al., 2019) e, portanto, a metabolômica pode ser uma ferramenta útil na busca de novas fontes de resistência de plantas (Emani, 2018). Portanto, este estudo avaliou potenciais características de resistência constitutiva em oito genótipos comerciais de soja e dois genótipos padrões de resistência e suscetibilidade a *S. cosmioides*. Também foram realizados estudos de metabolômica nos genótipos de soja e os resultados foram correlacionados com as respostas biológicas observadas em lagartas de *S. cosmioides*.

2. Material e Métodos

2.1. Condições experimentais

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, Brasil. Os ensaios em laboratório foram conduzidos sob condições controladas com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, e fotoperíodo de 12C:12E h.

2.2. Insetos

Os insetos utilizados nos experimentos foram provenientes de uma colônia mantida a 23 gerações no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos da UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, iniciada a partir de ovos provenientes de uma linhagem mantida em dieta artificial do Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Os insetos foram mantidos em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, e 12C:12E horas de fotoperíodo e criados em dieta artificial elaborada segundo a metodologia de Greene et al. (1976). Anualmente são adicionados indivíduos de campo coletados em plantas de amendoim para manutenção da variabilidade genética.

2.3. Plantas

Foram avaliados genótipos comerciais de soja UFUS Xavante, UFUS Milionária, UFUS Impacta, UFUS Carajás, UFUS Capim Branco, CD 208, ANTA 82 RR e M8230 RR; além dos genótipos PI227682 e P98Y11RR, classificados previamente como resistente e suscetível, respectivamente (Boiça Júnior et al., 2015) (Tabela 1). Plantas dos respectivos genótipos foram cultivadas em vasos de polietileno de 5 L de volume contendo substrato à base de solo Latossolo Vermelho Distrófico (Andrioli e Centurion, 1999), areia e composto orgânico, na proporção de 2:1:1. Os vasos com as plantas de soja foram mantidos em casa de vegetação vedada com tela antiafídeo até sua utilização nos ensaios.

Tabela 1. Genótipos de soja avaliados para resistência à *Spodoptera cosmioidea* e suas características de resistência e suscetibilidade a outros insetos-praga.

Genótipos	Característica	Histórico de Resistência a Lepidópteros
PI 227682 ¹	Altamente Resistente	<i>S. cosmioidea</i> (Boiça Júnior et al., 2015; Freitas, 2016); <i>Spodoptera eridania</i> (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) (Souza et al., 2012; Souza et al., 2014); <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1805) (Lepidoptera: noctuidae) (Moraes, 2017)
P98Y11RR ²	Altamente Suscetível	<i>S. cosmioidea</i> (Boiça Júnior et al., 2015; Freitas, 2016)
UFUS Carajás ²	Suscetível	<i>Chloridea virescens</i> (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (Eduardo, 2018)
UFUS Impacta ²	Moderadamente resistente	<i>C. virescens</i> (Eduardo, 2018)
UFUS Xavante ²	Altamente resistente	<i>C. virescens</i> (Eduardo, 2018)
UFUS Capim Branco ²	Moderadamente resistente	<i>C. virescens</i> (Eduardo, 2018)
UFUS Milionária ²	Altamente resistente	<i>C. virescens</i> (Eduardo, 2018)
ANTA 82 RR ²	Moderadamente resistente	<i>H. armigera</i> (Moraes, 2017); <i>C. virescens</i> (Moraes, 2017)
CD 208 ²	Suscetível	<i>H. armigera</i> (Moraes, 2017)
M8230 RR ²	Resistente por antibiose e oviposição	<i>H. armigera</i> (Moraes, 2017)

¹ – Genótipo não comercial; ² – Genótipos comerciais.

Em todos os experimentos foram utilizados folíolos coletados do 5º e 6º trifólios a partir do ápice (parte inferior) de plantas dos genótipos em estágio reprodutivo R1-R2 (Fehr e Caviness, 1977) cultivadas em casa de vegetação segundo metodologia de Freitas (2016). Para realizar os bioensaios de preferência alimentar e desenvolvimento de *S. cosmioidea*, os folíolos coletados foram levados ao laboratório, enxaguados em água corrente, e em seguida secos em papel toalha à temperatura ambiente. Os folíolos simétricos laterais foram utilizados no ensaio de preferência alimentar enquanto os folíolos centrais foram utilizados no ensaio que avaliou o desenvolvimento de *S. cosmioidea*.

Para realizar as análises de metabólitos secundários, os folíolos coletados foram imediatamente armazenados em nitrogênio líquido e conduzidos ao laboratório, onde foram mantidos em ultra freezer (-80 Cº) até a extração e análise dos metabólitos.

2.4. Preferência alimentar de *Spodoptera cosmioides*

Os testes de preferência alimentar com chance e sem chance de escolha foram realizados com o uso do folíolo inteiro como substrato alimentar com base nos resultados de Freitas et al. (2017), que obtiveram melhor distinção quanto às características de resistência constitutiva entre genótipos de soja a *S. cosmioides* em relação ao disco foliar quando oferecido como substrato alimentar.

No teste com chance de escolha, folíolos dos genótipos foram distribuídos em arenas confeccionadas com bandejas circulares de alumínio de 35 cm de diâmetro forradas com papel filtro umedecido. No centro de cada arena, uma lagarta de terceiro ínstar de *S. cosmioides* por genótipo foi liberada com auxílio de um pincel fino, e a movimentação larval foi observada após 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas do início do experimento. Após este período, a área foliar consumida pelas lagartas foi avaliada com o auxílio de um aparelho medidor de área foliar eletrônico (LI-COR, modelo 3100A®, Lincoln, NE, EUA). O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 10 repetições, sendo cada repetição representada por uma arena de Petri.

No teste sem chance de escolha, os folíolos foram individualizados em recipientes plásticos cilíndricos de 8 cm de altura x 5 cm de diâmetro, forrados com papel filtro umedecido. Em seguida, uma lagarta de terceiro ínstar de *S. cosmioides* foi liberada em cada recipiente, e as avaliações de movimentação larval e quantificação da área foliar consumida foram realizadas como descrito no teste com chance de escolha. Este ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo cada repetição representada por recipiente.

2.5. Índices nutricionais de *Spodoptera cosmioides*

Os folíolos centrais de cada trifólio provenientes dos genótipos de soja foram coletados e preparados como descrito anteriormente, exceto que para este experimento os folíolos foram cortados em discos foliares preparados com auxílio de vazador metálico de 2,5 cm de diâmetro e em seguida foram transferidos para placas de Petri (9 cm de diâmetro) forradas com papel filtro umedecido. Embora a utilização

de folíolo inteiro permita melhor distinção quanto aos níveis de resistência constitutiva(Freitas et al., 2017), optou-se por utilizar discos foliares para avaliar o desenvolvimento de *S. cosmioides*, pois as plantas utilizadas estavam em estágio de desenvolvimento reprodutivo e com isso os folíolos do terço inferior apresentavam maior área foliar, o que poderia prolongar o tempo necessário para o consumo foliar e possivelmente comprometendo a qualidade nutricional da folha e interferência no desenvolvimento das lagartas.

Ao todo foram preparados 10 discos foliares por genótipo de folíolos centrais para serem oferecidos às lagartas de *S. cosmioides* para avaliação dos índices nutricionais e cinco foram preparados e utilizados como amostras adicionais por genótipo, pesados em balança analítica de precisão (Ohaus®, Parsippany, NJ, EUA), e mantidos nas mesmas condições dos tratamentos para posteriormente serem utilizados como alíquotas do peso seco inicial para o cálculo dos índices nutricionais, segundo metodologia de Waldbauer (1968).

Posteriormente, lagartas de terceiro ínstar de *S. cosmioides* coletadas da colônia de manutenção foram privadas de alimentação por 6 h para limparem o trato intestinal, e pesadas em balança analítica de precisão. Em seguida, as lagartas foram transferidas individualmente com o auxílio de um pincel fino para as placas de Petri, onde se alimentaram durante 37 horas, período necessário para que um dos discos foliares tivesse área foliar consumida em aproximadamente 80%. Após este período, as lagartas, a sobra do alimento oferecido e os folíolos separados como alíquotas foram secos em estufa (Odontobrás®, modelo EL 1.4, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) a 60°C por 48 h até atingirem peso constante, e pesados em balança analítica. Os valores de peso seco destes parâmetros foram utilizados para o cálculo dos seguintes índices nutricionais: taxa de consumo relativa (RCR); taxa de crescimento relativa (RGR); eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI); eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) e digestibilidade aproximada (AD) (Waldbauer, 1968).

2.6. Análise de metabólitos secundários em soja

Para avaliar a expressão de compostos não voláteis, amostras do material vegetal de cada tratamento foram liofilizadas (Liofilizador E-C Modulyo, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e submetidas à extração sólido-líquido com mistura extratora composta por metanol:água (1:1 v/v) em banho ultrassom 40 kHz por cinco minutos (USC 1400 Unique, São Paulo, Brasil). Este processo foi realizado por seis ciclos. Em seguida, os extratos foram centrifugados ($3.214\times g$, durante 1 min a 10°C) e o sobrenadante filtrado em membrana de PTFE de $0,22\ \mu\text{m}$. Posteriormente, $250\ \mu\text{L}$ dos extratos obtidos foram diluídos em água ($740\ \mu\text{L}$), adicionou-se $10\ \mu\text{L}$ de uma solução usada como padrão interno (caféina – $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Foram realizadas análises metabolômicas por sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC, modelo 1290, Agilent Technologies, CA, USA) equipado com um detector de arranjo de diodo (DAD) e uma coluna Fenil-hexil Zorbax RRHD Eclipse Plus ($21\times 100\ \text{mm}$, $1.8\ \mu\text{m}$, Agilent) como fase estacionária. A temperatura do forno da coluna e do autoamostrador foram 45°C e 10°C , respectivamente. Um gradiente de fluxo constante ($0,35\ \text{mL min}^{-1}$) combinado à um solvente A (ácido fórmico 0,1 %/água) e o solvente B (ácido fórmico 0,1%/ metanol) foi utilizado nas seguintes condições: 8-90% B (0-17 min) e 90% B(17-20 min) com “post run” de quatro minutos. O volume de injeção foi de $1\ \mu\text{L}$.

A detecção por espectrometria de massas (EM) foi realizada em um sistema do tipo quadrupolo-tempo de voo (LC-6545 qToF MS, Agilent Technologies, CA, USA) equipado com uma fonte de ionização eletrospray (ESI) no modo de íon positivo e negativo e tensão capilar de 3.5 kV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram de 350°C . O fluxo do gás de dessolvatação foi de $11\ \text{L min}^{-1}$ e o fluxo de gás no cone foi de $8\ \text{L min}^{-1}$, com fragmentador de 250V, voltagem do “skimmer” de 65V e “nozzle” de 1000V. Os dados de EM foram coletados em uma faixa de 100 a 1000 Da. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com os dados espectrais da biblioteca (METLIN) e com base nos dados de massa monoisotópica.

Os dados de EM de metabólitos secundários foram analisados através do software “Mass Hunter Qualitative Analysis Workflows B.08.00” (Agilent Technologies, CA, USA), utilizado para processar os dados brutos obtidos nas análises

cromatográficas dos compostos fixos e convertê-los em formato “.CEF”. Nesta etapa, o algoritmo “Molecular Feature Extraction” (MFE) foi aplicado para remover sinais m/z que poderiam ser atribuídos ao ruído do instrumento e a mistura extratora (branco da extração). Também se realizou uma estimativa de fórmulas moleculares. Em seguida, o software “Mass Profiler Professional B.13.00 – MPP” (Agilent Technologies, CA, USA) foi utilizado para auxiliar a encontrar diferenças significativas entre os grupos amostrais obtidos para os compostos não voláteis e voláteis.

O software MPP permite o alinhamento e normalização dos picos para cada cromatograma. Dessa forma, foi aplicada uma tolerância de 0,1% e 0,15 min para o tempo de retenção, 5 ppm e 2,0 mDa para as massas e uma correção na linha de base. Assim, um único conjunto de dados armazenado como uma matriz foi criado e analisado. Para a exploração dos dados e agrupamento das amostras utilizou-se teste t e análise de cluster através do método de Ward a partir da distância Euclidiana. A correção de Benjamini Hochberg FDR foi aplicada e um nível de probabilidade de $p < 0.05$ e “fold-change” > 2.0 foram selecionados para a determinação dos potenciais biomarcadores.

Para avaliar a expressão dos compostos voláteis, amostras de 0,100 g do material vegetal de cada tratamento e 1,0 g de glicerol foram submetidas à extração por “headspace” em frascos de 20 mL por 25 minutos à 120°C. O Mentol foi utilizado como padrão interno, com adição de 10 μL de solução 500 mg.L^{-1} ao frasco de “headspace”. Os frascos foram lacrados com tampa de alumínio e septo de PTFE/SIL. As amostras foram submetidas à extração por “headspace” estático. As amostras foram injetadas através de seringa PALSyr HS 2,5 mL em sistema injetor automático de amostras (Combi-PAL AOC-5000, Shimadzu).

Os compostos voláteis foram analisados em cromatógrafo a gás (CG-MS/MS, modelo QT8040, Shimadzu Scientific Instruments, MD, USA) por meio de uma coluna capilar ZB-Wax (Phenomenex, fase estacionária polietilenoglicol, 30 m x 0,25 mm, d.i. x 0,25 μm espessura do filme) e Hélio como gás de arraste (1 mL.min^{-1}). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor 220°C; a temperatura da coluna inicialmente a 40°C foi mantida por 5 min, posteriormente foi aquecida a uma taxa de 8°C.min⁻¹ até 240°C permanecendo nesta temperatura por 3 min. A temperatura de transferência da interface foi de 250°C e da fonte de íons de 280 °C.

A injeção realizada foi do tipo “split” (15:1) e o volume de amostra introduzido foi de 1000 µL. O analisador de massas quadrupolar foi operado com varredura na faixa de 40 a 500 u. Os espectros foram adquiridos no modo “full scan” numa faixa de 40 a 500 Da. no modo impacto de elétrons (70 eV).

A identificação dos compostos voláteis foi realizada por comparação com os dados espectrais obtidos a biblioteca NIST 17.0 (“National Institute of Standards and Technologies, Mass Spectra Libraries”). A solução GCMS, os softwares “Real Time Analysis” e “Post Run”, versão 4.11 (Shimadzu), foram utilizados para aquisição e análise de dados, respectivamente.

2.7. Análise de dados

Os dados de frequência de lagartas presentes (FLP) nos genótipos nos tempos avaliados foram comparados pelo teste Qui-quadrado ($\alpha = 0.05$) através do procedimento PROC FREQ. A preferência alimentar e índices nutricionais foram analisados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha = 0.05$) e homogeneidade das variâncias pelo teste de Brown-Forsythe ($\alpha = 0.05$), e submetidos à análise exploratória para identificar possíveis valores “outliers” ou influentes. Quando necessário os dados foram transformados de acordo com o teste de Box-Cox, pelo procedimento PROC TRANSREG. As análises foram realizadas através do software estatístico SAS® versão 9.4 (SAS, 2013).

Posteriormente, os dados de preferência alimentar e índices nutricionais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através dos procedimentos PROC GLM (one-way ANOVA) através do programa SAS® versão 9.4. Quando significativo, as médias da preferência alimentar foram comparadas pelo teste de Scott-Knott pelo software estatístico SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2010) e as médias dos índices nutricionais foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$) pelo software estatístico SAS® versão 9.4.

Os índices de preferência (IP) foram calculados de acordo com a seguinte fórmula, adaptada de Kogan (1970): $IP = 2A / (A+T)$; onde A = número de lagartas presentes no genótipo determinado como padrão de suscetibilidade; T = número de lagartas presentes no genótipo a ser confrontado. O genótipo P98Y11RR,

previamente avaliado por Boiça Júnior et al (2015), foi escolhido como padrão de suscetibilidade a *S. cosmioides*. Para os cálculos, considerou-se a média de lagartas presentes em cada genótipo nos tempos 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas. A construção dos gráficos de FLP e IP foi realizada através do software SigmaPlot versão 14.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

Os dados de preferência alimentar e desenvolvimento de *S. cosmioides* foram submetidos à análise multivariada com intuito de auxiliar no agrupamento dos genótipos de soja de acordo com os níveis de resistência. Para os dados de desenvolvimento, foram considerados apenas os índices nutricionais de maior influência na distinção dos grupos pela análise de componentes principais (RCR, RGR, ECI e AD). Assim, realizou-se a análise de agrupamento através da medida de dissimilaridade Euclidiana pelo método hierárquico de Ward (Ward, 1963) e, em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância multivariada (MANOVA) ($\alpha = 0,05$). Os parâmetros de maior influência foram verificados através da análise de componentes principais, e auxiliaram na distinção dos grupos formados de acordo com os níveis de resistência por antixenose e antibiose através da matriz de correlação de autovetores. Todas as análises multivariadas foram analisadas pelo software STATISTICA® versão 7.0 (Statsoft Inc, 2004).

3. Resultados

3.1. Preferência alimentar de *Spodoptera cosmioides*

Os resultados encontrados demonstram que o número de lagartas de *S. cosmioides* atraídas nos genótipos de soja diferiu significativamente no teste com chance de escolha ($\chi^2 = 24,08$; $df = 9$; $p = 0,0042$) (Figura 1a). O menor número de lagartas foi observado nos genótipos PI227682, UFUS Milionária, UFUS Carajás e M8230RR.

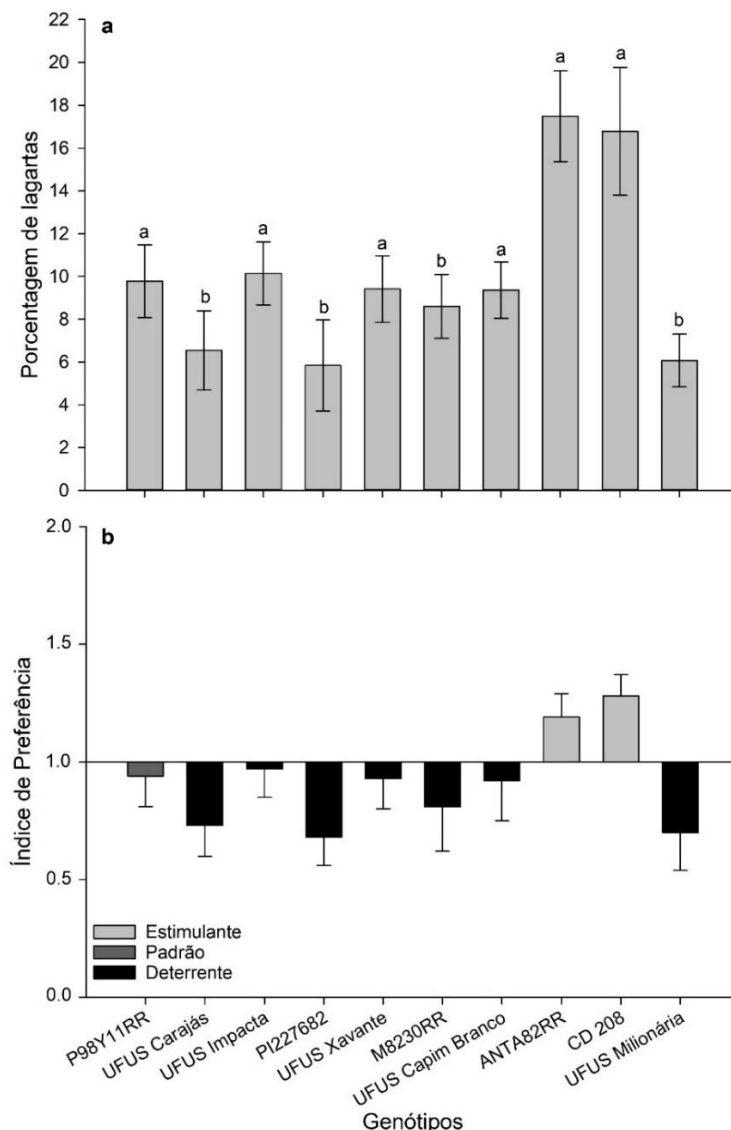


Figura 1. Porcentagem (a) e índice de preferência (b) de lagartas (% $\pm$ EP) de *Spodoptera cosmioides* em genótipos de soja em teste com chance de escolha. Barras com diferentes letras diferem significativamente pelo teste Qui-quadrado ($p < 0,05$).

De acordo com o índice de preferência (Figura 1b), estes genótipos foram deterrentes para lagartas de *S. cosmioides*, enquanto os genótipos Anta82RR e CD208 foram estimulantes. Já os genótipos UFUS Capim Branco, UFUS Xavante, e UFUS Impacta ocasionaram índices de preferência que variaram de 0,92 a 0,97 e foram considerados neutros em relação ao genótipo padrão de suscetibilidade (Figura 1b).

No teste sem chance de escolha, não houve diferença significativa entre os genótipos quanto ao número de lagartas ($\chi^2 = 4,49$; $df = 9$; $p = 0,8518$) (Figura 2a).

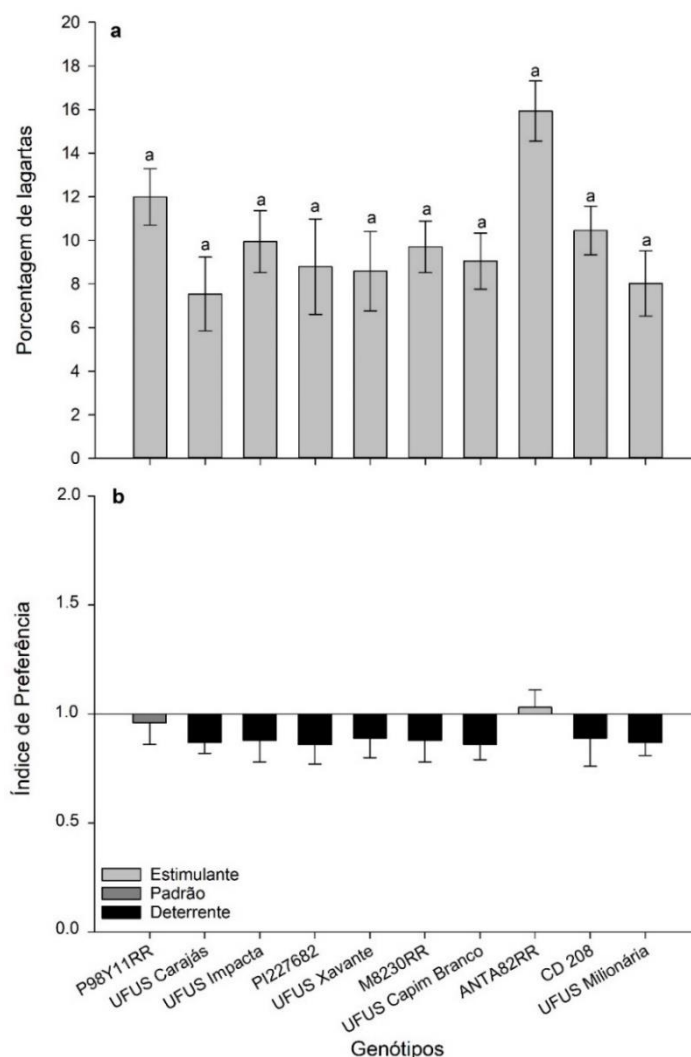


Figura 2. Porcentagem (a) e índice de preferência (b) de lagartas (% $\pm$ EP) de *Spodoptera cosmioides* em genótipos de soja em teste sem chance de escolha. Barras com diferentes letras diferem significativamente pelo teste Qui-quadrado ($p < 0,05$).

Além disso, de acordo com o índice de preferência, o genótipo Anta82RR apresentou neutralidade quanto à frequência de lagartas, enquanto para os demais genótipos os índices variaram de 0,86 a 0,89 e, portanto, foram classificados como deterrentes para *S. cosmioides*, embora a deterrência tenha ocorrido em baixa intensidade (Figura 2b).

Diferenças significativas foram observadas em relação à preferência alimentar de lagartas de *S. cosmioides* nos testes com chance ($F_{9,78} = 13,12$; $p < 0,0001$) e sem chance de escolha ($F_{9,81} = 5,65$; $p < 0,0001$) (Figuras 3 e 4).

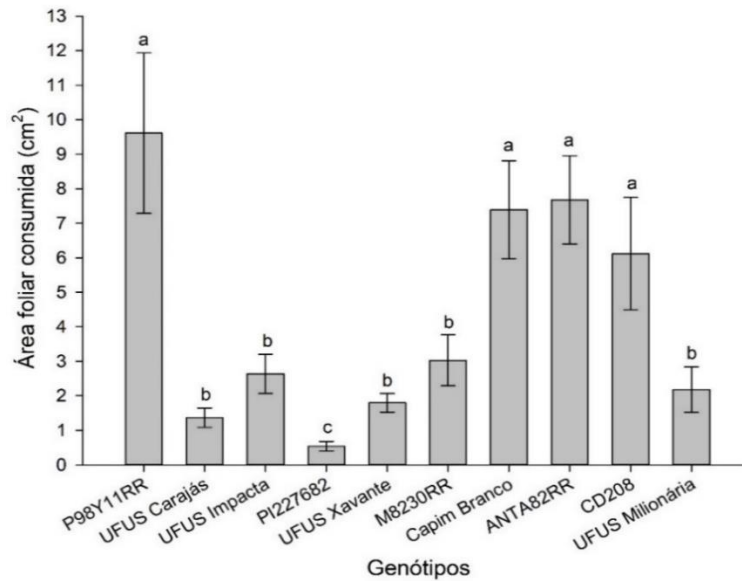


Figura 3. Área foliar consumida ($\text{cm}^2 \pm \text{EP}$) de genótipos de soja por lagartas de *Spodoptera cosmioides* em teste com chance de escolha. Barras com diferentes letras diferem significativamente pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

No teste com chance de escolha, o menor consumo foliar ocorreu em lagartas que se alimentaram no genótipo PI227682, seguido pelos genótipos UFUS Carajás, UFUS Xavante, UFUS Milionária, UFUS Impacta e M8230RR. Por outro lado, os maiores consumos foram observados nos genótipos P98Y11RR, UFUS Capim Branco, Anta82RR e CD208 (Figura 3).

No teste sem chance de escolha, o menor consumo foliar também foi observado no genótipo PI227682, seguido pelo genótipo UFUS Carajás. Os maiores consumos foliares ocorreram nos genótipos P98Y11RR e M8230RR (Figura 4).

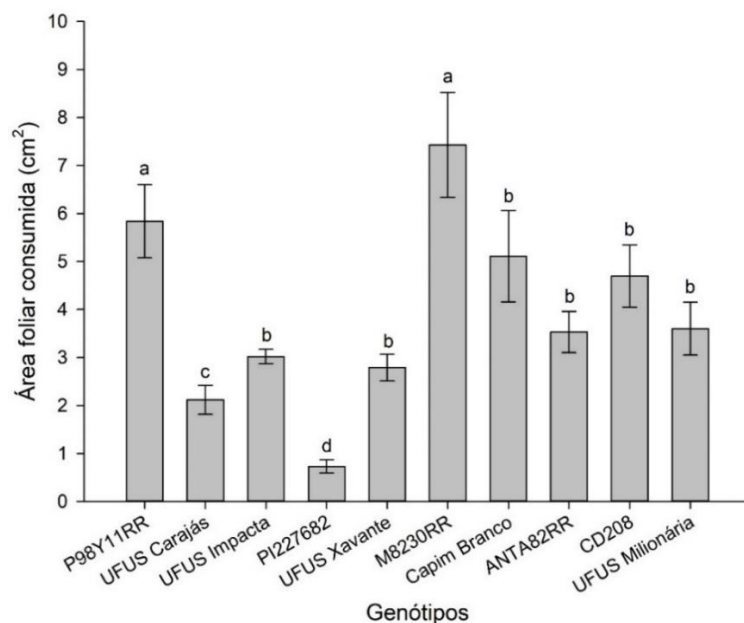


Figura 4. Área foliar consumida (cm² ± EP) de genótipos de soja por lagartas de *Spodoptera cosmioides* em teste sem chance de escolha. Barras com diferentes letras diferem significativamente pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Para auxiliar na classificação dos genótipos quanto aos níveis de resistência por preferência alimentar de lagartas de *S. cosmioides*, os parâmetros de frequência de lagartas e consumo foliar foram observados através de análises multivariadas. De acordo com os resultados, três grupos diferiram significativamente em moderadamente resistentes, suscetíveis e altamente suscetíveis ($F_{8,8} = 4,40$; $p = 0,0254$) (Figura 5). Os genótipos PI227682, UFUS Xavante, UFUS Impacta, UFUS Milionária e UFUS Carajás foram classificados como moderadamente resistentes, enquanto os genótipos UFUS Capim Branco e M8230RR; P98Y11R, Anta8230RR e CD208 foram classificados como suscetíveis e altamente suscetíveis, respectivamente.

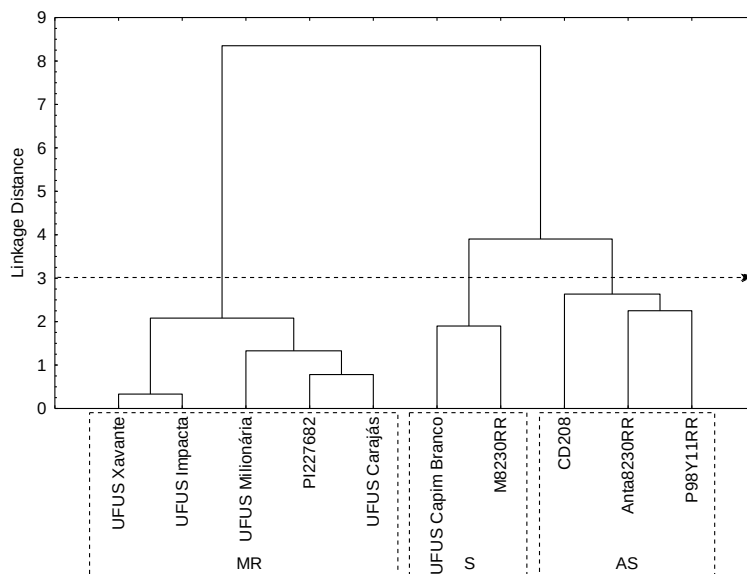


Figura 5. Análise de agrupamento de acordo com a medida de dissimilaridade Euclidiana, através do método hierárquico de Ward como estratégia de agrupamento de genótipos de soja de acordo com os níveis de resistência por preferência alimentar a *Spodoptera cosmioides*. MR – Moderadamente resistente; S – Suscetível, AS – Altamente suscetível. Grupos significativamente diferentes pelo teste de Wilks ($p < 0,05$).

Os parâmetros de maior influência na distinção dos grupos foram observados através da análise de componentes principais (CP) (Figura 6). Os Componentes 1 e 2 concentraram 84,46 % das informações contidas nas variáveis originais, e demonstraram elevada qualidade de representação dos resultados. De acordo com a matriz de correlação de autovetores, os parâmetros de maior influência no CP 1 para a distinção dos níveis de resistência dos genótipos foram a área foliar consumida em teste com chance (AFCC), frequência de lagartas presentes em teste sem chance de escolha (FLSC) e frequência de lagartas presentes em teste com chance de escolha (FLCC), enquanto o parâmetro que mais influenciou o CP 2 foi a área foliar consumida em teste sem chance de escolha (AFSC) (0,82).

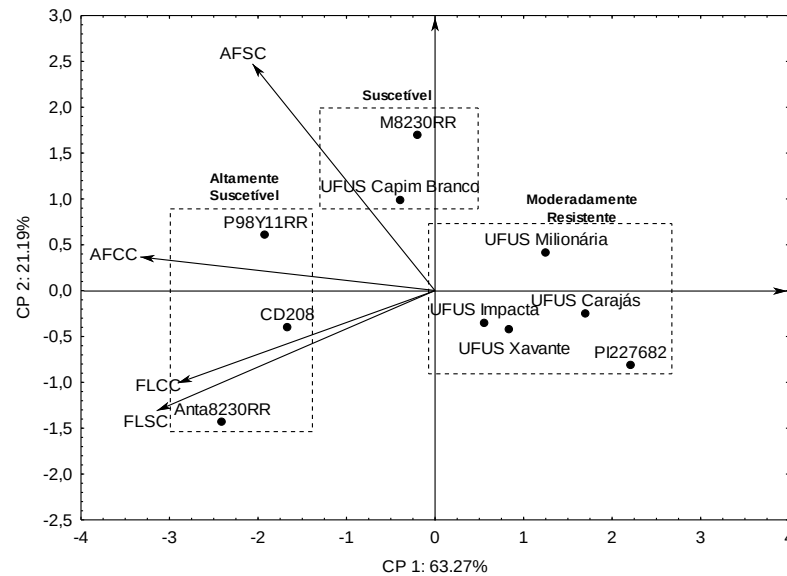


Figura 6. Análise de componentes principais da preferência alimentar de *Spodoptera cosmioides* em genótipos de soja. FLCC – frequência de lagartas presentes em teste com chance de escolha; FLSC – frequência de lagartas presentes em teste sem chance de escolha; AFCC – Área foliar consumida com chance; AFSC – Área foliar consumida sem chance.

1.1. Índices nutricionais de *Spodoptera cosmioides*

Em relação aos índices nutricionais, não foram observadas diferenças significativas quanto à taxa de consumo relativa (RCR) ($F_{9,87} = 1,59$; $p = 0,1319$), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) ($F_{9,87} = 1,31$; $p = 0,2420$), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) ($F_{9,87} = 0,95$; $p = 0,4887$) e digestibilidade aproximada (AD) ($F_{9,87} = 1,36$; $p = 0,2208$) em lagartas de *S. cosmioides* alimentadas nos diferentes genótipos (Tabela 2). No entanto, os genótipos UFUS Milionária, PI227682, UFUS Carajás e UFUS Xavante influenciaram significativamente o desenvolvimento de *S. cosmioides* (RGR) ($F_{9,90} = 2,36$; $p = 0,0193$) e ocasionaram as menores taxas de crescimento larval.

Tabela 2. Taxas de consumo relativo (RCR), crescimento relativo (RGR), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) e digestibilidade aproximada (ED) de lagartas de *Spodoptera cosmioides* alimentadas em genótipos de soja.

Genótipos	Índices Nutricionais				
	RCR (mg.mg ⁻¹ .dia ⁻¹)	RGR (mg.mg ⁻¹ .dia ⁻¹)	ECI (%)	ECD (%)	AD (%)
P 98Y11 RR	1,49±0,14a	0,42±0,02a	30,20±2,64a	37,58±03,92a	81,87±1,58a
UFUS Carajás	1,27±0,04a	0,34±0,02b	27,58±1,82a	33,36±02,61a	83,44±1,09a
UFUS Impacta	1,00±0,16a	0,37±0,02a	33,61±4,62a	44,30±07,96a	79,83±2,77a
PI 227682	1,50±0,18a	0,32±0,02b	23,38±3,77a	28,41±05,42a	85,96±2,26a
UFUS Xavante	1,37±0,05a	0,34±0,03b	25,39±2,68a	30,58±03,64a	84,76±1,61a
M8230 RR	1,48±0,18a	0,42±0,01a	26,34±3,01a	46,30±14,78a	80,65±3,89a
UFUS Capim Branco	1,52±0,06a	0,38±0,02a	25,61±1,83a	30,57±02,62a	84,63±1,10a
ANTA 82 RR	1,31±0,15a	0,39±0,02a	34,79±5,78a	48,31±11,21a	79,15±3,47a
CD 208	1,22±0,11a	0,38±0,02a	33,92±3,71a	44,06±05,82a	79,64±2,22a
UFUS Milionária	1,20±0,12a	0,31±0,03b	25,86±3,86a	45,10±14,16a	81,06±4,00a
F	1,59	2,36	3,31	F = 0,95	F = 1,36
p	0,1319 ^{ns}	0,0193	0,242 ^{ns}	P = 0,4887 ^{ns}	P = 0,2208 ^{ns}

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} - não significativo.

Embora os demais parâmetros nutricionais analisados individualmente não tenham diferido significativamente entre os genótipos, houve distinção significativa dos grupos formados através da análise multivariada de agrupamento hierárquico. De acordo com os resultados, foi possível observar distinção dos genótipos em três grupos: moderadamente resistente, suscetível e altamente suscetível ($F_{8,8} = 5,87$; $p = 0,0108$) (Figura 7). Os genótipos PI227682, UFUS Xavante, UFUS Milionária e UFUS Carajás foram classificados como moderadamente resistentes, enquanto os genótipos Anta82RR, CD208 e UFUS Impacta foram classificados como suscetíveis. Já os genótipos P98Y11RR e M8230RR foram agrupados como altamente suscetíveis a *S. cosmioides* na categoria antibiose.

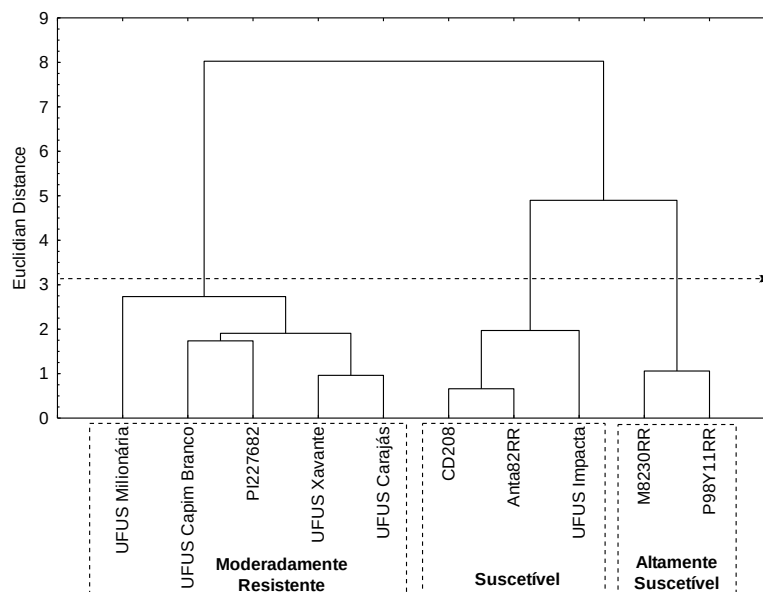


Figura 7. Análise de agrupamento de acordo com a medida de dissimilaridade Euclidiana, através do método hierárquico de Ward como estratégia de agrupamento de genótipos de soja de acordo com os níveis de resistência determinados a partir dos índices nutricionais de lagartas de *Spodoptera cosmioides*. Grupos significativamente diferentes pelo teste de Wilks ($p < 0,05$).

Os índices nutricionais de maior influência na distinção dos grupos de resistência foram observados através da análise de componentes principais (CP) (Figura 8). Os CP 1 e 2 concentraram 93,12 % das informações contidas nas variáveis originais, garantindo elevada qualidade de representação dos resultados. De acordo com a matriz de correlação de autovetores, os índices mais influentes no CP 1 para a distinção dos níveis de resistência dos genótipos foram ECI e AD, enquanto os índices que mais influenciaram o CP 2 foram RCR e RGR.

1.2. Análise de metabólitos secundários em soja

Diferenças significativas foram observadas quanto ao número total de compostos secundários não voláteis detectados nas plantas de soja ($F_{9,20} = 4,45$; $p = 0,0026$) (Figura 9). O maior número de compostos encontrados foi observado no genótipo PI227682 em relação aos genótipos P98Y11RR, UFUS Impacta, UFUS Xavante, UFUS Capim Branco e CD208. O número total de compostos voláteis

detectados nos genótipos variou entre 79,33 e 85,33, entretanto, não foram observadas diferenças significativas ($F_{9,20} = 0,59$; $p = 0,7926$) (Figura 9).

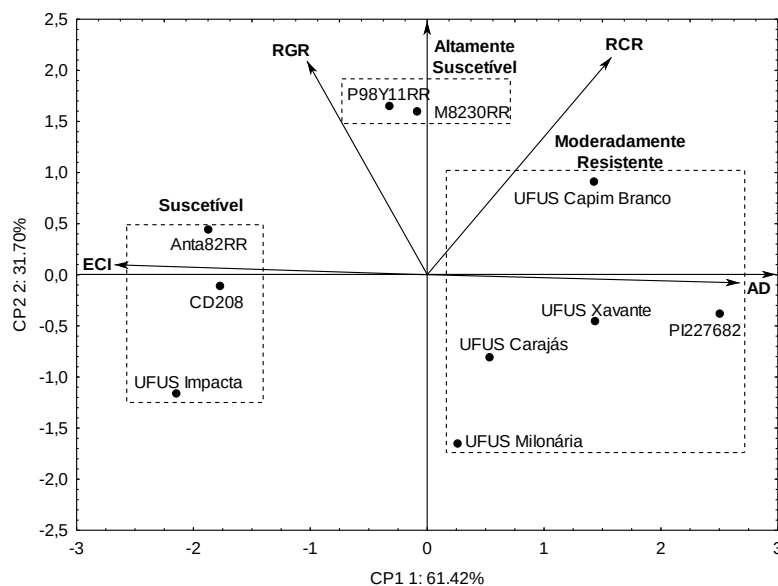


Figura 8. Análise de componentes principais dos parâmetros biológicos de *Spodoptera cosmioides* em genótipos de soja. RCR – Taxa de consumo relativo; RGR – Taxa de crescimento relativo; ECI – Eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD – Eficiência de conversão do alimento digerido; AD – Digestibilidade aproximada.

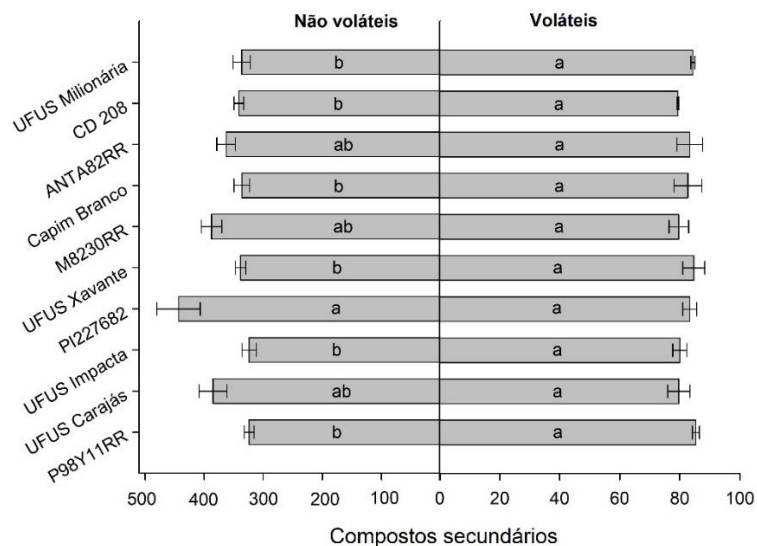


Figura 9. Número total de metabólitos secundários (Média ± EP) encontrados em genótipos de soja. Barras com diferentes letras diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Além disso, os metabólitos secundários não voláteis e voláteis encontrados foram comparados através da análise de agrupamento hierárquico combinado com mapa de calor, e os grupos foram formados de acordo com a similaridade de

abundância e efeitos no comportamento e desenvolvimento de *S. cosmioides*. Quando observados os compostos não voláteis, os genótipos foram separados em três principais grupos, que foram: (i) P98Y11RR, UFUS Carajás, UFUS Impacta; (ii) M8230RR, UFUS Capim Branco e UFUS Milionária; e (iii) CD208, UFUS Xavante e Anta82RR (Figura 10). O genótipo PI227682 não apresentou similaridade de abundância entre os genótipos e, portanto, não foi incluído nos grupos. Em relação aos metabólitos voláteis, também foi possível observar a formação de três principais grupos; (i) UFUS impacta e UFUS Xavante; (ii) UFUS Milionária, UFUS Carajás e PI227682; e (iii) Anta82RR, UFUS Capim Branco, P98Y11RR e CD208 (Figura 11). O genótipo M8230RR não foi incluído entre os grupos uma vez que não foi observada similaridade de abundância de voláteis entre os genótipos.

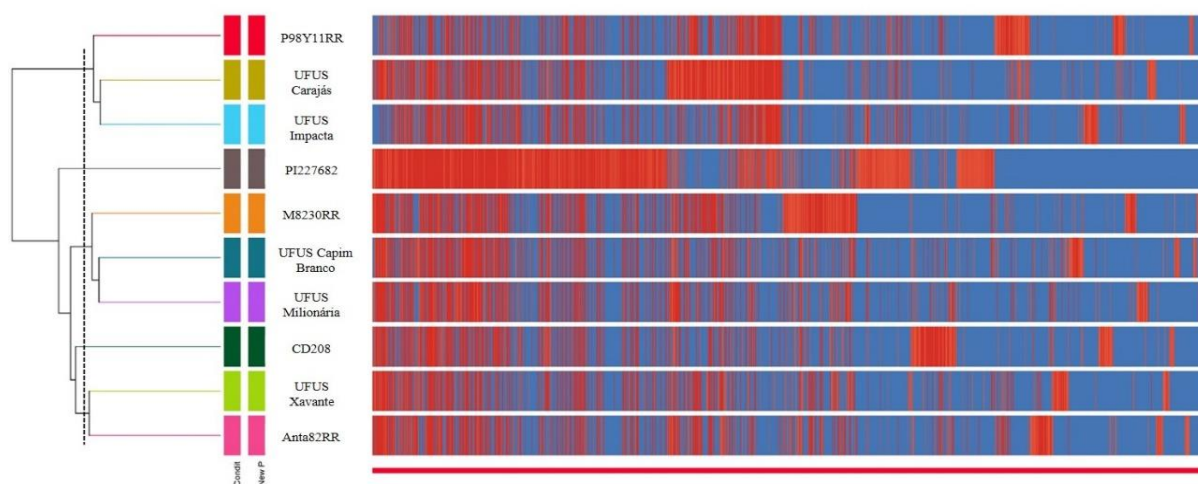


Figura 10. “Heatmap” e agrupamento hierárquico dos perfis de metabólitos secundários não voláteis em genótipos de soja de acordo com a similaridade de abundância. As colunas representam o agrupamento das três repetições biológicas dos genótipos, enquanto as linhas representam os metabólitos. O aumento na intensidade de vermelho e azul indicam abundância elevada ou diminuta, respectivamente, de um metabólito em relação a abundância mediana do metabólito.

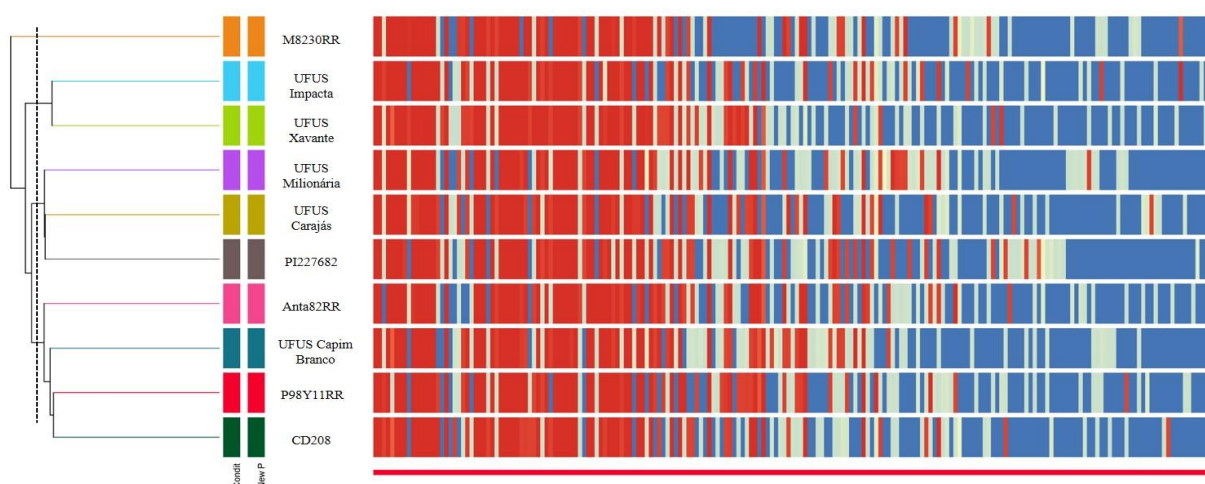


Figura 11. “Heatmap” e agrupamento hierárquico dos perfis de metabólitos secundários voláteis em genótipos de soja de acordo com a similaridade de abundância. As colunas representam o agrupamento das três repetições biológicas dos genótipos, enquanto as linhas representam os metabólitos. O aumento na intensidade de vermelho e azul indicam abundância elevada ou diminuta, respectivamente, de um metabólito em relação a abundância mediana do metabólito.

2. Discussão

Este estudo demonstrou que os genótipos de soja influenciaram a preferência alimentar e o desenvolvimento de lagartas de *S. cosmioides*, e mecanismos químicos de defesa expressos constitutivamente nas plantas estão diretamente envolvidos na resistência a *S. cosmioides* em soja. De acordo com os resultados, os genótipos PI227682, UFUS Carajás, UFUS Milionária, UFUS Impacta e UFUS Xavante apresentaram moderada resistência por antixenose a *S. cosmioides*. Além disso, os genótipos PI227682, UFUS Carajás, UFUS Milionária e UFUS Xavante também apresentaram resistência por antibiose. Através das análises químicas realizadas foi possível observar que os genótipos PI227682, UFUS Carajás e UFUS Milionária foram semelhantes quanto à abundância de compostos voláteis. É possível afirmar que compostos secundários voláteis expressos em quantidades similares estão relacionados com a expressão de resistência e ocasionam deterrência, como visto nos bioensaios de preferência alimentar e índices nutricionais. A ação destes compostos

resultou na redução do consumo foliar das lagartas nestes genótipos e afetou também o desenvolvimento de *S. cosmioides*.

O genótipo UFUS Xavante, apesar de apresentar efeitos de resistência na alimentação, não ocasionou deterrência às lagartas, assim como o genótipo UFUS Impacta, em que se observou efeito semelhante. De acordo com os perfis metabólicos, estes genótipos apresentaram similaridade de abundância de compostos voláteis e, portanto, é possível que compostos voláteis com ação deterrente sejam expressos em ambos. De fato, alguns compostos voláteis são relatados atuando diretamente na deterrência, como os sesquiterpenos, que desempenham importante papel na resistência a insetos-praga (Schoonhoven et al., 2005).

Por outro lado, os genótipos M8230RR e UFUS Capim Branco, e P98Y11RR, Anta82RR e CD208 foram classificados como suscetíveis e altamente suscetíveis à alimentação de *S. cosmioides*, respectivamente. A análise de compostos voláteis também revelou que os genótipos classificados como suscetíveis e altamente suscetíveis apresentaram similaridade de perfil metabólico, exceto o genótipo M8230RR que apresentou perfil de voláteis distinto dos demais genótipos. Embora o genótipo M8230RR também tenha sido classificado como suscetível no teste de preferência alimentar, ocasionou efeito negativo no comportamento de *S. cosmioides* que resultou em menor número de lagartas. Portanto, é possível que um ou mais compostos expressos, tenham influenciado negativamente a movimentação de lagartas de *S. cosmioides* neste genótipo. Entre os compostos voláteis com função repelente, são encontrados em plantas, inclusive em soja, alguns terpenoides da classe dos monoterpenos (Bernays e Chapman, 1994; Zhang et al., 2013).

Em geral, as plantas sintetizam uma ampla e diversificada gama de compostos secundários em múltiplas classes biosintéticas e muitos destes compostos agem diretamente contra os insetos (Douglas, 2018). Além dos compostos já mencionados, diversos outros metabólitos secundários voláteis de diferentes grupos químicos como, flavonoides, terpenoides e alcaloides são encontrados em plantas e influenciam a repelência, deterrência e/ou toxicidade em efeito sinérgico contra insetos-praga (Hanley et al., 2007; Sharma et al., 2009).

Similaridades em relação aos compostos não voláteis foram verificadas entre os genótipos UFUS Impacta e P98Y11RR, que foram suscetíveis, e UFUS Carajás

que apresentou resistência por antibiose a *S. cosmioides*. Embora este último tenha apresentado resistência, o efeito parece ter sido principalmente devido à ação de compostos voláteis expressos neste genótipo, como discutido anteriormente. Por outro lado, os genótipos UFUS Impacta e UFUS Carajás expressaram resistência na categoria antixenose e a similaridade de abundância indica que pode haver a ação de compostos não voláteis que ocasionaram deterrência para alimentação e consequente redução no consumo foliar. Assim, os compostos não voláteis similares entre os dois genótipos parecem exercer influência apenas na alimentação.

O genótipo UFUS Capim Branco apresentou suscetibilidade à alimentação das lagartas e foi agrupado de acordo com a semelhança em relação aos compostos voláteis expressos nos outros genótipos suscetíveis para alimentação e antibiose. No entanto, este genótipo ocasionou baixa ECI em lagartas de *S. cosmioides*, de acordo com a análise de componentes principais, o que pode ter resultado na elevada RCR em relação aos índices nutricionais e área foliar consumida no teste de preferência com chance de escolha como estratégia para compensar a baixa conversão do alimento ingerido (Cloutier et al., 2000; Kondoh e Williams, 2001; Karban, 2019).

Embora o elevado consumo foliar tenha demonstrado suscetibilidade deste genótipo para preferência alimentar, sugerindo não haver ação de compostos voláteis, o genótipo UFUS Capim Branco ocasionou resistência por antibiose e foi semelhante quanto à abundância de compostos não voláteis encontrados nos genótipos M8230RR e UFUS Milionária, sendo que este último também foi considerado resistente por antibiose. Portanto, ambos os genótipos UFUS Capim Branco e UFUS Milionária parecem expressar compostos não voláteis tóxicos e/ou anti-nutritivos a *S. cosmioides*. Em relação a M8230RR, é possível inferir que este genótipo expressa um ou mais compostos não voláteis também presentes nos genótipos UFUS Capim Branco e UFUS Milionária que não estejam envolvidos diretamente na resistência a *S. cosmioides*. Embora diversos metabólitos secundários tenham efeitos contra herbívoros e outros fatores bióticos, alguns compostos possuem diferentes funções ecológicas, como interações competitivas entre plantas ou fatores abióticos (Schoonhoven et al., 2005).

A análise química de metabólitos não voláteis demonstrou que o genótipo PI228672, conhecido por apresentar resistência a outros insetos-praga da soja (Souza

et al., 2012; Souza et al., 2014; Boiça Júnior et al., 2015; Almeida et al., 2017), expressou significativamente maior número total, além de apresentar perfil metabólico distinto quanto à abundância de compostos em relação aos demais genótipos. Portanto, o genótipo PI227682 pode expressar compostos não voláteis qualitativa e quantitativamente exclusivos que, possivelmente estão envolvidos na elevada expressão de resistência por antixenose e antibiose a *S. cosmioides*.

Estudos que avaliaram a expressão de compostos secundários em soja, identificaram os flavonoides rutina e genistina em folhas do genótipo PI227687, originado de mesma linhagem do genótipo PI227682 e resistente diversas espécies-praga (Hoffmann-Campo et al., 2001; Hoffmann-Campo et al., 2006). Assim, ressalta-se a importância do genótipo PI227682, como valiosa fonte de resistência a insetos e estudos futuros mais detalhados, que busquem identificar tais compostos envolvidos na expressão de resistência a *S. cosmioides*.

As diferenças encontradas quanto aos perfis metabólicos dos genótipos de soja e os efeitos observados no comportamento de alimentação e desenvolvimento de lagartas de *S. cosmioides*, demonstram que diversos metabólitos secundários estão envolvidos na expressão de resistência contra esta espécie. Portanto, a partir de estudos relacionados ao perfil metabólico é possível elucidar a função e regulação de compostos em plantas, e estas informações podem auxiliar na busca e caracterizações fenotípicas desejáveis em trabalhos de resistência a insetos-praga (Chaudhary et al., 2019).

É importante ressaltar que outros mecanismos químicos de resistência podem atuar individualmente ou em sinergismo com os metabólitos, como proteínas de defesa (Howe e Schaller, 2008), que não foram avaliadas neste estudo. Além disso, outros mecanismos de resistência como características morfológicas (Schoonhoven et al., 2005; Howe e Schaller, 2008) podem estar presentes nestes genótipos e devem ser avaliados futuramente.

Resultados interessantes foram encontrados neste estudo uma vez que alguns genótipos comerciais, como UFUS Carajás, UFUS Xavante e UFUS Milionária, apresentaram resistência por antixenose e antibiose a *S. cosmioides* e, portanto, são recursos promissores como estratégia alternativa de manejo de pragas, prontamente disponível para cultivo em áreas de produção de soja convencional. Entretanto,

futuros trabalhos devem ser conduzidos para avaliar o desempenho destes genótipos e a expressão de suas características de resistência em condições de campo para lagartas de *S. cosmioides*.

A partir de estudos dos perfis metabólicos, foi possível observar alguns dos possíveis mecanismos responsáveis pela expressão de resistência nestes genótipos, e trabalhos posteriores poderão elucidar quais compostos secundários e a quantidade em que estes compostos são expressos nas plantas, que poderão ser utilizadas como fontes de resistência para a utilização em programas de melhoramento (Douglas, 2018). Adicionalmente, através do melhoramento convencional ou engenharia genética, estas características de resistência podem ser combinadas, por exemplo, com a expressão de proteínas inseticidas derivadas de Bt, promovendo efeito aditivo de resistência à esta e outras espécies-praga na cultura da soja (Malone et al., 2008; Ortega et al., 2016; Douglas, 2018).

Este trabalho demonstrou que os genótipos de soja influenciaram no comportamento e desenvolvimento de lagartas de *S. cosmioides* e que metabólitos secundários estão envolvidos na expressão de resistência nestes genótipos. Os genótipos UFUS impacta e UFUS Capim Branco apresentam resistência por antixenose e antibiose, respectivamente, enquanto os genótipos PI227682, UFUS Carajás, UFUS Xavante e UFUS Milionária, apresentam resistência por antixenose e antibiose a *S. cosmioides*. De acordo com as análises químicas, observa-se que a caracterização dos perfis metabólicos de compostos voláteis permite melhor distinção dos grupos de acordo com os traços de resistência.

Os genótipos que expressaram resistência a *S. cosmioides* demonstram que a inserção destas características em genótipos comerciais deve ser uma estratégia a ser utilizada em programas de melhoramento genético e, estes genótipos demonstraram ser valiosas fontes que podem ser incorporadas em outros genótipos por meios convencionais e/ou engenharia genética, e podem ser combinadas a outras estratégias como a expressão de proteínas Bt.

4. Referências

- Almeida ACS, Silva CLT, Paiva LA, Araujo MS, Jesus FG (2017) Antibiosis in soybean cultivars to *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist** 100:334-339.
- Alyokhin A, Chen YH (2017) Adaptation to toxic hosts as a factor in the evolution of insecticide resistance. **Current Opinion in Insect Science** 21:33-38.
- Andrioli L, Centurion J (1999) Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, **Anais**. Brasília: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 1-4.
- Bernardi O, Bernardi D, Horikoshi RJ, Omoto C (2016) **Manejo da resistência de insetos a plantas Bt**. Engenheiro Coelho/SP: PROMIP. 46p.
- Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger GU, Head GP, Omoto C (2012) Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701× MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 68:1083-1091.
- Bernardi O, Sorgatto RJ, Barbosa AD, Domingues FA, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Head GP, Omoto C (2014) Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop Protection** 58:33-40.
- Bernays EA, Chapman RF (1994) **Host-plant selection by phytophagous insects**. Springer Science & Business Media. 305p.
- Boiça Júnior AL, Bottega DB, Souza BHS, Rodrigues NEL, Michelin V (2015) Determinação dos tipos de resistência a *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de soja. **Semina: Ciências Agrárias** 36:607-618.
- Capalbo DMF, Suzuki MT (2017) The Importance of *Bacillus thuringiensis* in the Context of Genetically Modified Plants in Brazil. In.: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.) **Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus**. Switzerland: Springer. p. 259-271.

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C (2013) Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One** 8:e62268.

Chaudhary G, Singh SK (2019) Global Status of Genetically Modified Crops and Its Commercialization. In.: Khoobchandani M, Saxena A (Eds.) **Biotechnology Products in Everyday Life**. Cham: Springer International Publishing. p. 147-160.

Chaudhary J, Deshmukh R, Mir ZA, Bhat JA (2019) Metabolomics: An Emerging Technology for Soybean Improvement. . In.: Khoobchandani M, Saxena A (Eds.) **Biotechnology Products in Everyday Life**. Switzerland: Springer. p. 175-186.

Cloutier C, Jean C, Fournier M, Yelle S, Michaud D (2000) Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 44:69-81.

Diez-Rodriguez GI, Omoto C (2001) Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology** 30:311-316.

Douglas AE (2018) Strategies for enhanced crop resistance to insect pests. **Annual Review of Plant Biology** 69:637-660.

Eduardo WI (2018). **Metodologia de pesquisa, níveis nas categorias de resistência constitutiva em genótipos de soja e resistência induzida a *Heliothis virescens* e os mecanismos de defesas envolvidos**. 135 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Entomologia Agrícola) - Unesp Jaboticabal.

Emani C (2018) **The Biology of Plant-insect Interactions: A Compendium for the Plant Biotechnologist**. Londres: CRC Press. 228p.

Fehr WR, Caviness CE (1977) **Stages of soybean development**. Iowa: State University of Science and Technology, 11 p. (State University of Science and Technology. Documento, 80).

Ferreira D (2010) **Sistema de análises estatísticas-Sisvar 5.6**. Lavras: Universidade Federal de Lavras.

Freitas MM (2016). **Fatores intrínsecos às plantas de soja na expressão da resistência constitutiva e induzida a *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858)(Lpidoptera: Noctuidae)**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Entomologia Agrícola) - Unesp Jaboticabal.

Freitas MM, Souza BHS, Nogueira L, Di Bello MM, Boiça Júnior ALB (2017) Soybean defense induction to *Spodoptera cosmioides* herbivory is dependent on plant genotype and leaf position. **Arthropod-Plant Interactions** 12:85-96.

Greene G, Leppla N, Dickerson W (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 69:487-488.

Hanley ME, Lamont BB, Fairbanks MM, Rafferty CM (2007) Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics** 8:157-178.

Hoffmann-Campo CB, Ramos Neto JA, Oliveira MCN, Oliveira LJ (2006) Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatilis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41:1453-1459.

Hoffmann-Campo C, Harborne J, McCaffery A (2001) Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 98:181-194.

Howe GA, Schaller A (2008) Direct defenses in plants and their induction by wounding and insect herbivores. In.: Schaller A (ed.) **Induced plant resistance to herbivory**. Dordrecht: Springer. p. 7-29.

Huang S, Han Z (2007) Mechanisms for multiple resistances in field populations of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 87:14-22.

Karban R (2019) The ecology and evolution of induced responses to herbivory and how plants perceive risk. **Ecological Entomology** 1:1-9.

Kondoh M, Williams IS (2001) Compensation behaviour by insect herbivores and natural enemies: its influence on community structure. **Oikos** 93:161-167.

Malone LA, Gatehouse AM, Barratt BI (2008) Beyond Bt: alternative strategies for insect-resistant genetically modified crops. In.: Jörg Romeis, Anthony M. Shelton, George G. Kennedy (Eds.) **Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs**. Dordrecht: Springer. p. 357-417.

Marcel M, Van Dam NM (2018) Metabolomics of plant resistance to insects **The Biology of Plant-Insect Interactions**. Boca Raton: Taylor & Francis. p. 129-149.

Moraes RFO (2017). **Técnicas de avaliação do desempenho alimentar e de oviposição, categorias e mecanismos de resistência de genótipos de soja à *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: noctuidae)**. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Entomologia Agrícola) - Unesp Jaboticabal.

Ortega MA, All JN, Boerma HR, Parrott WA (2016) Pyramids of QTLs enhance host-plant resistance and Bt-mediated resistance to leaf-chewing insects in soybean. **Theoretical and Applied Genetics** 129:703-715.

Pagano MC, Miransari M (2016) The importance of soybean production worldwide. In.: Miransari M (ed.) **Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production**. London: Elsevier. p. 1-26.

Parisi C, Tillie P, Rodríguez-Cerezo E (2016) The global pipeline of GM crops out to 2020. **Nature Biotechnology** 34 31-36.

Saleem M, Hussain D, Ghouse G, Abbas M, Fisher SW (2016) Monitoring of insecticide resistance in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from four districts of Punjab, Pakistan to conventional and new chemistry insecticides. **Crop Protection** 79:177-184.

SAS 2013. SAS/STATVR User's Guide computer program, version 9.4. By SAS, Cary, NC.

Schoonhoven LM, Van Loon JJ, Dicke M (2005) **Insect-Plant Biology**. Oxford: Oxford University Press. 412p.

Sharma H, Sujana G, Rao DM (2009) Morphological and chemical components of resistance to pod borer, *Helicoverpa armigera* in wild relatives of pigeonpea. **Arthropod-Plant Interactions** 3:151-161.

Souza B, Silva A, Janini J, Júnior AB (2014) Antibiosis in soybean genotypes and the resistance levels to *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology** 43:582-587.

Souza BHS, Boiça Júnior AL, Janini JC, Silva AG, Rodrigues L, Elisa N (2012) Feeding of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean genotypes. **Revista Colombiana de Entomología** 38:215-223.

Stasoft Inc 2004. Statistica (data analysis software system) computer program, version 7.0. By Stasoft Inc, Tulsa.

Su J, Sun X-X (2014) High level of metaflumizone resistance and multiple insecticide resistance in field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangdong Province, China. **Crop Protection** 61:58-63.

Waldbauer G (1968) The consumption and utilization of food by insects. **Advances in Insect Physiology** 5:229-288.

Ward JH (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association** 58:236-244.

Zhang M, Liu J, Li K, Yu D (2013) Identification and characterization of a novel monoterpene synthase from soybean restricted to neryl diphosphate precursor. **PloS One** 8:e75972.

CAPÍTULO 3 - Alterações de perfis metabólicos em genótipos de soja revelam a ação de compostos secundários mediando resistência constitutiva e induzida a *Spodoptera cosmioides*

Resumo – *Spodoptera cosmioides* tem assumido grande importância na cultura da soja no Brasil devido à ampla ocorrência nas regiões produtoras, voracidade e baixa suscetibilidade à soja geneticamente modificada que expressa a proteína Cy1Ac de *Bacillus thuringiensis*. Através de mecanismos constitutivos e induzidos de defesa as plantas são capazes de se proteger contra o ataque de pragas. Assim, foram investigadas potenciais características de resistência em oito genótipos comerciais de soja à *S. cosmioides* expressas constitutivamente e induzidas por herbivoria. Também foram analisados os metabólitos secundários expressos em plantas injuriadas e não injuriadas por *S. cosmioides* que foram comparados aos efeitos no comportamento e desenvolvimento de lagartas de *S. cosmioides*. As características de resistência em genótipos de soja foram observadas através de testes de preferência alimentar com chance e sem chance de escolha, e índices nutricionais de lagartas de 3º ínstar de *S. cosmioides*. A expressão de compostos secundários foi avaliada em plantas não injuriadas e previamente injuriadas através de análise metabolômica não direcionada; os genótipos foram agrupados de acordo com os perfis metabólicos e correlacionados com resultados dos bioensaios de preferência alimentar e índices nutricionais de *S. cosmioides*. Os genótipos UFUS Milionária e UFUS Xavante demonstraram características de resistência induzida enquanto os genótipos PI227682 e UFUS Carajás apresentaram resistência constitutiva e induzida a *S. cosmioides*. As diferenças nos perfis metabólicos entre plantas não injuriadas dos genótipos avaliados e alterações observadas após herbivoria revelaram que compostos secundários estão envolvidos na defesa das plantas de soja. Os resultados deste trabalho suportam a hipótese de que a correlação da resistência constitutiva e induzida depende da interação planta-herbívoros. Além disso, foi demonstrado que a metabolômica pode ser utilizada como ferramenta auxiliar na busca e compreensão dos mecanismos químicos de resistência de plantas a insetos. Investigações adicionais de campo devem ser realizadas para confirmar a eficácia dos genótipos comerciais que mostraram resistência a *S. cosmioides*, para que possam ser utilizados como uma estratégia adicional no manejo da praga. Futuros trabalhos devem ser realizados para identificar os compostos secundários envolvidos na expressão de resistência nos genótipos de soja.

Palavras-chave: *Glycine max*, indução de resistência a insetos, lagarta-das-vagens, metabólitos secundários, metabolômica

CHAPTER 3 – Changes in soybean metabolic profiles reveal secondary compounds mediating constitutive and herbivore-induced resistance to *Spodoptera cosmioides*

Abstract - *Spodoptera cosmioides* has assumed considerable importance in Brazil owing to its wide occurrence in soybean-producing regions, highly aggressive feeding habits and low susceptibility to genetically modified soybean expressing *Bacillus thuringiensis* Cy1Ac protein. Soybean plants are able, through constitutive and induced defense mechanisms, to protect themselves against pest attack. Therefore, potential plant resistance traits were investigated in eight commercial soybean genotypes for constitutive and herbivory-induced resistance to *S. cosmioides*, and the secondary metabolites expressed in soybean plants were analyzed and compared to the effects of previous injury by *S. cosmioides* larvae. The resistance of soybean genotypes was observed through feeding preference with double-choice and no-choice tests and nutritional indices of third-instar larvae. Secondary compound expression was evaluated in uninjured and previously injured plants by non-targeted metabolomic analysis and genotypes were grouped according to metabolic profiles and correlated to feed preference bioassays and nutritional indices of *S. cosmioides*. The genotypes UFUS Milionária and UFUS Xavante showed traits of induced resistance while the genotypes PI227682 and UFUS Carajás showed constitutive and induced resistance to *S. cosmioides*. Differences in chemical profiles between uninjured plants of the genotypes evaluated and changes observed after herbivory reveal that this expression can be constitutive, or herbivory induced. The results also demonstrate that these resistance traits may be present simultaneously or individually and support the hypothesis that the correlation of constitutive and induced resistance is dependent on plant-herbivore interactions. In addition, it has been shown that metabolomics can be used as an auxiliary tool to understand the chemical resistance mechanisms of plants to insects. Further field investigations should be performed to confirm the efficacy of these commercial genotypes that showed resistance to *S. cosmioides* so that they can be used as an additional strategy in the management of this pest. Future work should be performed to identify the secondary compounds involved in the expression of resistance in the soybean genotypes that were evaluated.

Keywords: Black armyworm, *Glycine max*, metabolomics, plant induced resistance, secondary metabolites

1. Introdução

Spodoptera cosmioides (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie nativa e relatada em diversas regiões da América do Sul (Silvain e Lalanne-Cassou, 1997). Devido à sua polifagia, *S. cosmioides* é considerada praga em diversas culturas de interesse econômico, incluindo soja e algodão (Habib et al., 1982; Miranda, 2010; Moscardi et al., 2012). No Brasil, esta espécie é considerada praga-chave na cultura da soja e ocorre amplamente nas principais regiões produtoras (Bueno et al., 2011; Silva et al., 2017; Piovesan et al., 2019), assumindo grande importância por apresentar baixa suscetibilidade à proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* Berliner expressa na soja geneticamente modificada (Bernardi et al., 2014), amplamente cultivada no país (Capalbo e Suzuki, 2017).

Outros eventos transgênicos contendo as proteínas Cry1Ac + Cry1F e Cry1A.105 + Cry2Ab + Cry1Ac de Bt em soja têm sido aprovados para cultivo no Brasil, no entanto, com exceção de Cry1A.105, todas as demais proteínas também são expressas em algodão Bt (Cry1Ac; Cry2Ab, Cry1F) (CTNBio, 2019). Portanto, o cultivo simultâneo e/ou em sucessão de soja e algodão, principalmente na região central do país, permite a ocorrência de hospedeiros durante a maior parte do ano e exposição das populações desta espécie à elevada pressão de seleção pelas proteínas Bt, elevando os riscos de evolução de resistência cruzada (Bernardi et al., 2016). Além disso, *S. cosmioides* destaca-se pelo hábito alimentar, uma vez que possui alta voracidade em relação a outras espécies de lagartas que ocorrem na soja e consome tanto folhas como vagens de soja (Bueno et al., 2011).

O uso de plantas que expressam características de resistência torna-se uma alternativa promissora, uma vez que contribui diretamente para a redução das populações de insetos e, podem ainda, agir de forma sinérgica com outras táticas de controle. No entanto, estudos que buscam a identificação e incorporação de resistência a insetos em programas de melhoramento genético de plantas, ou avaliam a resistência em genótipos comerciais, em geral, consideram apenas características constitutivas, embora possíveis mecanismos induzidos de defesa possam estar envolvidos (Tamiru et al., 2015).

As defesas constitutivas incluem mecanismos químicos e morfológicos contra insetos fitófagos que ocorrem mesmo na ausência de fatores estressores (bióticos

e/ou abióticos) e são expressas constantemente nas plantas, enquanto nas defesas induzidas esses mecanismos são mediados por genes de defesa ativados após algum estímulo extrínseco físico e/ou químico, como o ataque de insetos (Schaller, 2008; Zakir, 2011; Stout, 2014). Neste sentido, a resistência induzida apresenta vantagem sobre a constitutiva, uma vez que os recursos são utilizados para a defesa da planta apenas quando houver ataque de herbívoros (Karban et al., 1997; Karban, 2011; Züst e Agrawal, 2017). Essas características de defesa podem ocasionar efeitos negativos no comportamento (antixenose) e/ou desenvolvimento (antibiose) dos insetos (Smith, 2005).

Embora a resistência constitutiva e induzida em soja tenham sido relatadas em diversos estudos (Smith, 2005; Schaller, 2008; Smith e Clement, 2012), em geral são analisadas isoladamente. De fato, há a hipótese de que uma correlação negativa ocorra entre os dois modos de expressão. A correlação negativa é o resultado de benefícios adaptativos da não expressão de duas características em competição pelos mesmos recursos da planta. Portanto, se ambos os modos de expressão são características adaptativas, uma correlação negativa deve ser observada entre eles (Agrawal et al., 2010). Entretanto, os poucos estudos que avaliaram simultaneamente a resistência constitutiva e induzida divergem quanto à hipótese de correlação negativa e sugerem que a presença dessas características depende da interação planta-herbívoro, modo e intensidade de ataque da praga (Underwood, 1998; Underwood et al., 2000; Chen, 2008; Zhang et al., 2008; Agrawal et al., 2010; Kempel et al., 2011; Rasmann et al., 2014; Rasmann et al., 2015; Freitas et al., 2017). Portanto, é possível que ambos os modos de expressão ocorram em processos metabólicos independentes, sendo capaz de ocorrer individualmente ou em conjunto, e que esta característica é intrínseca de cada genótipo de soja.

Como a resistência em plantas envolve a ação de mecanismos físicos/morfológicos e bioquímicos (Smith, 2005; Stout, 2013), a metabolômica tem sido rapidamente adotada e pode ser uma ferramenta útil na busca de compostos químicos expressos em plantas (Leiss et al., 2009; Emani, 2018). Assim, dois tipos de abordagens têm sido utilizados; metabolômica não direcionada e metabolômica direcionada (Cajka e Fiehn, 2015). Na metabolômica não direcionada ocorre ampla procura e triagem de metabólitos, com identidades conhecidas ou não e, portanto, o

objetivo principal está na qualificação do maior número de compostos quanto possível (Leiss et al., 2009). Já a metabolômica direcionada, busca a quantificação de grande conjunto de metabólitos com identidades definidas. Entretanto, em contraste com as abordagens direcionadas tradicionais que geralmente analisam apenas uma classe de compostos, a metabolômica direcionada oferece a possibilidade de analisar simultaneamente diversas classes de compostos conhecidos (Cajka e Fiehn, 2015).

Este estudo avaliou o comportamento e desempenho de lagartas de *S. cosmioides* em oito genótipos comerciais e dois genótipos padrões de resistência e suscetibilidade de soja e buscou identificar potenciais características de resistência constitutiva e expressão de resistência induzida por herbivoria de lagartas conspecíficas. Estudos de metabolômica também foram realizados nos genótipos e os resultados foram correlacionados com as respostas biológicas observadas em lagartas de *S. cosmioides*.

2. Material e métodos

2.1. Insetos

Os insetos utilizados nos experimentos foram provenientes de uma colônia mantida por 26 gerações em laboratório. A colônia foi iniciada a partir de ovos provenientes de uma linhagem mantida em dieta artificial do Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Os insetos foram criados em dieta artificial elaborada segundo a metodologia de Greene et al. (1976) e mantidos em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, e fotoperíodo de 12C:12E h. Anualmente foram adicionados indivíduos de campo, coletados de plantas de amendoim, para manutenção da diversidade genética.

2.2. Plantas

Foram utilizados os genótipos PI227682 e P98Y11RR, previamente avaliados e classificados como padrões de resistência e suscetibilidade a *S. cosmioides*, respectivamente (Boiça Júnior et al., 2015), além dos genótipos comerciais UFUS Xavante, UFUS Milionária, UFUS Impacta, UFUS Carajás, UFUS Capim Branco, CD

208, Anta82RR e M8230RR (Tabela 1). Plantas dos respectivos genótipos foram cultivadas em vasos de polietileno de 3 L de volume contendo substrato à base de solo Latossolo Vermelho Distrófico (ANDRIOLI; CENTURION, 1999), areia e composto orgânico, na proporção de 3:1:1. Os vasos com as plantas de soja foram mantidos em casa de vegetação vedada com tela antiafídeo até sua utilização nos ensaios. A irrigação das plantas foi realizada sempre que necessário e em quantidade uniforme entre as plantas.

Tabela 1. Genótipos de soja avaliados para resistência à *Spodoptera cosmioidea* e suas características de resistência e suscetibilidade a outros insetos-praga.

Genótipos	Característica	Histórico de Resistência a Lepidópteros
PI 227682 ¹	Altamente Resistente	<i>S. cosmioidea</i> (Boiça Júnior et al., 2015; Freitas, 2016); <i>Spodoptera eridania</i> (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) (Souza et al., 2012; Souza et al., 2014); <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1805) (Lepidoptera: noctuidae) (Moraes, 2017)
P98Y11RR ²	Altamente Suscetível	<i>S. cosmioidea</i> (Boiça Júnior et al., 2015; Freitas, 2016)
UFUS Carajás ²	Suscetível	<i>Chloridea virescens</i> (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (Eduardo, 2018)
UFUS Impacta ²	Moderadamente resistente	<i>C. virescens</i> (Eduardo, 2018)
UFUS Xavante ²	Altamente resistente	<i>C. virescens</i> (Eduardo, 2018)
UFUS Capim Branco ²	Moderadamente resistente	<i>C. virescens</i> (Eduardo, 2018)
UFUS Millionária ²	Altamente resistente	<i>C. virescens</i> (Eduardo, 2018)
ANTA 82 RR ²	Moderadamente resistente	<i>H. armigera</i> (Moraes, 2017); <i>C. virescens</i> (Moraes, 2017)
CD 208 ²	Suscetível	<i>H. armigera</i> (Moraes, 2017)
M8230 RR ²	Resistente por antibiose e oviposição	<i>H. armigera</i> (Moraes, 2017)

¹ – Genótipo não comercial; ² – Genótipos comerciais.

2.3. Condições experimentais

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos, do Departamento de Fitossanidade da UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP. Os ensaios em laboratório foram conduzidos em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, e fotoperíodo de 12C:12E h. As análises de metabólitos secundários foram realizadas no

Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, São Carlos, SP).

2.4. Herbivoria prévia em plantas de soja

Para avaliar a influência dos genótipos e da injúria prévia por lagartas de *S. cosmioides* na expressão de resistência constitutiva e induzida, dois experimentos distintos foram realizados para observar os efeitos na (1) preferência alimentar (antixenose); e (2) índices nutricionais (antibiose) de lagartas conspecíficas. Em ambos os experimentos a injúria prévia foi realizada através da infestação artificial de plantas dos genótipos de soja em de casa de vegetação. Plantas em estágio vegetativo V3 (Fehr e Caviness, 1977) foram selecionadas ao acaso e atribuídas a um dos seguintes grupos: plantas injuriadas por lagartas de *S. cosmioides* ou plantas não injuriadas.

Foram utilizadas dez e quinze plantas de cada genótipo nos experimentos 1 e 2, respectivamente. As plantas foram infestadas com uma lagarta de quinto ínstar de *S. cosmioides* no primeiro trifólio a partir da base das plantas (Freitas et al., 2017), confinada em gaiola confeccionada em tecido “voile” (10 x 15 cm) presa ao pecíolo da planta com um clipe plástico. As lagartas foram privadas de alimentação cerca de 4 horas antes de serem confinadas nas gaiolas para assegurar que consumissem a quantidade esperada de tecido foliar dentro do tempo previsto. Após o confinamento, as lagartas permaneceram nas plantas durante cerca de 22 horas no experimento 1 e 20 horas no experimento 2, períodos necessários para que pelo menos 50% de todo o trifólio infestado fosse consumido (Underwood, 1998) e, em seguida, tanto as lagartas quanto as gaiolas foram retiradas das plantas.

O mesmo número de plantas utilizadas para a infestação artificial em cada experimento também foi utilizado para plantas não injuriadas, que tiveram o primeiro trifólio a partir da base das plantas coberto apenas com gaiolas de tecido “voile”, sem a presença das lagartas, permanecendo nas plantas por período igual ao das plantas infestadas. Após três dias da remoção das gaiolas e lagartas das plantas (Underwood, 1998), os folíolos do segundo trifólio a partir da base das plantas foram utilizados nos experimentos de preferência alimentar, índices nutricionais e análise metabolômica.

2.5. Preferência alimentar de *Spodoptera cosmioides*

Para avaliar a preferência de *S. cosmioides* alimentar foram realizados testes com dupla chance de escolha e sem chance de escolha. Para isso, folíolos do segundo trifólio a partir da base das plantas foram destacados, acondicionados em sacos plásticos identificados, e levados ao laboratório para a condução do experimento de preferência alimentar. Os dois folíolos laterais coletados de cada trifólio de plantas previamente injuriadas e não injuriadas foram utilizados nos testes com chance e sem chance de escolha, enquanto os folíolos centrais foram mantidos nas condições dos tratamentos e ao final do experimento foram utilizados como alíquotas da área foliar inicial. As estruturas foram enxaguadas em água corrente, e em seguida secas em papel toalha à temperatura ambiente. Os ensaios de preferência alimentar foram realizados com o uso de discos foliares como substrato alimentar (Freitas et al., 2017) que foram cortados a partir dos folíolos coletados e preparados com o auxílio de um vazador metálico de 2,5 cm de diâmetro que representa a área foliar de 4,91 cm².

No teste com dupla chance de escolha, um disco foliar proveniente de plantas não injuriadas e um disco foliar proveniente de plantas injuriadas de cada genótipo foram confrontados. Os discos foliares foram distribuídos em placas de Petri de 14 cm de diâmetro forradas com papel filtro umedecido com água deionizada, e duas lagartas de terceiro ínstar de *S. cosmioides* foram liberadas no centro da placa com auxílio de um pincel fino. A movimentação larval foi observada através da contagem do número de lagartas presentes em cada tratamento após 1, 3, 6, 12 e 18 horas do início do experimento, período necessário para que cerca de 80% da área foliar de um dos tratamentos fosse consumida. Ao final deste período a área foliar consumida pelas lagartas foi avaliada com o auxílio de um aparelho medidor de área foliar eletrônico (LI-COR, modelo 3100A®, Lincoln, NE, EUA). O delineamento utilizado foi em blocos casualizados em esquema de parcela subdividida 10 x 2, correspondendo aos efeitos principais de genótipo e injúria, respectivamente, com 12 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri contendo os discos foliares de plantas não injuriadas e injuriadas de cada genótipo.

No teste sem chance de escolha, discos foliares coletados de plantas não injuriadas e injuriadas de cada genótipo foram individualizados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro forrada com papel filtro umedecido com água deionizada. Em seguida, uma lagarta de terceiro ínstar de *S. cosmioides* foi liberada em cada placa. As avaliações de movimentação larval e área foliar consumida foram semelhantes às aquelas realizadas no teste de dupla chance de escolha. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema de parcela subdividida 10 x 2 (Genótipo x Injúria), com 12 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por uma placa de Petri.

2.6. Parâmetros biológicos/nutricionais de *Spodoptera cosmioides*

Os dois folíolos laterais simétricos do segundo trifólio a partir da base das plantas foram destacados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido, encaminhados para o laboratório e armazenados em ultrafreezer (-80°C) até a extração e análise dos metabólitos. Já os folíolos centrais de cada trifólio, foram acondicionados em sacos plásticos identificados, e levados ao laboratório para avaliação do efeito dos genótipos e injúria prévia no desenvolvimento de *S. cosmioides*.

Os discos foliares foram coletados e preparados conforme descrito anteriormente, e posteriormente transferidos para placas de Petri (9 cm de diâmetro) forradas com papel filtro umedecido com água deionizada. Dos 15 folíolos centrais coletados em cada tratamento, 10 foram oferecidos às lagartas de *S. cosmioides* e cinco foram utilizados como amostras adicionais, pesados em balança analítica (Ohaus®, Parsippany, NJ, EUA), e mantidos nas mesmas condições dos tratamentos para posteriormente serem utilizadas como alíquotas para o cálculo dos índices nutricionais, segundo metodologia de Waldbauer (1968).

Lagartas de terceiro ínstar de *S. cosmioides* provenientes da colônia de manutenção foram privadas de alimentação 5 horas antes do início dos experimentos e pesadas em balança analítica de precisão (Ohaus, Parsippany, NJ, EUA). Posteriormente, as lagartas foram transferidas individualmente com o auxílio de um pincel fino para as placas de Petri (9 cm de diâmetro) forradas com papel filtro

umedecido com água deionizada, onde se alimentaram por 21 horas, tempo necessário para que a área foliar dos folíolos tivesse sido consumida em aproximadamente 80%.

Ao final do experimento, as lagartas, o remanescente do alimento oferecido, e as alíquotas foram secos em estufa (Odontobrás, modelo EL 1.4, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) a 60°C, por 48 h até atingirem peso constante, e pesados em balança analítica. Além disso, as fezes foram secas em sala climatizada com temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante sete dias e posteriormente pesadas em balança analítica. A partir dos dados obtidos, os seguintes índices nutricionais foram calculados: taxa de consumo relativo (RCR); taxa de crescimento relativo (RGR); eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI); eficiência de conversão do alimento digerido (ECD); e digestibilidade aproximada (AD) (Waldbauer, 1968).

2.7. Análise de metabólitos secundários em soja

Para avaliar a expressão de compostos não voláteis, amostras do material vegetal de cada tratamento foram liofilizadas (Liofilizador E-C Modulyo, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e submetidas à extração sólido-líquido com mistura extratora composta por metanol:água (50:50 v/v) grau LC-MS, em banho ultrassom 40 kHz por cinco minutos (USC 1400 Unique, São Paulo, Brasil). Este processo foi realizado por seis ciclos. Em seguida, os extratos foram centrifugados ($3.214\times g$, durante 1 min a 10°C) e o sobrenadante filtrado em membrana de PTFE de $0,22\ \mu\text{m}$. Posteriormente, 250 μL dos extratos obtidos foram diluídos em água (740 μL), adicionou-se 10 μL de uma solução usada como padrão interno (caféina – $10\ \text{mg.L}^{-1}$).

As análises dos compostos não voláteis foram realizadas com uso do sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC, modelo 1290, Agilent Technologies, CA, USA) hifenada a um Espectrômetro de Massas quadrupolo Tempo-de-voo (LC-6545 qToF MS, Agilent Technologies, CA, USA). As amostras foram analisadas através coluna Fenil-hexil Zorbax RRHD Eclipse Plus ($2,1 \times 100\ \text{mm}$, i.d. $1,8\ \mu\text{m}$, Agilent) como fase estacionária. A temperatura do forno da coluna e do auto injetor foram 45°C e 10°C , respectivamente. Um gradiente de fluxo constante ($0,350\ \text{mL.min}^{-1}$) combinado às fases móveis A (ácido fórmico 0,1 %/água) e B (ácido fórmico

0,1%/ metanol) foi utilizado nas seguintes condições: 8-90% B (0-17 min) e 90% B (17-20 min) com “post run” de quatro minutos. O tempo de gradiente total foi 24 min. O volume de injeção foi de 1,0 μ L. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com os dados espectrais da biblioteca (METLIN) e com base nos dados de massa monoisotópica. As condições de fonte AJS ESI no qTOF MS foram definidas da seguinte forma: modo de íon positivo, tensão do capilar de 3,5 kV, temperatura da fonte e de dessolvatação de 350°C, fluxo do gás de dessolvatação de 11 L.min⁻¹, fluxo de gás no cone de 8 L.min⁻¹, fragmentador em 250V, voltagem do “skimmer” e “nozzle” em 65V e 1000V, respectivamente. Os espectros de massas foram adquiridos no modo “full scan” numa faixa de 100 a 1000 Da, e taxa de varredura de dois espectros/s.

Os dados de EM de metabólitos secundários foram analisados através do software “Mass Hunter Qualitative Analysis Workflows B.08.00” (Agilent Technologies, CA, USA), utilizado para processar os dados brutos obtidos nas análises cromatográficas dos compostos fixos e convertê-los em formato “.CEF”. Nesta etapa, o algoritmo “Molecular Feature Extraction” (MFE) foi aplicado para remover sinais m/z que poderiam ser atribuídos ao ruído do instrumento e a mistura extratora (branco da extração). Também se realizou uma estimativa de fórmulas moleculares. Em seguida, o software “Mass Profiler Professional B.13.00 – MPP” (Agilent Technologies, CA, USA) foi utilizado para auxiliar a encontrar diferenças significativas entre os grupos amostrais obtidos para os compostos fixos e voláteis.

O software MPP permite o alinhamento e normalização dos picos para cada cromatograma. Dessa forma, foi aplicada uma tolerância de 0,1% e 0,15 min para o tempo de retenção, 5 ppm e 2,0 mDa para as massas e uma correção na linha de base. Assim, um único conjunto de dados armazenado como uma matriz foi criado e analisado. Para a exploração dos dados e agrupamento das amostras utilizou-se teste t e análise de cluster através do método de Ward a partir da distância Euclidiana. A correção de Benjamini Hochberg FDR foi aplicada e um nível de probabilidade de $p < 0.05$ e “fold-change” > 2.0 foram selecionados para a determinação dos potenciais biomarcadores.

Para avaliar a expressão dos compostos voláteis, amostras de 100.0 mg do material vegetal de cada tratamento e 1.0 g de glicerol foram submetidas à extração

por “headspace” em frascos de 20 mL por 25 minutos à 120°C. O Mentol foi utilizado como padrão interno, com a adição de 10 µL de solução 500 mg.L⁻¹ ao frasco de “headspace”. Os frascos foram lacrados com tampa de alumínio e septo de PTFE/SIL. As amostras foram submetidas à extração por “headspace” estático. As amostras foram injetadas com o auxílio de seringa PALSyr HS 2,5 mL em sistema injetor automático de amostras (Combi-PAL AOC-5000, Shimadzu).

Após a extração, os compostos voláteis foram analisados em Cromatógrafo a Gás acoplado ao espectrômetro de massas sequencial (CG-MS/MS, modelo QT8040, Shimadzu Scientific Instruments, MD, USA), por meio de uma coluna capilar ZB-Wax (Phenomenex, fase estacionária polietilenoglicol, 30 m x 0,25 mm, d.i. x 0,25 µm espessura do filme) e Hélio como gás de arraste (1 mL.min⁻¹). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor 220°C; a temperatura da coluna inicialmente a 40°C foi mantida por 5 min, posteriormente foi aquecida a uma taxa de 8°C.min⁻¹ até 240°C permanecendo nesta temperatura por 3 min. A temperatura de transferência da interface e da fonte de íons foram 250°C e 280°C, respectivamente. A injeção realizada no modo split (15:1) e o volume de amostra introduzido foi de 1000 µL. Os espectros foram adquiridos no modo “full scan” numa faixa de 40 a 500 Da no modo impacto de elétrons (70 eV). A identificação dos compostos voláteis foi realizada por comparação com os dados espectrais obtidos na biblioteca NIST 17.0 (“National Institute of Standards and Technologies, Mass Spectra Libraries”). A solução GCMS, os softwares “Real Time Analysis” e “Post Run”, versão 4.11 (Shimadzu), foram utilizados para aquisição e análise de dados, respectivamente.

2.8. Análise de dados

A partir dos dados de preferência alimentar foram calculados os índices de preferência (IP) de acordo com a fórmula de Kogan (1972), adaptada da seguinte forma: $IP = 2A / (A+T)$; e $IP = 2T / (T+A)$, para os testes de dupla chance e sem chance de escolha, respectivamente; onde A = número de lagartas presentes em plantas não injuriadas do genótipo; T = número de lagartas presentes em plantas injuriadas do genótipo. Valores de $IP > 1.00$ indicam a preferência das lagartas por plantas não injuriadas em cada genótipo; valores de $IP < 1.00$ indicam a preferência das lagartas

por plantas injuriadas em cada genótipo; valores de IP = 1.00 indicam neutralidade de preferência das lagartas por plantas não injuriadas e injuriadas de cada genótipo. Para os cálculos, considerou-se a média de lagartas presentes em cada genótipo nos tempos 1, 3, 6, 12, 24 e 18 horas.

Os dados obtidos dos índices de preferência, preferência alimentar e índices nutricionais foram submetidos à análise exploratória para identificar possíveis valores “outliers” ou influentes e analisados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha = 0.05$) e homogeneidade das variâncias pelo teste de Brown-Forsythe ($\alpha = 0.05$). Quando necessário os dados foram transformados de acordo com o teste de Box-Cox, pelo procedimento PROC TRANSREG. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através dos procedimentos PROC GLM (one-way ANOVA) para as médias dos índices de preferência e PROC GLM (two-way ANOVA) para as médias do consumo foliar e índices nutricionais, analisadas em esquema de parcelas subdivididas quanto aos efeitos principais dos fatores genótipo e injúria. Quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Todas as análises univariadas foram analisadas pelo software estatístico SAS® versão 9.4 (SAS, 2013) e a construção dos gráficos através do software SigmaPlot® versão 14.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

Os índices nutricionais foram submetidos à análise multivariada com intuito de auxiliar no agrupamento dos genótipos de soja de acordo com os níveis de resistência constitutiva e induzida. Portanto, realizou-se a análise de agrupamento através da medida de dissimilaridade Euclidiana pelo método hierárquico de Ward (Ward, 1963), e em seguida os dados foram submetidos à análise de variância multivariada (MANOVA) ($\alpha = 0.05$). Além disso, a análise de componentes principais (CP) foi realizada para verificar os índices de maior influência na distinção dos grupos formados de acordo com os níveis de resistência por antibiose através da matriz de correlação de autovetores. Os dados foram analisados pelo software STATISTICA® versão 7.0 (Stasoft Inc, 2004).

3. Resultados

3.1. Preferência alimentar de *Spodoptera cosmioides*

De acordo com o índice de preferência, diferenças foram observadas quanto ao número de lagartas de terceiro ínstar de *S. cosmioides* entre plantas não injuriadas e injuriadas nos genótipos avaliados nos testes com dupla chance e sem chance de escolha (Figura 1). No teste com dupla chance de escolha (Figura 1a), o maior número de lagartas de *S. cosmioides* em plantas não injuriadas foi observado nos genótipos P98Y11RR, UFUS Carajás, PI227682, UFUS Capim Branco, ANTA82RR, e UFUS Milionária em relação às plantas injuriadas.

Entre os genótipos, destaca-se P98Y11RR, que apresentou o maior índice de preferência, diferindo-se significativamente do genótipo UFUS Xavante ($F_{9,18} = 2,51$; $p = 0,0460$). Os genótipos UFUS impacta M8230RR e CD208, apesar de apresentarem maior número de lagartas nas plantas controle, tiveram índices de preferência próximos de 1, sugerindo neutralidade de preferência em relação às plantas injuriadas. O genótipo UFUS Xavante quando injuriado influenciou positivamente o comportamento de *S. cosmioides*, uma vez que as plantas não injuriadas foram mais atrativas em relação às plantas injuriadas.

No teste de preferência sem chance de escolha (Figura 1b), apenas os genótipos M8230RR e UFUS Capim Branco das plantas injuriadas foram menos deterrentes em relação às plantas não injuriadas, embora somente o segundo tenha diferido significativamente ($F_{9,20} = 2,88$; $p = 0,0234$). Por outro lado, nos genótipos P98Y11RR, UFUS Impacta, PI227682, UFUS Xavante, CD208 e UFUS Milionária as plantas injuriadas foram mais estimulantes do que as plantas não injuriadas. Já nos genótipos UFUS Carajás e Anta82RR as plantas não injuriadas e injuriadas foram igualmente preferidas e, portanto, houve neutralidade.

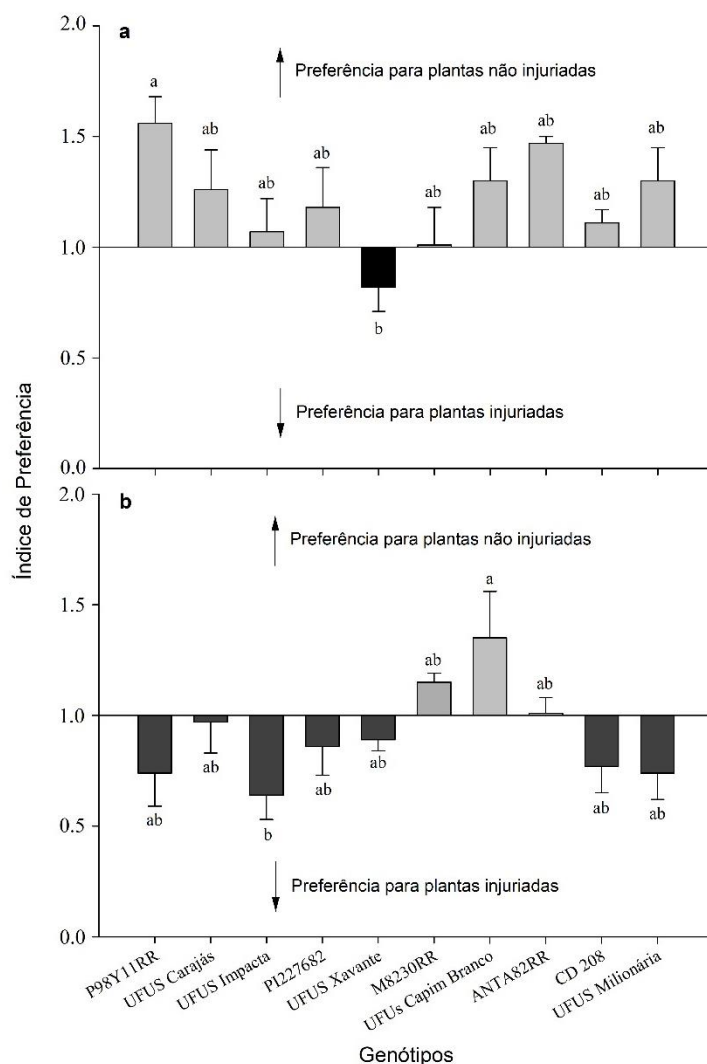


Figura 1. Índice de preferência de lagartas de *Spodoptera cosmioides* por genótipos de soja em testes com dupla chance (a) e sem chance de escolha (b). Barras com diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa entre os genótipos pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).

Em relação a área foliar consumida, no teste com dupla chance de escolha houve diferença significativa no consumo de *S. cosmioides* para efeitos principais, genótipo ($F_{9,110} = 10,37$; $p < 0,0001$), injúria ($F_{1,110} = 32,23$; $p < 0,0001$) e da interação genótipo x injúria no consumo foliar ($F_{9,110} = 3,24$; $p = 0,0016$) (Tabela 2). Entre as plantas não injuriadas, o genótipo PI227682 ocasionou menor consumo foliar em relação ao genótipo UFUS Xavante, enquanto os outros genótipos não diferiram significativamente entre si. Plantas dos genótipos UFUS Xavante, UFUS Capim Branco, Anta82RR, CD208 e UFUS Milionária previamente injuriados ocasionaram menor consumo foliar por lagartas de *S. cosmioides* em relação às plantas não

injurizadas. Assim, quando comparado o consumo foliar em plantas previamente injurizadas, o genótipo UFUS Milionária foi menos consumido por *S. cosmíodes*, seguido pelos genótipos PI227682 e Anta82RR. Por outro lado, no genótipo UFUS Carajás houve o maior consumo, enquanto os demais genótipos não diferiram significativamente.

Tabela 2. Área foliar consumida ($\text{cm}^2 \pm \text{EP}$) por lagartas de *Spodoptera cosmíodes* em plantas não injurizadas e previamente injurizadas de genótipos de soja em testes de preferência alimentar com chance e sem de escolha.

Genótipos (G)	Dupla chance de escolha ¹		Sem chance de escolha	
	Não injuriado	Injuriado	Não injuriado	Injuriado
P98Y11RR	2,04±0,33 abA	1,62±0,18 abA	1,92±0,39 abcA	2,27±0,40 aA
UFUS Carajás	2,02±0,30 abA	2,05±0,32 aA	1,51±0,24 bcA	1,64±0,32 abA
UFUS Impacta	1,43±0,31 abA	1,62±0,31 abA	1,08±0,24 bcA	1,34±0,31 abA
PI227682	0,76±0,07 bA	0,71±0,09 bcA	0,89±0,15 cA	0,50±0,05 bA
UFUS Xavante	2,74±0,45 aA	1,49±0,26 abB	2,74±0,34 aA	1,29±0,33 abB
M8230RR	1,32±0,22 abA	1,09±0,25 abcA	0,81±0,20 cA	0,39±0,08 bA
Capim Branco	1,79±0,46 abA	1,22±0,39 abcB	1,07±0,26 bcA	1,17±0,25 abA
ANTA82RR	1,50±0,34 abA	0,78±0,21 bcB	1,01±0,36 cA	1,10±0,21 abA
CD 208	1,90±0,27 abA	0,98±0,20 abcB	1,84±0,32 abcA	1,05±0,29 abB
UFUS Milionária	1,35±0,21 abA	0,46±0,09 cB	2,55±0,45 abA	1,05±0,27 abB

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹ Transformado em log x.

No teste sem chance de escolha, os efeitos de genótipo ($F_{9,219} = 6,18$; $p < 0,0001$) e injúria ($F_{1,219} = 7,56$; $p = 0,0065$) e da interação genótipo x injúria ($F_{9,219} = 6,18$; $p < 0,0050$) no consumo foliar de *S. cosmíodes* foram significativos (Tabela 2). Entre as plantas não injurizadas, os genótipos PI227682, M8230RR e Anta82RR foram menos consumidos, enquanto o maior consumo foi observado no genótipo UFUS Xavante. Observou-se diferenças significativas no consumo foliar de *S. cosmíodes* nos genótipos UFUS Milionária, CD208 e UFUS Xavante quando previamente injurizados, em relação às plantas não injurizadas. Após injurizados, os genótipos M8230RR e PI227682 tiveram os menores consumos, respectivamente, em relação ao genótipo P98Y11RR, no qual observou-se o maior consumo foliar.

3.2. Parâmetros biológicos/nutricionais de *Spodoptera cosmioides*

O efeito dos genótipos e injúria prévia influenciou o desenvolvimento de *S. cosmioides*. Embora o efeito da injúria e a interação genótipo x injúria não tenham influenciado significativamente as taxas de consumo relativa (RCR) (I: $F_{1,179} = 1,02$; $p = 0,3131$; G x I: $F_{9,179} = 1,74$; $p = 0,0832$) (Tabela 3), crescimento relativo (RGR) (I: $F_{1,180} = 0,41$; $p = 0,5236$; G x I: $F_{9,180} = 1,34$; $p = 0,2193$) (Tabela 3), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) (I: $F_{1,180} = 0,13$; $p = 0,7206$; G x I: $F_{9,180} = 1,41$; $p = 0,1864$) (Tabela 4) e eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) (I: $F_{1,72} = 1,23$; $p = 0,2710$; G x I: $F_{9,72} = 1,78$; $p = 0,0875$) (Tabela 4), de lagartas de *S. cosmioides* alimentadas em plantas não injuriadas e injuriadas, houve diferença significativa entre os genótipos de soja avaliados.

Nas plantas não injuriadas a menor RCR foi observada em lagartas que se alimentaram do genótipo UFUS Capim Branco, enquanto os genótipos PI227682 e UFUS Impacta ocasionaram maior RCR (G: $F_{9,179} = 3,77$; $p = 0,0002$). Entre as plantas injuriadas, a menor RCR foi observada em lagartas alimentadas no genótipo M8230RR em relação ao genótipo Anta82RR (Tabela 3). Em relação a RGR, diferenças foram observadas entre os genótipos (G: $F_{9,180} = 3,14$; $p = 0,0016$). A maior RGR ocorreu em lagartas alimentadas no genótipo Anta82RR, enquanto P98Y11RR e PI227682 proporcionaram os menores valores de RGR entre os genótipos (Tabela 3).

A menor ECI ocorreu em lagartas alimentadas no genótipo PI227682, já as maiores ECIs foram observadas nos genótipos Anta82RR, CD208, UFUS Capim Branco e UFUS Millionária (Tabela 4) (G: $F_{9,180} = 3,60$; $p = 0,0004$). De forma semelhante, o genótipo PI227682 afetou a ECD de lagartas de *S. cosmioides* (G: $F_{9,72} = 6,47$; $p < 0,0001$). Além disso, os genótipos UFUS Xavante, UFUS Impacta e UFUS Carajás também influenciaram negativamente a ECD de *S. cosmioides*, enquanto a maior ECD foi observada no genótipo UFUS Capim Branco (Tabela 4).

Houve ainda, efeito significativo dos genótipos (G: $F_{9,178} = 24,66$; $p < 0,0001$) e da interação genótipo x injúria (G x I: $F_{9,178} = 8,92$; $p < 0,0001$) na digestibilidade aproximada (AD) de *S. cosmioides*, enquanto que o efeito principal da injúria não diferiu significativamente entre os tratamentos (I: $F_{1,178} = 1,23$; $p = 0,2695$) (Tabela 4).

Tabela 3. Parâmetros biológicos/nutricionais ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1} \pm \text{EP}$) de lagartas de *Spodoptera cosmioides* alimentadas em plantas não injuriadas e previamente injuriadas de genótipos de soja.

Genótipos (G)	RCR ¹		Média	RGR ²		Média
	Não injuriado	Injuriado		Não injuriado	Injuriado	
P98Y11RR	4,11±0,31abA	4,15±0,46abA	4,13±0,27ab	0,58±0,06aA	0,65±0,06aA	0,62±0,04b
UFUS Carajás	3,86±0,27abA	3,68±0,47abA	4,11±0,41ab	0,67±0,04aA	0,57±0,10aA	0,63±0,05ab
UFUS Impacta	5,08±0,36aA	4,42±0,26abA	4,75±0,23ab	0,71±0,05aA	0,78±0,02aA	0,74±0,02ab
PI227682	5,50±0,47aA	4,74±0,49abA	5,12±0,34a	0,55±0,05aA	0,63±0,04aA	0,59±0,03b
UFUS Xavante	4,56±0,33abA	4,58±0,18abA	4,57±0,18ab	0,78±0,03aA	0,70±0,06aA	0,74±0,03ab
M8230RR	4,23±0,23abA	3,42±0,31bA	3,82±0,21ab	0,74±0,05aA	0,60±0,05aA	0,67±0,04ab
Capim Branco	3,20±0,36bA	4,00±0,44abA	3,6±0,29b	0,75±0,05aA	0,66±0,06aA	0,70±0,04ab
ANTA82RR	4,16±0,57abA	5,32±0,52aA	4,74±0,40ab	0,75±0,04aA	0,84±0,03aA	0,79±0,02a
CD208	4,14±0,40abA	3,47±0,33abA	3,80±0,27ab	0,72±0,02aA	0,67±0,03aA	0,69±0,02ab
UFUS Milionária	4,03±0,37abA	3,53±0,53abA	3,78±0,32b	0,75±0,03aA	0,72±0,03aA	0,74±0,02ab
Média	4,29±0,13A	4,20±0,15A	-	0,70±0,01A	0,68±0,01A	-

RCR - Taxa de consumo relativo; RGR - Taxa de crescimento relativo. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna ou maiúsculas na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} - não significativo. ¹ Transformado em log x. ² Transformado em x^3 .

Tabela 4. Parâmetros biológicos/nutricionais (% $\pm$ EP) de lagartas de *Spodoptera cosmioides* alimentadas em plantas não injuriadas e previamente injuriadas de genótipos de soja.

Genótipos	ECI		Média	ECD ¹		Média	AD ²		Média
	Não injuriado	Injuriado		Não injuriado	Injuriado		Não injuriado	Injuriado	
P98Y11RR	15,17 $\pm$ 2,22aA	17,14 $\pm$ 2,19aA	16,15 $\pm$ 0,53ab	35,59 $\pm$ 7,91aA	29,53 $\pm$ 5,23aA	32,56 $\pm$ 4,58ab	39,36 $\pm$ 5,50cdB	52,96 $\pm$ 4,26bcdA	46,16 $\pm$ 3,73cd
UFUS Carajás	18,76 $\pm$ 2,08aA	18,03 $\pm$ 3,66aA	18,40 $\pm$ 2,05ab	31,24 $\pm$ 3,98aA	28,10 $\pm$ 7,13aA	29,67 $\pm$ 3,88b	52,96 $\pm$ 4,26bcA	59,70 $\pm$ 3,89abcA	56,95 $\pm$ 2,36bc
UFUS Impacta	14,52 $\pm$ 1,38aA	18,46 $\pm$ 1,25aA	16,49 $\pm$ 1,01ab	22,26 $\pm$ 2,76aA	30,28 $\pm$ 2,47aA	26,27 $\pm$ 2,20bc	59,66 $\pm$ 3,23bA	55,74 $\pm$ 2,87bcA	57,7 $\pm$ 2,15bc
PI227682	10,82 $\pm$ 1,33aA	14,80 $\pm$ 1,89aA	12,81 $\pm$ 1,21b	13,49 $\pm$ 1,98aA	19,24 $\pm$ 2,63aA	16,36 $\pm$ 1,82c	77,44 $\pm$ 1,99aA	74,03 $\pm$ 2,18aA	75,73 $\pm$ 1,49a
UFUS Xavante	17,64 $\pm$ 1,11aA	15,81 $\pm$ 1,77aA	16,72 $\pm$ 1,03ab	24,80 $\pm$ 0,69aA	22,21 $\pm$ 2,27aA	23,51 $\pm$ 1,20bc	66,20 $\pm$ 2,26abA	67,02 $\pm$ 2,03abA	66,61 $\pm$ 1,48b
M8230RR	18,47 $\pm$ 2,07aA	19,04 $\pm$ 2,14aA	18,75 $\pm$ 1,45ab	31,04 $\pm$ 4,46aA	41,00 $\pm$ 5,58aA	35,47 $\pm$ 3,71ab	53,18 $\pm$ 2,79bcA	28,33 $\pm$ 5,98eB	40,75 $\pm$ 4,29d
Capim Branco	25,30 $\pm$ 1,88aA	18,36 $\pm$ 2,08aA	21,83 $\pm$ 1,58a	55,63 $\pm$ 7,88aA	45,34 $\pm$ 8,61aA	50,48 $\pm$ 5,76a	39,69 $\pm$ 3,88cdA	32,45 $\pm$ 3,71deA	36,07 $\pm$ 2,74d
ANTA82RR	20,62 $\pm$ 2,28aA	17,44 $\pm$ 1,91aA	19,03 $\pm$ 1,49ab	36,06 $\pm$ 2,34aA	26,49 $\pm$ 3,72aA	30,08 $\pm$ 2,93ab	28,28 $\pm$ 7,15dB	61,63 $\pm$ 3,22abA	44,96 $\pm$ 5,40cd
CD208	19,33 $\pm$ 2,40aA	21,02 $\pm$ 1,90aA	20,18 $\pm$ 1,50a	22,82 $\pm$ 1,89aA	40,06 $\pm$ 3,50aA	32,40 $\pm$ 3,63ab	65,56 $\pm$ 3,13bA	48,93 $\pm$ 4,45bcdeB	56,81 $\pm$ 3,33bc
UFUS Milionária	20,34 $\pm$ 2,05aA	24,27 $\pm$ 3,20aA	22,30 $\pm$ 1,90a	32,22 $\pm$ 6,52aA	44,39 $\pm$ 7,83aA	37,63 $\pm$ 5,15ab	60,33 $\pm$ 3,50bA	47,08 $\pm$ 4,64deB	54,06 $\pm$ 3,19c
Média	18,44 $\pm$ 0,74A	18,10 $\pm$ 0,69A	-	30,44 $\pm$ 2,14A	32,24 $\pm$ 1,97A	-	54,28 $\pm$ 1,85A	52,84 $\pm$ 1,80A	-

ECI - Eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD - Eficiência de conversão do alimento digerido; AD – Digestibilidade aproximada. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{ns} - não significativo.

¹ Transformado em log x. ² Transformado em x³.

As plantas dos genótipos M8230RR, CD208 e UFUS Milionária, apresentaram redução na AD quando injuriadas, enquanto no genótipo Anta82RR, maior AD foi observada em relação às plantas não injuriadas. Após injúria prévia, a menor AD ocorreu em plantas dos genótipos M8230RR, UFUS Capim Branco e UFUS Milionária, enquanto a maior digestibilidade aproximada ocorreu no genótipo PI227682 (Tabela 4).

Para auxiliar na classificação dos genótipos quanto aos níveis de resistência, os parâmetros biológicos das lagartas alimentadas em plantas não injuriadas e injuriadas, foram comparados por meio de análises multivariadas (Figuras 2 e 3). De acordo com os resultados, três grupos diferiram significativamente com base nos níveis de resistência por antibiose entre as plantas não injuriadas dos genótipos: moderadamente resistente, suscetível e altamente suscetível ($F_{10, 6} = 8,59$; $p = 0,0079$) (Fig. 2a).

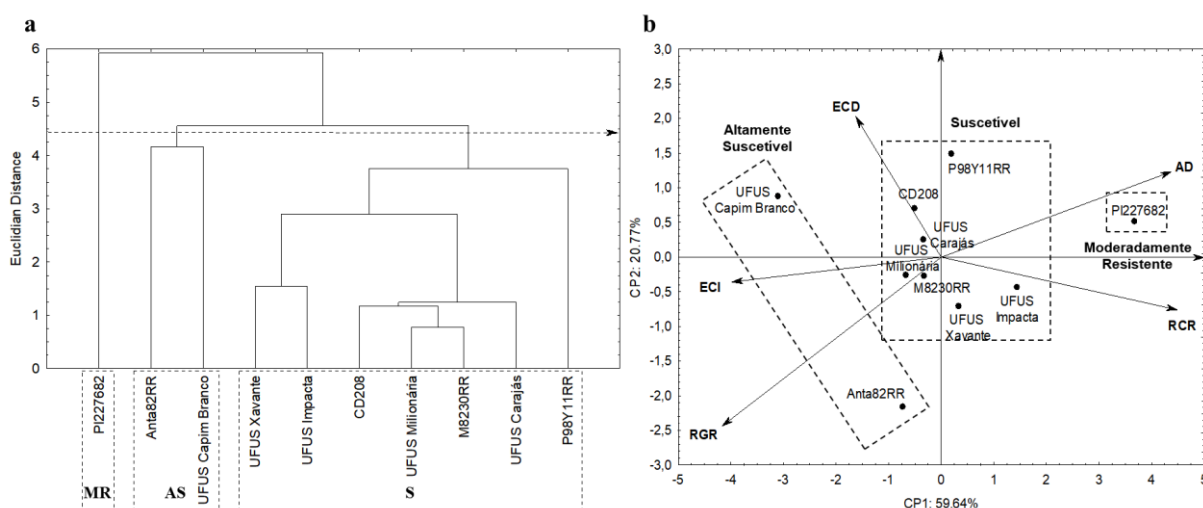


Figura 2. Análises de agrupamento hierárquico de Ward (a) e componentes principais (b) de plantas não injuriadas de genótipos de soja de acordo com os índices nutricionais de *Spodoptera cosmioides*. MR – Moderadamente Resistente; S – Suscetível; AS – altamente suscetível; RCR – Taxa de consumo relativo; RGR – Taxa de crescimento relativo; ECI – Eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD – Eficiência de conversão do alimento digerido; AD – Digestibilidade aproximada. Grupos significativamente diferentes pelo teste de Wilks ($p < 0,05$).

Apenas o genótipo PI227682 foi classificado como moderadamente resistente, enquanto os genótipos P98Y11RR, UFUS Carajás, M8230RR, UFUS Milionária, CD208, UFUS Impacta e UFUS Xavante foram agrupados como suscetíveis, e os

genótipos UFUS Capim Branco e Anta82RR foram classificados como altamente suscetíveis. De acordo com os níveis de resistência, foi possível observar os índices de maior influência na distinção dos grupos (Figura 2b). Os componentes principais (CP) 1 e 2 concentraram 80,41 % das informações contidas nas variáveis originais, e demonstrou elevada qualidade de representação da análise. Segundo a matriz de correlação de autovetores, os índices mais influentes no CP 1 para a distinção dos níveis de resistência dos genótipos foram RCR e ECI, enquanto os índices que mais influenciaram o CP 2 foram RGR e ECD.

Entre as plantas injuriadas, quatro grupos diferiram significativamente ($F_{15,5} = 6,14$; $p = 0,0176$) de acordo com os níveis de resistência. Os genótipos foram classificados como: altamente resistente, moderadamente resistente, suscetível e altamente suscetível (Figura 3a).

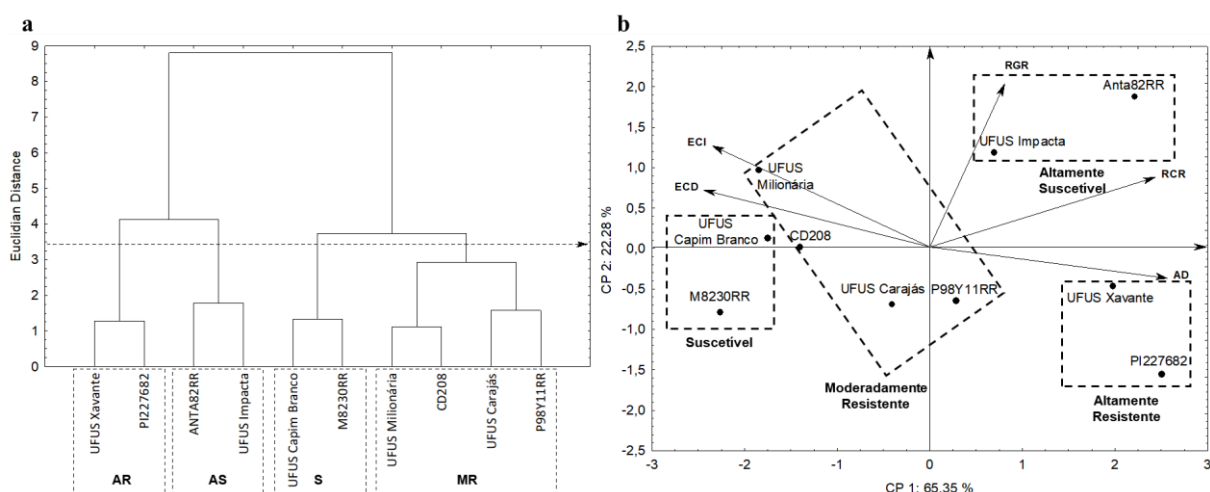


Figura 3. Análises de agrupamento hierárquico de Ward (a) e componentes principais (b) de plantas injuriadas de genótipos de soja de acordo com os índices nutricionais de *Spodoptera cosmioides*. AR – Altamente Resistente; MR – Moderadamente Resistente; S – Suscetível; AS – altamente suscetível; RCR – Taxa de consumo relativo; RGR – Taxa de crescimento relativo; ECI – Eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD – Eficiência de conversão do alimento digerido; AD – Digestibilidade aproximada. Grupos significativamente diferentes pelo teste de Wilks ($p < 0,05$).

Os genótipos PI227682 e UFUS Xavante foram classificados como altamente resistentes, já os genótipos UFUS Milionária, CD208, UFUS Carajás e P98Y11RR foram considerados moderadamente resistentes quando previamente injuriados por *S. cosmioides*. Os genótipos UFUS Capim Branco e M8230RR demonstraram-se suscetíveis, enquanto os genótipos Anta82RR e UFUS Impacta foram altamente

suscetíveis à *S. cosmioides* quando previamente injuriados. Os CPs 1 e 2 concentraram 87,6 % das informações contidas nas variáveis originais e, portanto, demonstraram elevada qualidade de representação da análise (Figura 3b). Os índices com maior influência no agrupamento dos genótipos no CP 1, de acordo com a matriz de correlação de autovetores, foram RCR (0,50), ECD e AD. Por outro lado, a RGR demonstrou grande influência no CP 2.

3.3. Análise de metabólitos secundários em plantas de soja

De acordo com as análises de agrupamento hierárquico combinado com o “heat map”, os genótipos foram agrupados com base na semelhança dos perfis de abundância de compostos secundários e respostas biológicas de *S. cosmioides* alimentada nos genótipos. Entre as plantas não injuriadas os três grupos principais formados quando considerada a abundância de compostos não voláteis foram: (i) os genótipos UFUS Xavante, M8230RR, UFUS Capim Branco e Anta82RR; (ii) os genótipos P98Y11RR UFUS Carajás, CD208 e UFUS Milionária; e (iii) os genótipos UFUS Impacta e PI227682 (Figuras 4 e 5).

Por outro lado, cinco grupos principais foram formados de acordo com a abundância de compostos voláteis entre as plantas não injuriadas: (i) os genótipos Anta82RR e UFUS Milionária; (ii) UFUS Impacta, PI227682; (iii) P98Y11RR, UFUS Carajás; (iv) UFUS Xavante; e (v) M8230RR, UFUS Capim Branco e CD208 (Figura 6). Já entre as plantas injuriadas observou-se a formação de três principais grupos: (i) P98Y11RR, UFUS Carajás, UFUS Impacta e UFUS Xavante; (ii) PI227682, M8230RR, UFUS Capim Branco, Anta82RR e CD208; e (iii) UFUS Milionária (Figura 7).

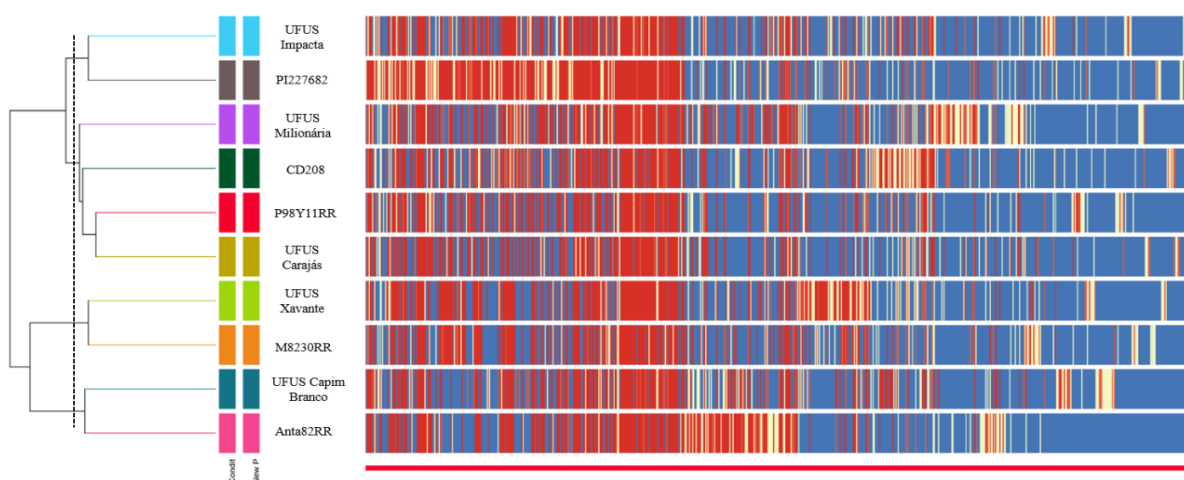


Figura 4 “Heatmap” e agrupamento hierárquico dos perfis de metabólitos secundários não voláteis em genótipos de soja não injuriados de acordo com a similaridade de abundância. As colunas representam o agrupamento das três repetições biológicas dos genótipos, enquanto as linhas representam os metabólitos. O aumento na intensidade de vermelho e azul indicam abundância elevada ou diminuta, respectivamente, de um metabólito em relação a abundância mediana do metabólito.

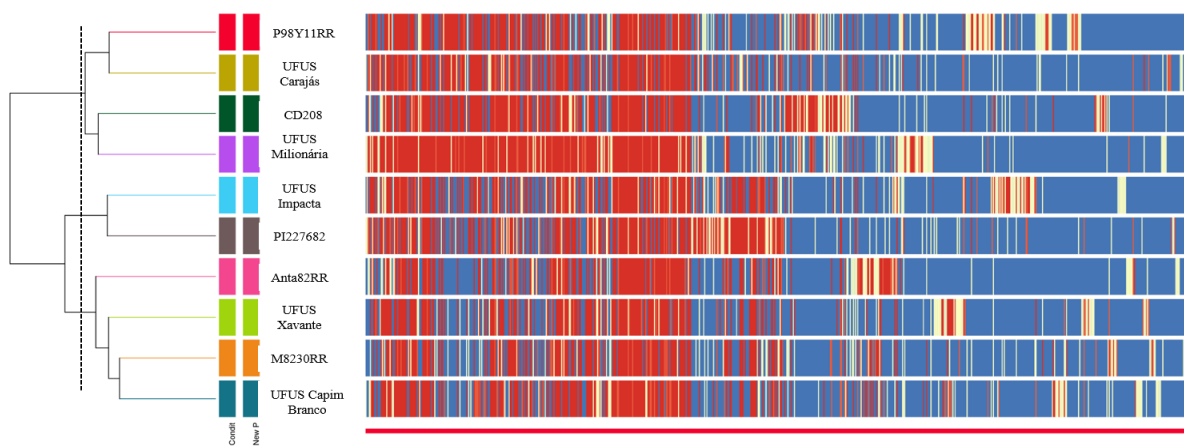


Figura 5 “Heatmap” e agrupamento hierárquico dos perfis de metabólitos secundários não voláteis em genótipos de soja previamente injuriados de acordo com a similaridade de abundância. As colunas representam o agrupamento das três repetições biológicas dos genótipos, enquanto as linhas representam os metabólitos. O aumento na intensidade de vermelho e azul indicam abundância elevada ou diminuta, respectivamente, de um metabólito em relação a abundância mediana do metabólito.

A expressão de compostos não voláteis foi significativamente influenciada pelos genótipos, injúria e a interação entre estes fatores (Tabela 3). Os genótipos UFUS Impacta, PI227682, UFUS Xavante, M8230RR e Anta82RR tiveram o maior número de compostos não voláteis encontrados nos tempos de retenção entre 1 e 5 min quando foram previamente injuriados em relação às plantas não injuriadas, enquanto os genótipos P98Y11RR, UFUS Carajás, CD208 e UFUS Milionária expressaram maior número de compostos encontrados nos tempos de retenção entre 5 e 10 min. Apenas os genótipos UFUS Capim Branco e Anta82RR apresentaram número significativamente maior de compostos não voláteis encontrados nos tempos de retenção entre 10 e 15 min.

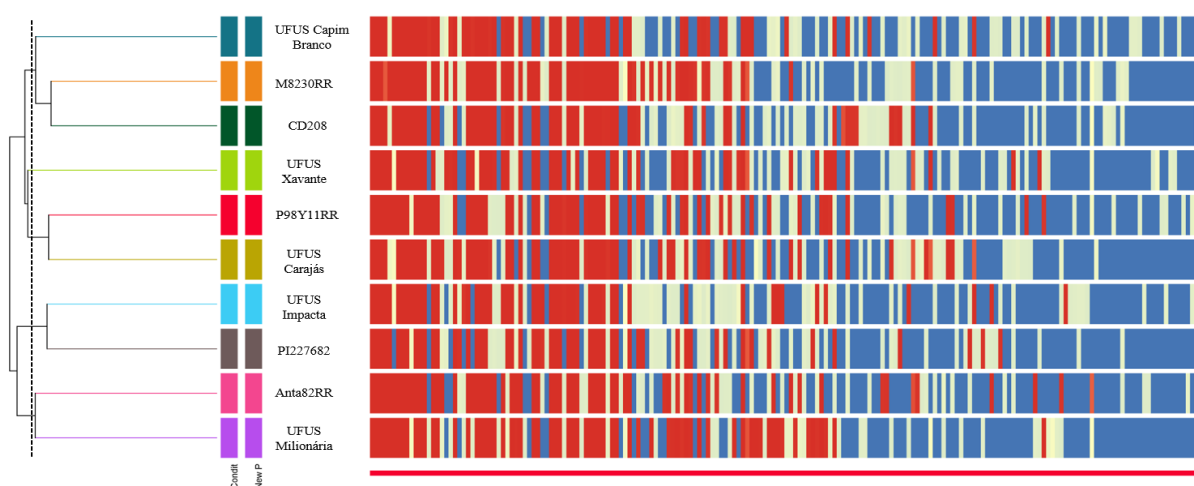


Figura 6 “Heatmap” e agrupamento hierárquico dos perfis de metabólitos secundários voláteis em genótipos de soja não injuriados de acordo com a similaridade de abundância. As colunas representam o agrupamento das três repetições biológicas dos genótipos, enquanto as linhas representam os metabólitos. O aumento na intensidade de vermelho e azul indicam abundância elevada ou diminuta, respectivamente, de um metabólito em relação a abundância mediana do metabólito.

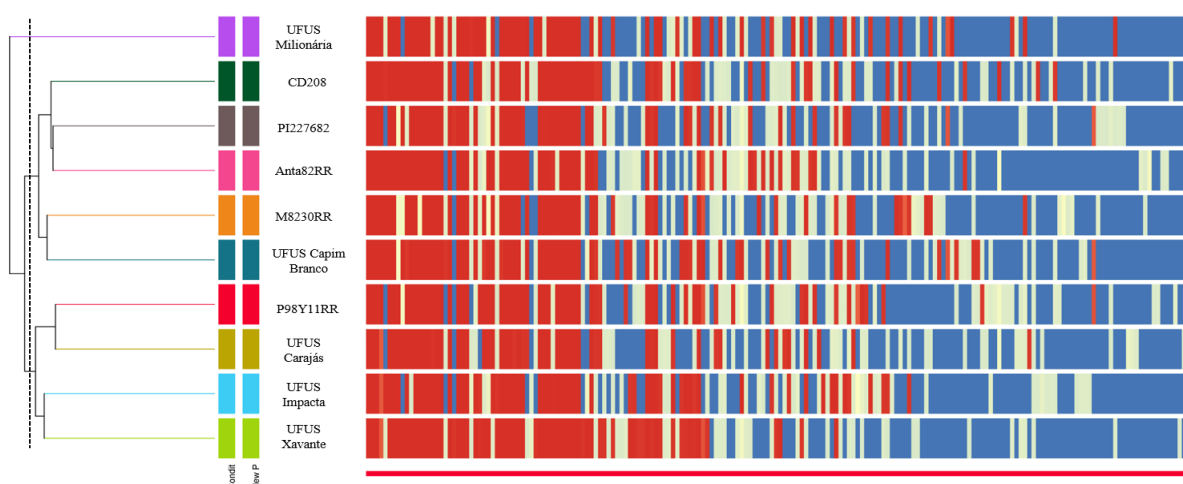


Figura 7 “Heatmap” e agrupamento hierárquico dos perfis de metabólitos secundários voláteis em genótipos de soja previamente injuriados de acordo com a similaridade de abundância. As colunas representam o agrupamento das três repetições biológicas dos genótipos, enquanto as linhas representam os metabólitos. O aumento na intensidade de vermelho e azul indicam abundância elevada ou diminuta, respectivamente, de um metabólito em relação a abundância mediana do metabólito.

O composto kaempferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)-O-[α -L-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside foi o mais abundante nos genótipos, sendo o composto mais acumulado nas folhas analisadas (Figura 8). Além deste, os compostos 6''-O-malonilgenistina, genisteína e glicosídeos de kaempferol também foram encontrados em maior abundância entre os compostos expressos nas plantas (Figura 8). O genótipo CD208 apresentou alta expressão dos compostos 6''-O-malonilgenistina e genisteína após a injúria, sugerindo que estes compostos podem ser induzidos por herbivoria de *S. cosmíoides*. O efeito induzido na expressão de 6''-O-malonilgenistina também foi observado após herbivoria no genótipo M8230RR (Figura 8).

Por outro lado, apenas os compostos voláteis encontrados nos tempos de retenção entre 10 e 20 minutos foram influenciados pelos fatores genótipo e injúria, e sua interação. Houve expressão significativamente maior de compostos voláteis em plantas injuriadas dos genótipos P98Y11RR, UFUS Impacta, UFUS Capim Branco e CD208 em relação às plantas não injuriadas (Tabela 3). O composto 1-octen-3-ol foi quarto maior volátil encontrado e um dos mais abundantes nas plantas de soja (Figura 9). De acordo com estes resultados, foi possível observar que a produção de ambos

os compostos pode ser induzida após a herbivoria, o que eleva os níveis expressos nas plantas dos genótipos avaliados.

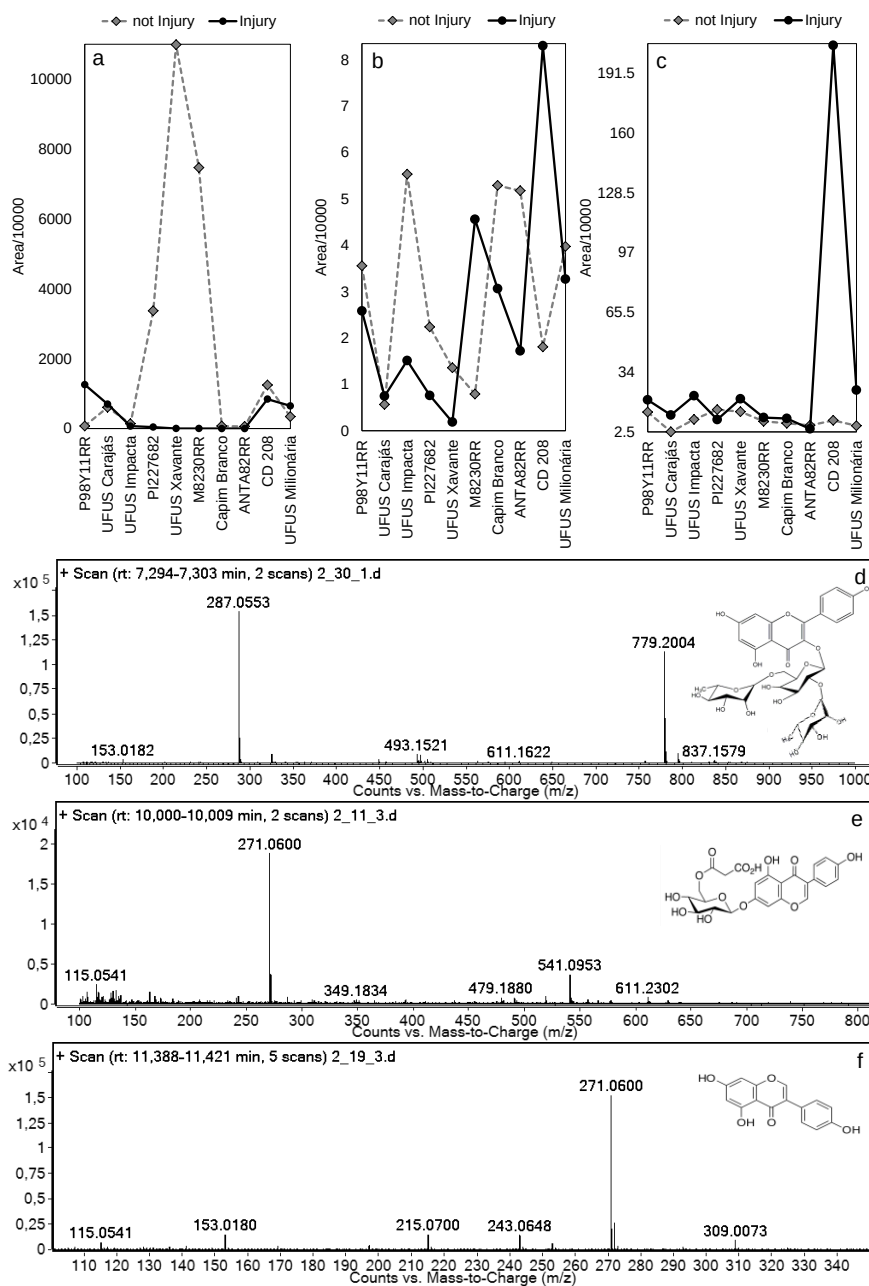


Figura 8. Representação da variação na abundância relativa e espectros de massas obtidos para os compostos não voláteis kaempferol 3-O-β-D-glucopiranosil (1→2)-O-[α-L-ramnopiranosil (1→6)]-β-D-glucopiranoside (a and d), 6''-O-malonylgenistein (b and e) e genisteína (c and f) em folhas de plantas de soja não injuriadas e previamente injuriadas.

Tabela 3. Áreas relativas dos metabólitos secundários encontrados em genótipos de soja submetidos ou não à herbivoria prévia de lagartas de *S. cosmioides*.

Genótipos	Área Relativa (% $\pm$ DP)					
	T _R (min.)	Não voláteis		T _R (min.)	Voláteis	
		Não injuriado	Injuriado		Não injuriado	Injuriado
P98Y11RR	1 – 5	8.14 $\pm$ 1.09	8.86 $\pm$ 2.30	1 – 10	79.6 $\pm$ 2.24	71.9 $\pm$ 2.09
	5 – 10	20.5 $\pm$ 5.53	59.3 $\pm$ 7.61	10 – 20	18.4 $\pm$ 2.41	25.7 $\pm$ 1.69
	10 – 15	71.4 $\pm$ 6.48	31.8 $\pm$ 5.51	20 – 33	2.03 $\pm$ 0.449	2.39 $\pm$ 0.389
UFUS Carajás	1 – 5	10.7 $\pm$ 3.11	12.3 $\pm$ 1.03	1 – 10	78.6 $\pm$ 4.28	78.8 $\pm$ 1.55
	5 – 10	24.9 $\pm$ 8.44	51.2 $\pm$ 3.72	10 – 20	19.0 $\pm$ 3.76	19.4 $\pm$ 1.31
	10 – 15	64.4 $\pm$ 11.4	36.6 $\pm$ 4.00	20 – 33	1.90 $\pm$ 0.238	1.79 $\pm$ 0.403
UFUS Impacta	1 – 5	8.43 $\pm$ 2.33	31.0 $\pm$ 5.28	1 – 10	82.3 $\pm$ 0.769	77.4 $\pm$ 2.14
	5 – 10	31.9 $\pm$ 4.48	32.3 $\pm$ 7.31	10 – 20	15.6 $\pm$ 0.674	20.2 $\pm$ 2.58
	10 – 15	59.7 $\pm$ 4.49	36.6 $\pm$ 2.98	20 – 33	2.07 $\pm$ 0.347	2.43 $\pm$ 0.566
PI227682	1 – 5	8.17 $\pm$ 0.516	17.4 $\pm$ 1.59	1 – 10	81.7 $\pm$ 1.52	78.4 $\pm$ 2.80
	5 – 10	42.8 $\pm$ 12.8	31.5 $\pm$ 1.60	10 – 20	16.0 $\pm$ 1.42	19.3 $\pm$ 2.75
	10 – 15	49.0 $\pm$ 13.2	51.1 $\pm$ 3.11	20 – 33	2.30 $\pm$ 0.127	2.31 $\pm$ 0.271
UFUS Xavante	1 – 5	5.85 $\pm$ 1.11	13.2 $\pm$ 1.05	1 – 10	82.3 $\pm$ 1.82	78.3 $\pm$ 3.55
	5 – 10	55.4 $\pm$ 8.89	38.4 $\pm$ 4.96	10 – 20	15.5 $\pm$ 1.75	19.5 $\pm$ 3.39
	10 – 15	38.8 $\pm$ 8.88	48.3 $\pm$ 4.41	20 – 33	2.13 $\pm$ 0.0636	2.22 $\pm$ 0.352
M8230RR	1 – 5	6.94 $\pm$ 1.12	15.4 $\pm$ 3.01	1 – 10	81.9 $\pm$ 1.18	78.5 $\pm$ 4.60
	5 – 10	45.7 $\pm$ 8.75	24.5 $\pm$ 5.32	10 – 20	16.1 $\pm$ 1.07	19.3 $\pm$ 4.95
	10 – 15	47.4 $\pm$ 9.48	60.0 $\pm$ 8.32	20 – 33	1.92 $\pm$ 0.255	2.28 $\pm$ 0.347
Capim Branco	1 – 5	9.18 $\pm$ 0.839	13.4 $\pm$ 4.15	1 – 10	82.6 $\pm$ 1.02	72.5 $\pm$ 0.599
	5 – 10	39.3 $\pm$ 1.07	24.5 $\pm$ 5.66	10 – 20	15.5 $\pm$ 1.23	25.2 $\pm$ 1.22
	10 – 15	51.5 $\pm$ 0.884	57.1 $\pm$ 2.02	20 – 33	1.83 $\pm$ 0.218	2.56 $\pm$ 0.639
ANTA82RR	1 – 5	10.3 $\pm$ 0.562	16.3 $\pm$ 2.96	1 – 10	84.1 $\pm$ 1.15	80.7 $\pm$ 2.03
	5 – 10	41.7 $\pm$ 4.64	17.3 $\pm$ 0.747	10 – 20	14.1 $\pm$ 1.47	17.3 $\pm$ 2.05
	10 – 15	47.9 $\pm$ 5.19	66.3 $\pm$ 3.06	20 – 33	1.79 $\pm$ 0.377	2.11 $\pm$ 0.531
CD 208	1 – 5	9.78 $\pm$ 3.09	8.47 $\pm$ 0.44	1 – 10	85.8 $\pm$ 1.43	78.5 $\pm$ 0.267
	5 – 10	26.9 $\pm$ 6.63	54.6 $\pm$ 2.66	10 – 20	12.5 $\pm$ 1.14	19.3 $\pm$ 0.587
	10 – 15	63.4 $\pm$ 9.16	36.9 $\pm$ 2.22	20 – 33	1.70 $\pm$ 0.419	2.19 $\pm$ 0.337
UFUS Milionária	1 – 5	11.5 $\pm$ 2.73	10.3 $\pm$ 1.65	1 – 10	82.6 $\pm$ 1.41	77.7 $\pm$ 5.74
	5 – 10	31.4 $\pm$ 5.79	50.1 $\pm$ 9.06	10 – 20	15.2 $\pm$ 1.39	19.5 $\pm$ 4.47
	10 – 15	57.0 $\pm$ 6.79	39.6 $\pm$ 9.75	20 – 33	2.15 $\pm$ 0.0141	2.29 $\pm$ 0.402

T_R: Tempo de Retenção; DP: Desvio Padrão.

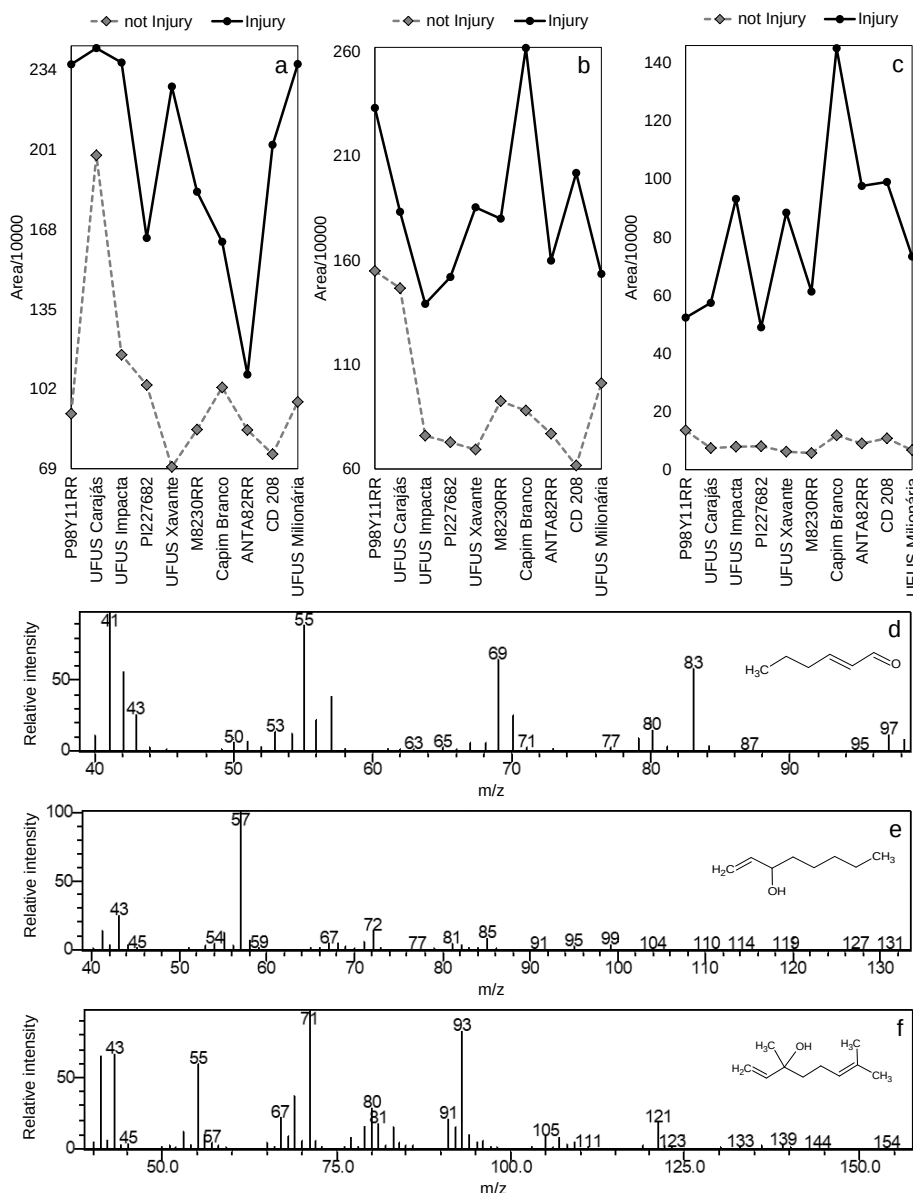


Figura 9. Representação da variação na abundância relativa e espectros de massas obtidos para os compostos voláteis (E)-2-hexenal (a and d), 1-octen-3-ol (b and e) e linalool (c and f) em folhas de plantas de soja não injuriadas e previamente injuriadas.

4. Discussão

Este estudo demonstrou que características constitutivas de resistência observadas nos genótipos de soja avaliados estão relacionadas a mecanismos químicos, como a expressão de metabólitos secundários que provocaram efeitos negativos em lagartas de *S. cosmioides*. Os genótipos PI227682, UFUS Carajás,

UFUS Impacta, M8230RR, UFUS Capim Branco e Anta82RR apresentaram resistência constitutiva por antixenose a *S. cosmioides*, e os genótipos P98Y11RR, CD208 e UFUS Milionária foram suscetíveis, enquanto o genótipo UFUS Xavante apresentou alta suscetibilidade. Adicionalmente, apenas o genótipo PI227682 apresentou resistência constitutiva moderada por antibiose.

Além de semelhanças qualitativas, houve similaridade na abundância de compostos não voláteis entre os genótipos UFUS Xavante, M8230RR, UFUS Capim Branco e Anta82RR, da mesma forma que entre UFUS Impacta e PI227682. Na análise de compostos não voláteis foi possível observar que os genótipos UFUS Impacta, UFUS Capim Branco e Anta82RR expressaram em maior abundância o composto malonil genisteína (6''-O-malonylgenistin) em plantas não injuriadas em relação aos demais genótipos avaliados. Em plantas de soja livres de qualquer estresse biótico ou abiótico, a genisteína é normalmente encontrada em baixos níveis; a forma predominante encontrada constitutivamente é malonil glucosídeo conjugado, malonil genisteína que, após algum estresse biótico ou abiótico, é hidrolisado em genisteína, um isoflavonoide conhecido por causar efeitos negativos em outros insetos-praga da soja como *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Erebididae), *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae) (Piubelli et al., 2003a; Piubelli et al., 2003b; Wegulo et al., 2005; Bentivenha et al., 2018).

Além disso, foi observado que o genótipo UFUS Impacta apresentou alta similaridade na abundância de compostos não voláteis e voláteis com o genótipo padrão de resistência PI227682. Apesar de ocasionar menor consumo por lagartas de *S. cosmioides*, o genótipo UFUS Impacta favoreceu o desenvolvimento das lagartas e foi classificado como suscetível no teste de antibiose. Embora estes genótipos não tenham expressado número significativamente maior de compostos secundários, é possível que compartilhem compostos não voláteis e voláteis específicos envolvidos na deterrência alimentar, sendo expressos constitutivamente em concentrações similares, mas que não foram identificados nas análises. Adicionalmente, o genótipo PI227682 pode expressar um ou mais compostos exclusivamente, que tem efeito direto no desenvolvimento de *S. cosmioides*.

O genótipo UFUS Xavante, embora tenha expressado constitutivamente o composto kaempferol 3-O- β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-O-[α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside em concentração cerca de 10 vezes maior em relação aos demais genótipos, não ocasionou efeitos negativos no comportamento e desenvolvimento de *S. cosmioides* e, portanto, parece não exercer efeito inseticida sobre lagartas desta espécie. De fato, este composto secundário pode ter influenciado positivamente, agindo como estimulante para alimentação de lagartas de *S. cosmioides*, uma vez que outros compostos flavonoides já foram relatados na literatura atraindo insetos herbívoros (Mierziak et al., 2014). Além disso, o menor número de compostos não voláteis encontrados nos tempos de retenção entre 1 e 5 min sugere que a ausência de compostos repelentes e/ou deterrentes pode ter influenciado a maior preferência de *S. cosmioides* neste genótipo.

Os genótipos UFUS Impacta, UFUS Capim Branco e Anta82RR já foram relatados na literatura expressando resistência constitutiva por antixenose a *Chloridea virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), enquanto o genótipo UFUS Xavante foi classificado como suscetível (Eduardo, 2018). Corroborando estes resultados, Moraes (2017) observou que o genótipo de soja M8230RR apresentou resistência por antibiose a *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), enquanto o genótipo CD208 foi classificado como suscetível. De fato, a resistência múltipla, ou seja, determinada característica de resistência expressa na planta a duas ou mais espécies diferentes, embora seja difícil de se obter, é especialmente benéfica e desejável em genótipos comerciais, uma vez que contribui para a regulação simultânea da densidade populacional de diversas pragas e resulta em menor uso de inseticidas químicos, por exemplo (Smith, 2005; Pinheiro et al., 2017).

Por outro lado, (Eduardo, 2018) observou alta resistência constitutiva do genótipo UFUS Milionária a *C. virescens*, e suscetibilidade do genótipo UFUS Carajás. A resistência é o resultado da interação planta-inseto e, portanto, o fator de resistência depende da espécie de inseto, espécie de planta e genótipo. Assim, é comum a ocorrência de resistência específica, em que determinada característica expressa na planta ocasiona efeito negativo em uma espécie-praga mas não afeta outras espécies (Takabayashi et al., 1994; Smith, 2005). É importante ressaltar que este é o primeiro registro na literatura que observou a resistência destes genótipos a *S. cosmioides* e,

portanto, estes resultados fornecem valiosas informações como ferramentas adicionais que poderão auxiliar no manejo de *S. cosmioides* em soja.

A injúria prévia por lagartas de *S. cosmioides* também influenciou significativamente a expressão de compostos secundários nos genótipos de soja, afetou negativamente o comportamento e desenvolvimento de lagartas conspecíficas e revelou que alguns genótipos apresentam repostas de defesa induzida por herbivoria. Foi possível observar, principalmente através das análises multivariadas, que alguns genótipos expressaram resistência induzida por herbivoria, embora tenha sido notado que um período maior de alimentação seja ideal para que os efeitos induzidos no desenvolvimento desta espécie sejam observados com maior distinção em análises univariadas.

Após injúria, os genótipos P98Y11RR, UFUS Millionária, UFUS Carajás e CD208 aumentaram significativamente o número de compostos não voláteis expressos encontrados nos tempos de retenção entre 5 e 10 min em relação às plantas não injuriadas. Observou-se que os perfis de abundância de compostos não voláteis foram similares entre estes genótipos, sugerindo que compostos específicos podem ser expressos em intensidades semelhantes, que resulta em efeitos negativos no desenvolvimento de *S. cosmioides*, e consequente resposta induzida por antibiose em níveis moderados. O genótipo UFUS Millionária destacou-se entre estes genótipos, uma vez que apresentou resistência induzida para ambas as categorias de resistência, antixenose e antibiose. Além disso, este genótipo apresentou maior abundância de compostos voláteis expressos exclusivamente, ou em maior intensidade após herbivoria em relação aos demais genótipos. Estes compostos podem estar relacionados à função deterrente e ou antibiótica à *S. cosmioides* exclusivos para este genótipo.

Já os genótipos PI227682 e M8230RR classificados como resistentes constitutivamente por antixenose, também foram classificados resistentes quando comparados com outros genótipos previamente injuriados. O aumento significativo de compostos não voláteis nos tempos de retenção entre 1 e 5 min e a similaridade observada nos perfis de abundância de compostos voláteis revela a expressão de compostos responsáveis pela indução de resistência após herbivoria. O genótipo UFUS Xavante também se destacou, uma vez que foi classificado como altamente

suscetível constitutivamente, mas demonstrou elevada resposta induzida de defesa após herbivoria que ocasionou efeitos negativos no desenvolvimento de lagartas de *S. cosmioides*.

Após a herbivoria, este genótipo reduziu significativamente o número de compostos não voláteis encontrados nos tempos de retenção entre 5 e 10 min, enquanto nos tempos de retenção entre 1 e 5 min tenha aumentado significativamente o número de compostos expressos. Uma vez que este genótipo afetou significativamente o desenvolvimento de *S. cosmioides*, parece ter havido realocação de recursos energéticos usados em compostos não relacionados com a resistência para a síntese destes compostos (principalmente aqueles encontrados nos tempos de retenção entre 1 e 5 min) possivelmente envolvidos na resistência induzida. Entretanto, o perfil de abundância de compostos voláteis no genótipo UFUS Xavante foi similar com os genótipos P98Y11RR, UFUS Carajás e UFUS Impacta que ocasionaram maior estímulo e preferência alimentar por lagartas, sugerindo que compostos voláteis estimulantes para *S. cosmioides* podem ser expressos em função de estresses bióticos, como o ataque de insetos.

De acordo com War et al. (2012), voláteis de plantas induzidos por herbivoria (HIPVs) representam um importante papel na defesa das plantas. No entanto, custos ecológicos como a atração de herbívoros também podem estar envolvidos. Por exemplo, tem sido demonstrado que a espécie *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) é atraída pela mistura dos compostos voláteis acetato de cis-3-hexenil, linalol e MeSA que são produzidos e emitidos por plantas de batata injuriadas mecanicamente (Dickens, 2000; Dickens, 2006).

Observou-se que após injúria os genótipos PI227682, M8230RR e Anta82RR que foram classificados com resistência por antixenose, também foram agrupados de acordo com os perfis de compostos não voláteis e voláteis induzidos. Além disso, houve diferença significativa quanto ao número de compostos não voláteis encontrados nos tempos de retenção entre 1 e 5 min em plantas injuriadas dos genótipos em comparação às plantas não injuriadas, sugerindo que estes compostos podem ter ocasionado a resposta induzida por antixenose.

Além destes, os genótipos UFUS Capim Branco e CD208 também demonstram perfis de abundância similares e, um aumento significativo de compostos voláteis nos

tempos de retenção entre 10 e 20 min foram observados. Apesar do genótipo UFUS Capim Branco não ser classificado como resistente a *S. cosmioides*, observou-se efeito negativo no consumo foliar de lagartas de *S. cosmioides* em teste com dupla chance de escolha em plantas injuriadas deste genótipo. Entre os compostos voláteis encontrados em maior concentração neste genótipo estão o 1-octen-3-ol e linalool, que podem ter ocasionado deterrence das lagartas, mas com efeito insuficiente para causar resistência. De fato, respostas induzidas de defesa podem atuar diretamente repelindo os insetos através da emissão de voláteis (Poelman e Dicke, 2014).

Estudos revelam que o linalool pode apresentar diversas funções nas plantas que variam de toxinas a atrativos para polinizadores e inimigos naturais, dependendo das específicas e complexas interações planta-herbívoros e das variadas formas e concentrações que são expressas deste composto (Kigathi et al., 2009; Raguso, 2016). Huang et al. (2018) observaram que fêmeas de *H. armigera* tiveram menor preferência para oviposição em plantas de *Nicotina tabacum* geneticamente modificadas que expressam altas concentrações de linalool, assim como o afídeo *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) teve menor preferência para alimentação nestas plantas em relação às plantas controle. O composto 1-octen-3-ol também já foi relatado como volátil induzido por herbivoria e, apesar de ter sido encontrado em outros táxons vegetais, parece ser característico das leguminosas (Kigathi et al., 2009). Como evidenciado em outras espécies de plantas, o 1-octen-3-ol pode ocasionar efeito deterrente contra herbívoros e parece ter influenciado negativamente a alimentação de *S. cosmioides* em plantas de soja previamente injuriadas. Além disso, o aumento significativo no número de compostos não voláteis nos tempos de retenção entre 10 e 15 min sugere que outros metabólitos não identificados podem ter contribuído para os efeitos negativos na alimentação de lagartas de *S. cosmioides* no genótipo UFUS Capim Branco.

Já o genótipo CD208 expressou resposta induzida e causou redução significativa do consumo foliar em teste sem chance de escolha quando comparado com plantas não injuriadas; entretanto, os efeitos foram insuficientes para causar resistência por antixenose, embora tenha sido classificado como resistente por antibiose a *S. cosmioides*. A redução do consumo foliar em lagartas que se alimentaram neste genótipo e os efeitos negativos no desenvolvimento de *S.*

cosmioides podem ter sido ocasionados por compostos não voláteis e voláteis encontrados nos tempos de retenção 5 a 10 e 10 a 20 min, respectivamente, expressos significativamente em maior quantidade após herbivoria. Entre os compostos não voláteis expressos em maior concentração, destacam-se a genisteína e sua forma conjugada, malonil genisteína (6''-O-malonil genisteína) que foram, respectivamente, cerca de 6 e 1,8 vezes mais abundantes no genótipo CD208 em relação aos demais genótipos avaliados.

Entre os maiores desafios para a incorporação de características de resistência em genótipos comerciais através do melhoramento genético está a dificuldade em tornar estas características expressas sem afetar a produtividade, uma vez que a resistência resulta em custo metabólico e consequente redução na realocação de recursos energéticos para o crescimento (Jauhar, 2006; Karasov et al., 2017). No entanto, os resultados encontrados demonstraram que os genótipos comerciais de soja expressaram resistência constitutiva e induzida a *S. cosmioides*. Além disso, não houve correlação entre os modos de expressão constitutivo e induzido nos genótipos avaliados e, portanto, podem ser expressos individualmente ou simultaneamente na mesma planta. Este trabalho corrobora os resultados de Kempel et al. (2011), que observaram em um estudo em que foram avaliadas 40 espécies cultivadas e 18 espécies selvagens, correlação negativa entre os modos de expressão apenas nas espécies selvagens, enquanto esse comportamento não foi evidente nas plantas cultivadas.

Adicionalmente, resultados interessantes foram encontrados neste estudo, uma vez que alguns genótipos comerciais considerados constitutivamente suscetíveis a *S. cosmioides*, como P98Y11RR, CD 208 e, especialmente, UFUS Milionária e UFUS Xavante, expressaram resposta induzida, sendo classificados como resistentes a esta espécie-praga. Além disso, os genótipos PI227682 e UFUS Carajás apresentaram resistência constitutiva e induzida a *S. cosmioides*. Portanto estes genótipos são recursos promissores como estratégia adicional de manejo de pragas, e futuros trabalhos a campo devem ser realizados para avaliar a expressão de suas características de resistência e desempenho sobre populações de *S. cosmioides*.

Estudos em metabolômica são recentes, no entanto, têm sido cada vez mais frequentes em programas de melhoramento em resistência de plantas a insetos

(Emani, 2018). Esta ferramenta permite a realização de estudos de perfil metabólico, e com isso, a compreensão da função e regulação de diferentes metabólitos que podem levar ao aumento de produtividade e resistência a estresses bióticos e abióticos em culturas (Chaudhary et al., 2019). Além disso, os metabólitos são os mais preditivos do fenótipo, pois são os produtos finais da expressão gênica e da tradução de proteínas (Fiehn, 2002). Assim, como visto neste trabalho, os perfis metabólicos podem servir de indicativos e marcadores de compostos químicos que podem auxiliar a busca fenotípica de características desejáveis em trabalhos de resistência de plantas a insetos em grande escala, sem necessariamente conhecer a função exata ou a identidade de um ou mais metabólitos, desde que haja uma correlação com a resistência a determinado inseto (Chaudhary et al., 2019).

Adicionalmente, trabalhos futuros devem ser conduzidos com análises metabolômicas direcionadas para identificar os compostos secundários encontrados nestes genótipos, responsáveis pela expressão de resistência constitutiva e induzida. Apesar das valiosas contribuições de estudos em metabolômica, abordagens promissoras da integração desta tecnologia às outras técnicas como proteômica, genômica e transcriptômica irão auxiliar a compreensão completa dos processos biológicos e avanços em estudos de resistência de plantas a insetos para implementação em programas de melhoramento (Emani, 2018; Gupta et al., 2018). Além disso, a metabolômica também pode ser utilizada em estudos com plantas geneticamente modificadas e recentes ferramentas de edição de genoma como CRISPR/CAS9, para testar mudanças previstas no metaboloma de plantas modificadas (Emani, 2018).

Os resultados deste trabalho demonstram que o comportamento e o desenvolvimento de *S. cosmioides* são influenciados pelos diferentes genótipos de soja e herbivoria prévia. Observou-se que os genótipos comerciais UFUS Millionária e UFUS Xavante, expressam resistência induzida e os genótipos PI227682 e UFUS Carajás apresentam resistência constitutiva e induzida a *S. cosmioides*. Portanto, ambos os modos de expressão podem atuar individualmente e/ou em conjunto e devem ser considerados em estudos de resistência. Por fim, foi destacado que os perfis químicos de metabólitos secundários variam substancialmente entre genótipos e que a herbivoria prévia influencia diretamente a síntese e intensidade de expressão

dos compostos, e que os perfis podem servir de indicativos e marcadores que podem auxiliar trabalhos voltados para resistência de plantas a insetos.

5. Referências

Agrawal AA, Conner JK, Rasman S (2010) Tradeoffs and negative correlations in evolutionary ecology. **Evolution Since Darwin: the first** 150:243-268.

Bentivenha JP, Canassa VF, Baldin EL, Borguini MG, Lima GP, Lourenção AL (2018) Role of the Rutin and Genistein Flavonoids in Soybean Resistance to *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae). **Arthropod-Plant Interactions** 12:311-320.

Bernardi O, Sorgatto RJ, Barbosa AD, Domingues FA, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Head GP, Omoto C (2014) Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop Protection** 58:33-40.

Boiça Júnior AL, Bottega DB, Souza BHS, Rodrigues NEL, Michelin V (2015) Determinação dos tipos de resistência a *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de soja. **Semina: Ciências Agrárias** 36:607-618.

Bueno RCOF, Bueno AF, Moscardi F, Parra JRP, Hoffmann-Campo CB (2011) Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science** 67:170-174.

Cajka T, Fiehn O (2015) Toward merging untargeted and targeted methods in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics. **Analytical Chemistry** 88:524-545.

Capalbo DMF, Suzuki MT (2017) The Importance of *Bacillus thuringiensis* in the Context of Genetically Modified Plants in Brazil. In.: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.) **Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus**. Switzerland: Springer. p. 259-271.

Chaudhary J, Deshmukh R, Mir ZA, Bhat JA (2019) Metabolomics: An Emerging Technology for Soybean Improvement. . In.: Khoobchandani M, Saxena A (Eds.) **Biotechnology Products in Everyday Life**. Switzerland: Springer. p. 175-186.

Chen MS (2008) Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. **Insect science** 15:101-114.

Dickens J (2006) Plant volatiles moderate response to aggregation pheromone in Colorado potato beetle. **Journal of Applied Entomology** 130:26-31.

Dickens JC (2000) Orientation of Colorado potato beetle to natural and synthetic blends of volatiles emitted by potato plants. **Agricultural and Forest Entomology** 2:167-172.

Eduardo WI (2018). **Metodologia de pesquisa, níveis nas categorias de resistência constitutiva em genótipos de soja e resistência induzida a *Heliothis virescens* e os mecanismos de defesas envolvidos**. 135 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Entomologia Agrícola) - Unesp Jaboticabal.

Emani C (2018) **The Biology of Plant-insect Interactions: A Compendium for the Plant Biotechnologist**. Londres: CRC Press. 228p.

Fehr WR, Caviness CE (1977) **Stages of soybean development**. Iowa: State University of Science and Technology, 11 p. (State University of Science and Technology. Documento, 80).

Fiehn O (2002) Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. In.: Town C (ed.) **Functional Genomics**. Dordrecht: Springer. p. 155-171.

Freitas MM (2016). **Fatores intrínsecos às plantas de soja na expressão da resistência constitutiva e induzida a *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858)(Lpidoptera: Noctuidae)**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Entomologia Agrícola) - Unesp Jaboticabal.

Freitas MM, Souza BHS, Nogueira L, Di Bello MM, Boiça Júnior ALB (2017) Soybean defense induction to *Spodoptera cosmioides* herbivory is dependent on plant genotype and leaf position. **Arthropod-Plant Interactions** 12:85-96.

Greene G, Leppla N, Dickerson W (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 69:487-488.

Gupta R, Min CW, Kramer K, Agrawal GK, Rakwal R, Park KH, Wang Y, Finkemeier I, Kim ST (2018) A multi-omics analysis of glycine max leaves reveals alteration in flavonoid and isoflavonoid metabolism upon ethylene and abscisic acid treatment. **Proteomics** 18:1700366.

Habib M, Paleari L, Amaral M (1982) Effect of three larval diets on the development of the armyworm, *Spodoptera latifascia* Walker, 1856 (Noctuidae, Lepidoptera). **Revista Brasileira de Zoologia** 1:177-182.

Huang XZ, Xiao YT, Köllner TG, Jing WX, Kou JF, Chen JY, Liu DF, Gu SH, Wu JX, Zhang YJ (2018) The terpene synthase gene family in *Gossypium hirsutum* harbors a linalool synthase GhTPS12 implicated in direct defence responses against herbivores. **Plant, Cell & Environment** 41:261-274.

Jauhar PP (2006) Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: the prospects and challenges. **Crop Science** 46:1841-1859.

Karasov TL, Chae E, Herman JJ, Bergelson J (2017) Mechanisms to mitigate the trade-off between growth and defense. **The Plant Cell** 29:666-680.

Karban R (2011) The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. **Functional Ecology** 25:339-347.

Karban R, Agrawal AA, Mangel M (1997) The benefits of induced defenses against herbivores. **Ecology** 78:1351-1355.

Kempel A, Schädler M, Chrobock T, Fischer M, van Kleunen M (2011) Tradeoffs associated with constitutive and induced plant resistance against herbivory. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 108:5685-5689.

Kigathi RN, Unsicker SB, Reichelt M, Kesselmeier J, Gershenzon J, Weisser WW (2009) Emission of volatile organic compounds after herbivory from *Trifolium pratense* (L.) under laboratory and field conditions. **Journal of Chemical Ecology** 35:1335-1348.

Kogan M (1972) Feeding and nutrition of insects associated with soybeans. 2. Soybean resistance and host preferences of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis*. **Annals of the Entomological Society of America** 65:675-683.

Leiss KA, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R, Klinkhamer PG (2009) Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. **Plant Physiology** 150:1567-1575.

Mierziak J, Kostyn K, Kulma A (2014) Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules** 19:16240-16265.

Miranda J (2010) **Manejo integrado de pragas do algodoeiro no cerrado brasileiro.**

Moraes RFO (2017). **Técnicas de avaliação do desempenho alimentar e de oviposição, categorias e mecanismos de resistência de genótipos de soja à *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: noctuidae).** 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Entomologia Agrícola) - Unesp Jaboticabal.

Moscardi F, Bueno A, Sosa-Gómez DR, Roggia S, Hoffmann-Campo CB, Pomari AF, Corso IC, Yano SAC (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In.: HOFFMANN-CAMPO CBC-F, B. S.; MOSCARDI, F. (ed.) **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga.** Brasília: Embrapa. p. 859.

Pinheiro JB, Vendramim JD, Lourenção AL (2017) Resistance to Insects. In.: Silva FL, Borém A, Sedyama T, Ludke WH (Eds.) **Soybean Breeding.** Cham: Springer. p. 351-357.

Piovesan M, Carneiro E, Specht A, Casagrande MM (2019) Where and when? How phenological patterns of armyworm moths (Lepidoptera: Noctuidae) change along a latitudinal gradient in Brazil. **Bulletin of Entomological Research** 109:490-499.

Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, Arruda ICd, Lara FM (2003a) Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on soybean genotypes. **Neotropical Entomology** 32:127-132.

Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, De Arruda IC, Franchini JC, Lara FM (2003b) Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology** 29:1223-1233.

Poelman EH, Dicke M (2014) Plant-mediated interactions among insects within a community ecological perspective. **Annual Plant Reviews Online**:309-337.

Raguso RA (2016) More lessons from linalool: insights gained from a ubiquitous floral volatile. **Current Opinion in Plant Biology** 32:31-36.

Rasmann S, Chassin E, Bilat J, Glauser G, Reymond P (2015) Trade-off between constitutive and inducible resistance against herbivores is only partially explained by gene expression and glucosinolate production. **Journal of experimental botany** 66:2527-2534.

Rasmann S, Buri A, Gallot-Lavallée M, Joaquim J, Purcell J, Pellissier L (2014) Differential allocation and deployment of direct and indirect defences by *Vicia sepium* along elevation gradients. **Journal of Ecology** 102:930-938.

SAS 2013. SAS/STAT[®] User's Guide computer program, version 9.4. By SAS, Cary, NC.

Schaller A (2008) **Induced Plant Resistance to Herbivory**. Dordrecht: Springer. 462p.

Silva DM, Freitas Bueno A, Santos Stecca C, Andrade K, Neves PMOJ, Oliveira MCN (2017) Biology of *Spodoptera eridania* and *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. **Florida Entomologist** 100:752-761.

Silvain JF, Lalanne-Cassou B (1997) Distinction entre *Spodoptera latifascia* (Walker) et *Spodoptera Cosmioides* (Walker), bona species (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Francesa de Entomologia** 19:95-97.

Smith CM (2005) **Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches**. Dordrecht: Springer. 423p.

Smith CM, Clement SL (2012) Molecular bases of plant resistance to arthropods. **Annual review of entomology** 57:309-328.

Souza B, Silva A, Janini J, Júnior AB (2014) Antibiosis in soybean genotypes and the resistance levels to *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology** 43:582-587.

Souza BHS, Boiça Júnior AL, Janini JC, Silva AG, Rodrigues L, Elisa N (2012) Feeding of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean genotypes. **Revista Colombiana de Entomología** 38:215-223.

Stasoft Inc 2004. Statistica (data analysis software system) computer program, version 7.0. By Stasoft Inc, Tulsa.

Stout MJ (2013) Reevaluating the conceptual framework for applied research on host-plant resistance. **Insect Science** 20:263-272.

Stout MJ (2014) Types and Mechanisms of Rapidly Induced Plant Resistance to Herbivorous Arthropods. In.: Walters DRN, Adrian, C; Lyon, Gary, D (ed.) **Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection**. Oxford: John Wiley & Sons. p. 81-100.

Takabayashi J, Dicke M, Posthumus MA (1994) Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interactions: variation caused by biotic and abiotic factors. **Journal of Chemical Ecology** 20:1329-1354.

Tamiru A, Khan ZR, Bruce TJ (2015) New directions for improving crop resistance to insects by breeding for egg induced defence. **Current Opinion in Insect Science** 9:51-55.

Underwood N, Morris W, Gross K, Lockwood III JR (2000) Induced resistance to Mexican bean beetles in soybean: variation among genotypes and lack of correlation with constitutive resistance. **Oecologia** 122:83-89.

Underwood NC (1998) The timing of induced resistance and induced susceptibility in the soybean-Mexican bean beetle system. **Oecologia** 114:376-381.

Waldbauer G (1968) The consumption and utilization of food by insects. **Advances in Insect Physiology** 5:229-288.

War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC (2012) Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior** 7:1306-1320.

Ward JH (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association** 58:236-244.

Wegulo SN, Yang X-B, Martinson CA, Murphy PA (2005) Effects of wounding and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on isoflavone concentrations in soybean. **Canadian Journal of Plant Science** 85:749-760.

Zakir AZ (2011) **Inducible defenses in herbivore-plant interactions: functions mechanisms and manipulations**. Uppsala: Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agriculture Science, Swedish University of Agriculture Sciences, 1-27 p. (Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agriculture Science, Swedish University of Agriculture Sciences. Documento, 2011-2).

Zhang P-J, Shu J-P, Fu C-X, Zhou Y, Hu Y, Zalucki MP, Liu S-S (2008) Trade-offs between constitutive and induced resistance in wild crucifers shown by a natural, but not an artificial, elicitor. **Oecologia** 157:83-92.

Züst T, Agrawal AA (2017) Trade-offs between plant growth and defense against insect herbivory: an emerging mechanistic synthesis. **Annual review of plant biology** 68:513-534.

CAPÍTULO 4 – Considerações finais

A ocorrência de pragas é considerada um dos principais fatores limitantes para altas produtividades nas culturas de interesse econômico. A soja é hospedeira de diversos artrópodes-praga que ocorrem durante todo o ciclo da cultura e impactam significativamente a produção mundial. Neste estudo foi demonstrado que a resistência de plantas como estratégia adicional pode ser uma alternativa benéfica para o manejo de pragas e especialmente para a espécie *S. cosmioides*, uma vez que pode haver efeito sinérgico e aditivo com as táticas atualmente utilizadas, que não tem sido eficientes em controlar esta praga quando empregadas isoladamente.

As plantas possuem mecanismos de defesa herdados que resultam em inúmeras características de resistência a insetos-praga. Observou-se neste estudo, que características constitutivas e induzidas de resistência podem ser expressas em genótipos comerciais de soja e que a variação na expressão dessas características é dependente do genótipo e idade das plantas. Os genótipos PI227682, UFUS Carajás e UFUS Impacta, afetaram negativamente a preferência alimentar de lagartas de *S. cosmioides* alimentadas tanto em plantas em estágio vegetativo V3 como em estágio reprodutivo R1-R2. Por outro lado, plantas em estágio V3 dos genótipos UFUS Xavante e UFUS Milionária apresentaram suscetibilidade quando não injuriadas, mas afetaram significativamente a preferência alimentar e o desenvolvimento de lagartas de *S. cosmioides* alimentadas em plantas não injuriadas em estágio R1-R2.

É interessante ressaltar que, embora as plantas em estágio V3 não injuriadas destes genótipos tenham apresentado suscetibilidade, efeito significativo de resistência em plantas previamente injuriadas foi observado em ambos os genótipos contra *S. cosmioides*. Portanto, é possível inferir que os recursos energéticos são priorizados para o crescimento destas plantas durante a fase vegetativa, sendo realocados para a defesa somente na presença de fatores estressores, enquanto na fase reprodutiva tais recursos passam a ser expressos constitutivamente em maior quantidade como característica evolutiva.

De acordo com os resultados, é possível afirmar que estas características constitutivas e induzidas de resistência podem ser expressas individualmente ou em conjunto e que mecanismos químicos estão diretamente envolvidos. No entanto, os

resultados demonstram que aqueles genótipos que possuem ambos os modos de expressão tendem a apresentar níveis menos expressivos de resistência induzida, como os genótipos PI227682 e M8230RR. Por outro lado, genótipos constitutivamente suscetíveis, como UFUS Xavante e UFUS Milionária, elevam substancialmente os níveis de resistência após herbivoria. Embora os resultados sugiram que ambos os modos de resistência possam ser expressos simultaneamente como característica intrínseca de alguns genótipos, é evidente que tais características competem pelos recursos energéticos da planta.

Como visto neste estudo, a resistência observada em alguns genótipos comerciais parece ser mediada por diversos compostos secundários que podem ser expressos constitutivamente e/ou de forma induzida, e o maior desafio em elucidar os mecanismos envolvidos está na capacidade das técnicas atuais em analisar e identificar a grande quantidade e diversidade de compostos secundários expressos nas plantas. Neste sentido, abordagens com análises químicas analíticas em larga escala, como a metabolômica, têm sido fundamentais para auxiliar a compreensão dos complexos processos bioquímicos e expressão de metabólitos secundários envolvidos nos mecanismos de defesa para o avanço em pesquisas relacionadas com a resistência de plantas a insetos.

É preciso ressaltar que a compreensão complexa dos mecanismos relacionados com a resistência de plantas a insetos deve considerar não somente a expressão de compostos secundários, mas também de proteínas de defesa, além de características morfológicas que, eventualmente, possam estar envolvidas na defesa. Portanto, é fundamental que estudos subsequentes investiguem a influência destes fatores na expressão de resistência a *S. cosmioides* nestes genótipos de soja.

Resultados promissores foram observados em alguns genótipos, especialmente para UFUS Xavante e UFUS Milionária, uma vez que priorizam recursos para desenvolvimento durante a fase vegetativa e realocam tais recursos somente sob a ação de fatores estressores, enquanto na fase reprodutiva, certos níveis de resistência constitutiva são expressos. *Spodoptera cosmioides* pode ocorrer durante todo o ciclo de desenvolvimento da soja, no entanto, devido ao hábito de se alimentar tanto em folhas como em vagens, maiores danos têm sido observados durante a fase reprodutiva da soja, em que esta praga é frequentemente relatada a

surtos populacionais e prejuízos significativos. Assim, níveis de resistência constitutiva durante a fase reprodutiva são desejáveis e podem auxiliar o manejo de *S. cosmioides* em campo.

Sabe-se que a expressão de características de resistência é influenciada pelo ambiente e, portanto, é imprescindível que os genótipos que apresentaram os melhores resultados sejam avaliados em condições de campo quanto à resistência a *S. cosmioides*.

Portanto, a busca e o entendimento destas características são fundamentais para o uso no manejo de pragas, uma vez que, através da inserção destas características em plantas por meio do melhoramento genético e/ou engenharia genética é possível a obtenção de genótipos comerciais resistentes e adaptadas às diversas regiões produtoras de soja no Brasil.