

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

***cis*-JASMONE E TWEEN 20 NA INDUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM SOJA E SEUS
EFEITOS EM INSETOS-PRAGA**

José Perez da Graça

Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Dezembro de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***cis*-JASMONE E TWEEN 20 NA INDUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM SOJA E SEUS
EFEITOS EM INSETOS-PRAGA**

José Perez da Graça

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti

Co-orientadora: Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo

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 (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Dezembro de 2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOSÉ PEREZ DA GRAÇA – nascido em 8 de dezembro de 1980, na cidade de Cornélio Procópio – PR, filho de Manoel Feijó da Graça e Maria Perez da Graça. Formou-se biólogo pela Universidade do Norte do Paraná – Campus Luiz Meneguel – Bandeirantes - PR, em dezembro de 2005. Durante o curso de graduação atuou na área de entomologia e ecologia química com a avaliação tricomas e enzimas lipoxigenases de genótipos de soja sob orientação da Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo. Em fevereiro de 2007 concluiu curso de pós-graduação em Bioquímica Aplicada pela Universidade Estadual de Londrina com o estudo da produção de exoenzimas do fungo causador da vassoura-de-bruxa no cacauero. Em 2009 conclui o curso de mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade Estadual Paulista sob orientação da Dra. Sonia M. Zingaretti e co-orientação da Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo com o estudo de parâmetros fisiológicos em cana-de-açúcar envolvidos na tolerância à seca. No mesmo ano ingressou no curso de doutorado da referida faculdade.

*Amigo é coisa para se guardar
Debaixo de sete chaves
Dentro do coração
Assim falava a canção que na América ouvi
Mas quem cantava chorou
Ao ver o seu amigo partir*

*Mas quem ficou, no pensamento voou
Com seu canto que o outro lembrou
E quem voou, no pensamento ficou
Com a lembrança que o outro cantou*

*Amigo é coisa para se guardar
No lado esquerdo do peito
Mesmo que o tempo e a distância digam "não"
Mesmo esquecendo a canção
O que importa é ouvir
A voz que vem do coração*

*Pois seja o que vier, venha o que vier
Qualquer dia, amigo, eu volto
A te encontrar
Qualquer dia, amigo, a gente vai se encontrar.*

À minha mãe Maria Perez da Graça e meu pai Manoel Feijó da Graça, pelo amor incondicional, dedicação e incentivo!

Ofereço,

A minha irmã Vânia, meu cunhado Nilton, meus sobrinhos Otávio e Igor, meus amigos João e Alice pelo carinho.

Com amor

Especialmente à minha amiga Selma (in memoriam), que foi um exemplo de vida, pela honestidade e amizade incondicionais. Saudade é uma palavra simples demais para exemplificar sua ausência!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela força para desenvolver este trabalho, pois sem Ele nada seria possível.

A todos da minha família, pelo incentivo.

A Profa Dra. Sonia Marli Zingaretti, pela orientação.

A Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo pela co-orientação, amizade, paciência e ensinamentos valiosos para a realização do meu trabalho meu eterno agradecimento.

A Dra. Maria Cristina Neves Oliveira e a equipe do laboratório de biometria pelas sugestões e ensinamentos estatísticos.

A Universidade Estadual Paulista – Câmpus Jaboticabal - pela oportunidade de realização do curso.

Ao Profº Dr. Rinaldo Cesar de Paula, coordenador do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela ajuda.

A Embrapa-Soja pelo uso da estrutura física de casa-de-vegetação e laboratórios para a realização de todos os experimentos.

A Dra. Janete A. Desidério e ao Dr. Manoel Victor F. Lemos pelos ensinamentos durante o estágio de docência.

Aos professores Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, Dra. Janete A. Desidério, Dr. Renê de Oliveira Beleboni e Dra. Elaine Costa Souza pelas sugestões no exame de qualificação.

As professoras Dra. Janete A. Desidério, Dra. Maria Cristina Neves de Oliveira, Dra. Lizandra L. Catelli e Dra. Sandra Helena pela participação e sugestões na defesa de minha tese.

Aos amigos de Jaboticabal Viviane, Deise, Hélio, Alysso, Paulo, Teresinha, Jaqueline pela ajuda e amizade.

Aos professores do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos e dedicação.

Aos funcionários da Embrapa-Soja Jovenil, Sérgio Henrique, Oriverto, Pavão, Carneiro, Ivanilda, Neiva, Rodrigo, João Alves, Giovani, Moisés, Mari, Gustavo, Donizete pelo convívio e ensinamentos.

A todos os amigos da Embrapa-Soja em especial a Tati Ueda, Tati Janegitz, Simone, Mariana, Thais e Lizandra, pelo convívio.

A meus pais Maria e Manoel pelo exemplo de vida, amor, dignidade e apoio.

A minha amiga Fabiana (Fá) pela amizade, por momentos de grande alegria tanto na vida profissional como pessoal. A você Fá, minha admiração.

A Marilza Motta, pela amizade, ajuda, alegria e bons momentos vivenciados durante minha permanência em Jaboticabal.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização e enriquecimento deste trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
CAPÍTULO 1	
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1.1. Metabolismo secundário.....	3
1.1.2. Jasmonatos.....	6
1.2. OBJETIVOS.....	10
1.3. REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 2	
Aplicação exógena de <i>cis</i> -Jasmone em plantas de soja afeta o peso do percevejo <i>Euschistus heros</i> por desencadear a produção de isoflavonoides em vagens e grãos.....	19
2.1. INTRODUÇÃO.....	20
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.2.1. Material Vegetal	21
2.2.2. Tratamento com <i>cis</i> -Jasmone.....	22
2.2.3. Bioensaio com o percevejo <i>E. heros</i>	22
2.2.4. Extração dos isoflavonoides.....	23
2.2.5. Identificação e Quantificação por HPLC.....	24
2.2.6. Análise Estatística.....	25
2.3. RESULTADOS.....	27
2.3.1. Ganho de peso do inseto.....	27
2.3.2. Isoflavonoides – Vagem.....	29
2.3.3. Isoflavonoides – Grão.....	39

2.4. DISCUSSÃO.....	49
2.5. CONCLUSÕES.....	53
2.6. REFERÊNCIAS.....	54

CAPÍTULO 3

Tween 20 ou <i>cis-Jasmone</i> estimulam o metabolismo secundário de plantas de soja e que afetam o peso da lagarta-da-soja?.....	60
3.1. INTRODUÇÃO.....	61
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.2.1. Material Vegetal.....	63
3.2.2. Tratamento das plantas com <i>cis-Jasmone</i>	63
3.2.3. Ganho de peso da lagarta <i>A. gemmatilis</i>	63
3.2.4. Extração dos isoflavonoides.....	64
3.2.5. Identificação e Quantificação por HPLC	65
3.2.6. Análise Estatística	66
3.3. RESULTADOS.....	68
3.3.1. Ganho de peso do inseto.....	68
3.3.2. Produção de isoflavonoides.....	70
3.4. DISCUSSÃO.....	79
3.5. CONCLUSÕES.....	82
3.6. REFERÊNCIAS.....	83

***cis*-JASMONE E TWEEN 20 NA INDUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM SOJA E SEUS EFEITOS EM INSETOS-PRAGA**

RESUMO. A pulverização com os tratamentos água; água + Tween 20; e água + Tween 20 + *cis*-Jasmone nos genótipos BRS 134, IAC 100 e Dowling afetaram negativamente o peso de insetos-praga da soja. Plantas de soja pulverizadas no estágio R6 com os tratamentos foram utilizadas para avaliar o efeito do *cis*-Jasmone sobre ganho de peso do percevejo-marrom, *Euschistus heros*. Plantas da cultivar Dowling tratadas com *cis*-Jasmone reduziram significativamente o peso do percevejo. A aplicação do *cis*-Jasmone também provocou a produção de isoflavonoides nas vagens e nos grãos. Nas vagens foi observado o aumento das formas glicosídicas (daidzina e genistina) e das malonís (daidzina e genistina), assim como das agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína). No grão, observou-se o aumento das concentrações de daidzeína e malonil genistina. Plantas dos mesmos genótipos no estágio V3, foram pulverizadas com os mesmos tratamentos. As folhas de plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone reduziram o peso de *Anticarsia gemmatilis* tanto na cultivar IAC 100 como Dowling. A produção de isoflavonóides nas folhas foi afetada pela aplicação do Tween 20 e *cis*-Jasmone, aumentando a concentração da malonil (daidzina, glicitina e genistina) e da aglicona daidzeína. Pelas análises foi observado aumento da concentração da fitoalexina coumestrol nas plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone. A influência negativa no peso dos insetos e aumento da concentração dos isoflavonóides sugere que o Tween 20 e o *cis*-Jasmone tem papel importante na indução da rota dos fenilpropanoides e que estes compostos afetam o desenvolvimento de insetos-praga.

Palavras-chave: *Glycine max*, jasmonatos, lagarta-da-soja, metabólitos secundários, percevejo-marrom.

***cis*-JASMONE AND TWEEN 20 IN THE INDUCTION OF SECONDARY METABOLITES IN SOYBEAN AND ITS EFFECTS IN INSECT-PESTS**

SUMMARY. The spray treatments water; water + Tween 20; and water + Tween 20 + *cis*-Jasmone in the genotypes BRS 134, IAC 100 and Dowling had negative effects on the weight of insect-pests of soybean. Soybean plants sprayed with treatments at R6 stage were used to evaluate the effect of *cis*-Jasmone on the weight gain of brown stink-bug, *Euschistus heros*. Plants of Dowling treated with *cis*-Jasmone significantly reduced the weight of the stink-bug. The application of *cis*-Jasmone also triggered the production of isoflavonoids in soybean pods and grains. In the pods, it was observed increasing in the glycosidic (daidzin and genistina), and the malonyl (daidzin and genistin), as well as the aglycone (daidzein, glycitein and genistein) forms. In the grain isoflavonoids daidzein and malonyl genistein concentrations increased. Plants of the same genotypes at V3 stage were sprayed with the same treatments. Leaf plants treated with Tween 20 and *cis*-Jasmone reduced the weight of *Anticarsia gemmatalis* in the cultivar IAC 100 and Dowling. The production of isoflavonoids in leaves was affected by Tween 20 and *cis*-Jasmone sprayings, increasing the concentration of malonyl (daidzin, genistin and glycitin) and aglycone daidzein. By these analyzes, it was observed increasing in phytoalexin coumestrol concentration in plants treated with Tween 20 and *cis*-Jasmone. The negative influence on the weight of insects and on the increase of isoflavonoid concentrations suggests that the Tween 20 and *cis*-Jasmone plays an important role in inducing pathway of phenylpropanoids and that these compounds affect development of insect-pests.

Keywords: *Glycine max*, jasmonates, velvetbean, secondary metabolites, brown stink-bug.

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja foi a cultura que mais cresceu no Brasil e no mundo nos últimos 35 anos, sendo a principal responsável pela expansão da fronteira agrícola brasileira. As exportações do grão, farelo e do óleo geraram para o país receita que ultrapassa 20 bilhões de dólares, demonstrando o valor que essa cultura representa para o mercado nacional. A expectativa é de que o Brasil, em 2019, produza cerca de 40% do grão e 73% do óleo de soja do mercado mundial (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2012). Entretanto, para se tornar líder mundial de produção, o Brasil necessita reduzir as perdas geradas por fatores causados por estresses bióticos e abióticos.

Dentre os prejuízos causados pelos estresses bióticos, os insetos-praga consistem em um dos maiores fatores na redução da produção de diferentes culturas. Na soja os principais grupos de pragas incluem os insetos sugadores e desfolhadores. Dos insetos sugadores se destacam as espécies da família Pentatomidae, como os percevejos *Nezara viridula*, *Euschistus heros* e *Piezodorus guildinii* que ocasionam reduções na qualidade e produtividade dos grãos. Dentre os insetos desfolhadores, a *Anticarsia gemmatilis* também conhecida como a “lagarta-da-soja”, é uma das principais pragas e, no Brasil, encontra-se distribuída em praticamente todas as áreas de cultivo (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Os métodos de controle de doenças e pragas mais comumente utilizados são os agrotóxicos. No entanto, apesar da importância para o controle das populações de pragas, o uso incorreto de inseticidas pode afetar não somente o inseto alvo, como também inimigos naturais como parasitoides e predadores (BOMMARCO et al., 2011; KHERADMAND et al., 2012) assim como gerar resíduos indesejáveis em alimentos, danos diretos aos aplicadores dos produtos e problemas como contaminação ambiental (HOFFMANN-CAMPO et al., 2005), além de aumentar os custos de produção. Desta maneira, a busca por técnicas alternativas

e/ou sinérgicas de controle tem se intensificado, visando reduzir os gastos e os problemas causados pela utilização abusiva destes produtos.

A resistência de plantas (constitutiva ou induzida) tem sido empregada auxiliando nos sistemas de produção, uma vez que esta tática pode ser explorada de forma eficiente pelo agricultor, já que não exige nenhum conhecimento tecnológico sofisticado para sua adoção. Na soja um grupo de substâncias conhecidas como isoflavonoides tem sido descrito como umas das vias de defesa da planta contra ataque de insetos e doenças (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; ABBASI et al., 2001; PIUBELLI et al., 2003). A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (BONALDO et al. 2005), o que origina um menor custo metabólico para as plantas.

Os jasmonatos (ácido jasmônico, e seus derivados metil jasmonato e *cis*-Jasmone) consistem em um grupo de fitormônios identificados nas plantas em muitas respostas a estresses bióticos e abióticos que atuam localmente ou como moléculas sinalizadoras (TURNER et al., 2002). A participação dos mesmos na defesa das plantas foram propostas pela observação de lesões causadas por insetos herbívoros e a formação de jasmonatos, e pela indução de genes de inibidores de proteinases capazes de deter a alimentação do inseto (FARMER & RYAN, 1992). O *cis*-Jasmone é um composto volátil das plantas formado provavelmente pela β -oxidação do ácido jasmônico e induzido por insetos durante a herbivoria. Nas plantas, sua ativação causa a indução da produção de compostos voláteis que afetam positivamente as defesas da planta por estimular a atividade de parasitoides e predadores de insetos-praga (BIRKETT et al., 2000; BRUCE et al., 2008). No caso da soja a aplicação do *cis*-Jasmone foi descrito por induzir a produção de compostos voláteis orgânicos que atuam na atração de parasitoides de ovos de percevejos (MORAES et al., 2009).

Devido a implicações quanto à capacidade de indução de resistência das plantas o estudo do efeito direto do *cis*-Jasmone sobre a planta pode indicar a capacidade da planta em alterar seu metabolismo, desencadeando a produção de compostos de defesa (GEYTER et al., 2012). O estudo das interações entre fitormônios, planta e insetos podem auxiliar os melhoristas a inserir em novas cultivares, entre outras

características desejáveis, a resistência constitutiva e/ou induzida contra insetos-praga. A incorporação ou aumento das concentrações desses compostos em cultivares permitirá avanços importantes, pois a metabolômica (ALIFERIS & TOKOUSBALIDES, 2011) integra de maneira eficaz e rápida as características genotípicas e fenotípicas das plantas, culminando assim com a redução dos custos para o agronegócio.

1.1.1. Metabolismo secundário

Em condições naturais, as plantas estão expostas a inúmeros inimigos que podem afetar seu desenvolvimento. As plantas produzem uma série de compostos orgânicos sem aparente função no crescimento e desenvolvimento, e a estas substâncias são denominadas de metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais. No reino vegetal todas as plantas compartilham o mesmo tipo de metabolismo primário, no entanto o metabolismo secundário tem sua distribuição restrita a algumas plantas, sendo alguns metabólitos secundários encontrados apenas em algumas ou em uma única espécie vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2010).

O metabólito secundário é dividido em três grupos quimicamente distintos: terpenos, componentes contendo nitrogênio e compostos fenólicos (VIZZOTTO et al., 2010). Atualmente são conhecidos aproximadamente 35.000 compostos do grupo dos terpenos (MCMURRY, 2009 citado por PAVARINI et al., 2012) formados por unidade de carbono (C₅), sintetizados a partir da via do ácido mevalônico e via do *metileritritol fosfato (MEP)*, estas substâncias apresentam-se de forma tóxica e/ou deterrente a alimentação de muitos insetos herbívoros e mamíferos, (BRUNO et al., 1999; BOHNENSTENGEL et al., 1999; JÚNIOR, 2003; VEITCH et al., 2008). Os componentes contendo nitrogênio são sintetizados pela via comum dos aminoácidos e destes destacam-se os glicosídeos cianogênicos, glucosinalatos, aminoácidos não proteicos e os alcaloides, sendo este último o maior grupo com um total de 15.000 metabólitos (TAIZ & ZEIGER, 2010; DEVIKA & KOILPILLAI, 2012). Os compostos fenólicos apresentam uma hidroxila ligada a um anel aromático em sua composição química, e

são sintetizados a partir da via do ácido chiquímico, com a maioria das classes de compostos formados a partir da fenilalanina na rota dos fenilpropanoides (Figura 1), que após a remoção da molécula de amônia da origem ao ácido cinâmico. Cerca de 10.000 compostos fenólicos são conhecidos e muitos são relacionados com a defesa contra herbívoros e patógenos (ARTLIP & WISNIEWSKI, 2002; TAIZ & ZEIGER, 2010).

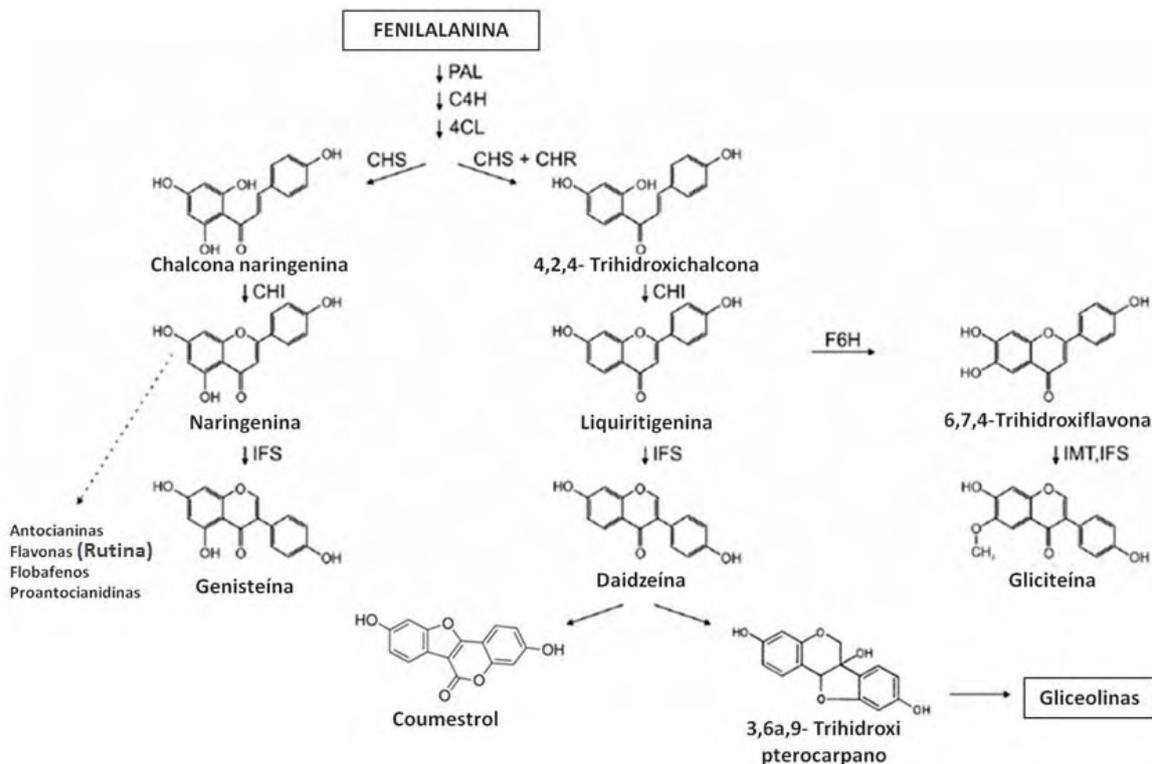


Figura 1. Diagrama parcial da via dos fenilpropanoides em soja. Fenilalanina amônia-liase, chalcona sintase e isoflavona sintase são as principais enzimas da via para formação dos isoflavonoides. A daidzeína atua com precursora das fitoalexinas coumestrol e gliceolinas, e a naringenina é a precursora para a formação da rutina (modificado de DHAUBHADEL et al., 2003).

Os isoflavonoides são compostos fenólicos, pertencentes a uma classe distinta de flavonoides distribuídos predominantemente em espécies de plantas pertencentes à família Leguminosae. Apresentam importantes propriedades biológicas, tais como:

atividades estrogênicas, antifúngicas e bactericidas das fitoalexinas (WILLIAMS & HARBORNE, 1989), além de desempenhar diversas funções na interação entre as plantas e ambiente, onde atuam como indutores de genes de nodulação durante simbiose entre leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium* (FERGUSON & MATHESIUS, 2003) e atuam como moléculas precursoras para a produção de fitoalexinas durante as interações planta-patógeno ou planta-inseto (AOKI et al., 2000; DIXON & FERREIRA, 2002).

Na soja são encontrados diferentes tipos de isoflavonoides que podem variar de acordo com o tecido como: folhas, raízes, vagem e sementes. De modo geral, nove são as formas mais comuns encontradas em plantas de soja, entre elas as formas 7-O-glicosídeos (daidzina, glicitina e genistina), as malonís glicosídicas (6"-O-malonildaidzina, 6"-O-malonilglicitina e 6"-O-malonilgenistina) e as formas agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína). O efeito destes compostos fenólicos depende de sua concentração, que podem ser atraentes, deterrentes, repelentes, ou tóxicos às pragas que atacam a cultura da soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001).

Além das isoflavonas descritas acima, outro composto identificado em folhas de plantas de soja, a rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo), tem sido descrito devido seus efeitos antibiótico e/ou antinutricional em inseto sugador (PIUBELLI et al., 2003) e insetos mastigadores (SIMMONDS, 2001; HOFFMANN-CAMPO et al., 2001, PIUBELLI et al., 2005; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* alimentada com dieta contendo rutina isolada ou associada à caseína indicou efeito negativo no desenvolvimento larval, na quantidade de alimento consumido e no peso de pupas (SALVADOR et al., 2010). Em insetos como *Spodoptera litura* e *Helicoverpa armigera* o efeito da rutina na dieta ou de extratos indicaram uma redução do crescimento e aumento da mortalidade das lagartas, fato este que evidencia sua eficácia na formulação de biopesticidas contra insetos-praga (PANDEY et al., 2012). Ainda essas mesmas pragas alimentadas com plantas de *Nicotiana tabacum* expressando o fator de transcrição AtMYB75/PAP1 apresentaram aumento da concentração de compostos como antocianinas, ácidos fenólicos e rutina, que atrasaram o estágio de pupa e aumentaram a mortalidade das larvas (MALONE et

al., 2009). Em dieta artificial contendo concentrações de rutina semelhantes ao de plantas de *Manihot esculenta*, indicaram que o inseto *Phenacoccus manihoti* apresentou uma redução no ganho de peso e aumento no tempo de desenvolvimento (CALATAYUD, 2000).

As agliconas são as formas mais bioativas entre os isoflavonoides (KUDOU et al., 1991; DHAUBHADEL, 2011), e no caso da daidzeína esta é descrita como precursora na produção de fitoalexinas como as gliceolinas (EBEL, 1986) e coumestrol (DEWICK et al., 1970). Na soja, além de atuar na produção de fitoalexinas, a daidzeína têm sido relacionada como importante componente de defesa das plantas a insetos, afetando negativamente a biologia dos herbívoros, principalmente por inibir o crescimento de larvas (ZHOU et al., 2011). Ainda em plantas de soja, o isoflavonoide daidzeína e as fitoalexinas gliceolinas e coumestrol foram relacionadas por apresentarem efeitos negativos como antibiótico e/ou antialimentar em larvas de *Trichoplusia ni* (SHARMA & NORRIS, 1991), e no caso do coumestrol quando testado em dieta artificial, este apresentou em redução no ganho de peso de lagartas de *Pseudoplusia includens* (ROSE et al., 1988).

Desta maneira, o estudo de vias metabólicas das plantas, as interconexões entre estas rotas (ERB et al., 2012) no contexto dos sistemas biológicos poderão auxiliar na incorporação ou aumento da concentração destas substâncias em novas cultivares através do melhoramento genético pela produção de plantas capazes de responder aos estresses ocasionados por pragas (GATEHOUSE, 2008; LUCAS, 2011; NADELLA et al., 2012; GROßKINSKY et al., 2012).

1.1.2. Jasmonatos

A maior via de sinalização envolvida na defesa de plantas contra insetos herbívoros é a via do octadecanoicos que desencadeia a produção do ácido jasmônico ou mais conhecidos como jasmonatos e seus derivados metil jasmonato e *cis*-Jasmone (Figura 2). Estes são uma classe de hormônio vegetal, que regulam aspectos do

desenvolvimento e crescimento das plantas, incluindo a germinação das sementes, o amadurecimento dos frutos, a produção de pólen viável, o crescimento radicular, abscisão e senescência, e também estão envolvidos na resposta das plantas a lesões, luz ultravioleta, a deficiência hídrica, ozônio, infecção de patógeno e ataque de insetos (CONCONI et al., 1996; CREELMAN et al., 1997; RAO et al., 2000; LI et al., 2004; WASTERACK, 2007; THALER et al., 2012).

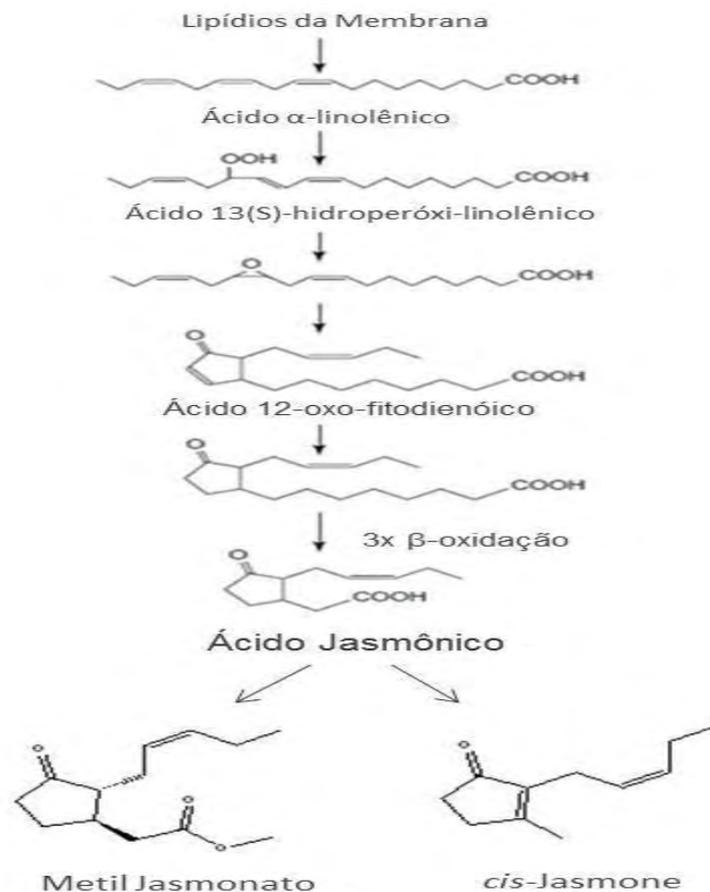


Figura 2. Passos da via da biossíntese do ácido jasmônico e derivados metil jasmonato e *cis*-Jasmone. No cloroplasto a fosfolipaseA1 converte os lipídios da membrana em ácido α-linolênico. O ácido α-linolênico é convertido em ácido 12-oxo-fitodienóico pela ação de enzimas (lipoxigenase, aleno óxido sintase e aleno óxido ciclase). O ácido 12-oxo-fitodienóico é transportado para o peroxissomo, onde é reduzido e convertido em ácido jasmônico. A conversão do ácido jasmônico em metil Jasmonato ocorre por meio da enzima

jasmonatocarboxilmetiltransferase, enquanto o *cis*-Jasmone é formado por β -oxidação do ácido jasmônico (Modificado de CHEONG & CHOI, 2003).

Os Jasmonatos estão intimamente relacionados na regulação da rede de comunicação da biossíntese de metabólitos secundários nas plantas (TAIZ & ZEIGER, 2010), e desencadeiam a transcrição de genes e fatores de transcrição (GEYTER et al., 2012), como os da fenilalanina amônia liase (EC 4.3.1.5, PAL), enzima conhecida por ativar mecanismos químicos de defesa das plantas (Figura 1), demonstrando o papel do ácido jasmônico e seus derivados na cascata celular e no acúmulo de compostos secundários ao ataque de herbívoros (FONSECA et al., 2009; ZHOU et al., 2010; AVANCI et al., 2010). A participação dos jasmonatos na indução dos metabólitos secundários inclui a síntese de moléculas pertencentes a diferentes classes de compostos como os terpenoides, alcaloides e fenilpropanoides (ZHAO, et al., 2005; PAUWELS et al., 2009; HOWE, 2010), além de atuarem diretamente no metabolismo das plantas, também participam indiretamente na interação tritrófica, pela atração de inimigos naturais como predadores e parasitoides de ovos de insetos-praga (AGRAWAL, 2000; 2005; KOST & HEIL, 2006; HEIL, 2008).

O *cis*-Jasmone é um dos jasmonatos formado a partir de três ciclos de β -oxidação e descarboxilação do ácido jasmônico, e conhecido por ser altamente volátil quando comparado com o ácido jasmônico e metil jasmonato, sendo empregado na indústria de perfumes e isolado primeiramente de flores de *Jasminun rincospernum* (KOCH et al., 1997; HORBOWICZ et al., 2009). *cis*-Jasmone é uma molécula sinalizadora importante que é liberado a partir de flores para atrair polinizadores, e também emitida por tecidos danificados por herbívoros para atrair inimigos naturais, além de atuar como um sinalizador da expressão de genes nas plantas (DABROWSKA & BOLAND, 2007; BRUCE et al., 2008). O *cis*-Jasmone também foi relatado como indutor de metabólitos secundários responsáveis pela defesa da planta contra pragas e doenças (BRUCE et al., 2003; MORAES et al., 2008). Sua participação na indução de resistência indireta revela que um grupo distinto de genes, diferentes daqueles induzidos por metil jasmonato, foram induzidos apenas pelo *cis*-Jasmone, o que também foi demonstrado pela atração de parasitoides de afídeos *Aphidius ervi*

(MATTHES et al., 2010). Na soja o *cis*-Jasmone induz a produção de compostos voláteis semelhantes aos induzidos pelos danos causados por percevejos com efeito atrativo aos parasitoides de ovos de percevejos *Telenomus podisi* (MORAES et al., 2009).

A descoberta e o estudo das vias de resposta das plantas aos diferentes tipos de estresses bióticos vêm inspirando cientistas a investigar os mecanismos moleculares e as respectivas consequências ecológicas diretas e indiretas sobre os herbívoros. O uso de fitormônios como os jasmonatos, em específico o *cis*-Jasmone tem evidenciado sua habilidade em induzir a produção de metabólitos de defesa da planta contra herbívoros e atrativos de inimigos naturais (BIRKETT et al., 2000; BRUCE et al., 2003; PICKETT et al., 2007; MORAES et al., 2008; MORAES et al., 2009; DEWHIRST & PICKETT, 2010; HEGDE et al., 2012). Desta forma, se vislumbra a utilização da indução da resistência natural da planta pela ativação de compostos secundários de defesa que afetem o comportamento e desenvolvimento dos insetos herbívoros e que esses fitormônios possam beneficiar a produção das culturas como um método auxiliar/sinérgico no manejo integrado de pragas.

1.2. OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do *cis*-Jasmone na indução de compostos secundários em plantas de soja e seu efeito na biologia do percevejo-marrom *Euschistus heros* e da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis*.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do *cis*-Jasmone na indução de compostos secundários de genótipos de soja e seu efeito no ganho de peso de *E. heros*.
- Determinar o conteúdo de metabólitos secundários induzidos em vagem e grão de genótipos de soja após a aplicação do *cis*-Jasmone.
- Avaliar a indução da resistência de plantas de soja pela aplicação foliar do Tween 20 e *cis*-Jasmone, e seu efeito na biologia de *A. gemmatalis*.
- Determinar o conteúdo de metabólitos secundários induzidos em folhas de plantas de soja pelo Tween 20 e *cis*-Jasmone.

1.3. REFERÊNCIAS

- ABBASI, P. A.; GRAHAM, T. L. Age-related regulation of induced isoflavonoid responses in soybean lines differing in inherent elicitation competency. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 3, p. 143-152, 2001.
- AGRAWAL, A. A. Future directions in the study of induced plant responses to herbivory. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 115, p. 97-105, 2005.
- AGRAWAL, A. A. Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 4, p. 329-335, 2000.
- ALIFERIS, K. A.; TOKOUSBALIDES, M. C. Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives. **Metabolomics**, Ardmore, v. 7, p. 35-53, 2011.
- AOKI, T.; AKASHI, T.; AYABE, S. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 113, p. 475-488, 2000.
- ARTLIP, T. S.; WISNIEWSKI, M. E. Induction of proteins in response to biotic and abiotic stresses. In: PESSARAKLI, M. (Ed.) **Handbook of plant and crop physiology**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 657-679.
- AVANCI, N.C.; LUCHE, D.D.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 484–505, 2010.
- BIRKETT, M. A.; CAMPBELL, C. A. M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A. J.; MARTIN, J. L.; MATTHES, M.; NAPIER, J. A.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J. A.; POPPY G. M.; POW, E. M.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS G. H.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. New roles for *cis*-Jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 16, p. 9329-9334, 2000.
- BOHNENSTENGEL, F. I.; WRAY, V.; WITTE, L.; SRIVASTAVA, R. P.; PROKSCH, P. Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, New York, v. 50, p. 977-982, 1999.

- BOMMARCO, R.; MIRANDA, F.; BYLUND, H.; BJÖRKMAN, C. Insecticides suppress natural enemies and increase pest damage in cabbage. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 104, n. 3, p. 782-791, 2011.
- BONALDO, S.M., PASCHOLATI, S.F., ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTE, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.
- BRUCE, T. J. A.; MARTIN, J. L.; PICKETT, J. A.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS, L. J. *cis*-Jasmone treatment induces resistance in wheat plants against the grain aphid, *Sitobion avenae* (Fabricius) (Homoptera: Aphididae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, n. 9, p.1031-1036, 2003.
- BRUCE, T. J. A.; MATTHES, M. C.; CHAMBERLAIN, K.; WOODCOCK, C. M.; MOHIB, A.; WEBSTER, B.; SMART, E. L.; BIRKETT, J. A.; NAPIER, J. A. *cis*-Jasmone induces Arabidopsis genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 12, p. 4553-4558, 2008.
- BRUNO, M.; VASSALLO, N.; SIMMONDS, M. S. J. A diterpenoid with antifeedant activity from *Scutellaria rubicunda*. **Phytochemistry**, New York, v. 50, p. 973-976, 1999.
- CALATAYUD, P. A. Influence of linamarin and rutin on biological performances of *Phenacoccus manihoti* in artificial diets. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 96, p. 81-86, 2000.
- CHEONG, J. J.; CHOI, Y. D. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 19, n. 7, p. 409-413, 2003.
- CONCONI, A.; SMERDON, M. J.; HOWE, G. A.; RYAN, C. A. The octadecanoid signaling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. **Nature**, London, v. 383, p. 826-829, 1996.
- CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1211-1223, 1997.

- DABROWSKA, P.; BOLAND, W. *iso*-OPDA: an early precursor of *cis*-jasmonate in plants? **ChemBioChem**, Weinheim, v. 8, n. 18, p. 2281-2285, 2007.
- DEVIKA, R.; KOILPILLAI, J. An overview on plant secondary metabolites : Its medicinal importance. **Journal of Pharmacy Research**, Mohali, v. 5, n. 2, p. 984-986, 2012.
- DEWHIRST, S. Y.; PICKETT, J. A. Production of semiochemical and allelopathic agents as a consequence of aphid feeding. **Chemoecology**, Basel, v. 20, n. 2, p. 89-96, 2010.
- DEWICK, P. M.; BARZ, W.; GRISBACH, H. Biosynthesis of coumestrol in *Phaseolus aureus*. **Phytochemistry**, New York, v. 9, p. 775-783, 1970.
- DHAUBHADEL, S. Regulation of Isoflavonoid Biosynthesis in Soybean Seeds. In: Tzi-Bun Ng (Ed.), **Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology**. 2011. p. 243-258. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/soybean-biochemistry-chemistry-and-physiology/regulation-of-isoflavonoid-biosynthesis-in-soybean-seeds>>. Acesso em: 28 de ago. 2012.
- DHAUBHADEL, S.; MCGARVEY, B.D.; WILLIAMS, R. & GIJZEN, M. Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.53, n.6, p.733-743, 2003.
- DIXON, R.A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, New York, v. 60, n. 3, p. 205-211, 2002.
- EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 235-264, 1986.
- ERB, M.; MELDAU, S.; HOWE, G. A. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 250-259, 2012.
- FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 129-134, 1992.
- FERGUSON, J.A.; MATHESIUS, U. Signaling interactions during nodule development. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 22, n. 1, p. 47-72, 2003.

- FONSECA, S., CHICO, J.M., SOLANO, R. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, n. 5, p. 539–547, 2009.
- GATEHOUSE, J. A. Biotechnological Prospects for Engineering Insect-Resistant Plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, p. 881–887, 2008.
- GEYTER, N. DE; GHOLAMI, A.; GOORMACHTIG, S.; GOOSSENS, A. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 349-359, 2012.
- GROßKINSKY, D. K.; GRAAFF, E. VAN DER; ROITSCH, T. Phytoalexin transgenics in crop protection Fairy tale with a happy end? **Plant Science**, Limerick, v. 195, p. 54–70, 2012.
- HEGDE, M.; OLIVEIRA, J. N.; COSTA, J. G.; LOZA-REYES, E.; BLEICHER, E.; SANTANA, A. E. G.; CAULFIELD, J. C.; MAYON, P.; DEWHIRST, S. P.; BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A. Aphid antixenosis in cotton is activated by the natural plant defence elicitor *cis*-Jasmone. **Phytochemistry**, New York, v. 78, p. 81-88, 2012.
- HEIL, M. Indirect defence via tritrophic Interactions. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, p. 41-61, 2008.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; HARBORNE, J. B.; MCCAFFERY, A. R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 98, n. 2, p. 181-194, 2001.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. de. **Trabalhador no cultivo de grãos e oleaginosas: soja - MIP**. Curitiba: SENAR-PR, 82 p, 2005.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; RAMOS NETO, J. A.; OLIVEIRA, M. C. N. DE.; OLIVEIRA, L. J. Detrimental effect of rutin on a main soybean defoliator pest, *Anticarsia gemmatilis*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 10, p. 1453-1459, 2006.

- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERRERIA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Embrapa Soja, Circular Técnica 30, 70 pp, 2000.
- HORBOWICZ, M.; MIODUSZEWSKA, H.; KOCZKODAJ, D.; SANIEWSKI, M. The effect of *cis*-jasnone, jasmonic acid and methyl jasmonate on accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warszawa, v. 78, n. 4, p. 271-277, 2009.
- HOWE, G. A. The roles of hormones in defense against insects and disease. In: DAVIES, P. J. (Ed.), **Plant hormones – Biosynthesis, Signal Transduction, Action!** 3ª edição, New York: Dordrecht Heidelberg, 2010. p. 646-680.
- JÚNIOR, C. V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, 390-400, 2003.
- KHERADMAND, K.; KHOSRAVIAN, M.; SHAHROKHI, S. Side effect of four insecticides on demographic statistics of aphid parasitoid, *Diaeretiella rapae* (McIntosh) (Hym., Braconidae). **Annals of Biological Research**, Coden, v. 3, n. 7, p. 3340-3345, 2012.
- KOCH, T.; BANDEMER, K.; BOLAND, W. Biosynthesis of *cis*-Jasmone: a Pathway for the Inactivation and the Disposal of the Plant Stress Hormone Jasmonic Acid to the Gas Phase? **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 80, p. 838-850, 1997.
- KOST, C.; HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. **The Journal of Ecology**, Oxford, v. 94, n. 3, p. 619-628, 2006.
- KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELT, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.
- LI, L.; ZHAO, Y.; MCCAIG, B. C.; WINGERD, B. A.; WANG, J.; WHALON, M. E.; PICHERSKY, E.; HOWE, G. A. The Tomato Homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 126-143, 2004.

- LUCAS, J. A. Advances in plant disease and pest management. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 149, p. 91-114, 2011.
- MALONE, L. A.; BARRACLOUGH, E. I.; LIN-WANG, K.; STEVENSON, D. E.; ALLAN, A. C. Effects of red-leaved transgenic tobacco expressing a MYB transcription factor on two herbivorous insects, *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 133, p. 117–127, 2009.
- MATTHES, M. C.; BRUCE, T. J. A.; TON, J.; VERRIER, P. J.; PICKETT, J. A.; NAPIER, J. A. The transcriptome of *cis*-jasmonate-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence. **Planta**, Berlin, v. 232, n. 5, p. 1163-1180, 2010.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 24 ago. 2012.
- MORAES, M. C. B.; BIRKETT, M. A.; GORDON-WEEKS, R.; SMART, L. E.; MARTIN, J. L.; PYE, B. J.; BROMILOW, R.; PICKETT, J. A. *cis*-Jasmonate induces accumulation of defence compounds in wheat, *Triticum aestivum*. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 1, p. 9-17, 2008.
- MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PAREJA, M.; SERENO, F. T. P. S.; MICHEREFF, M. F. F.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-Jasmonate. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 131, n. 2, p. 178-188, 2009.
- NADELLA, K. D.; MARLA, S. S.; KUMAR, P. A. Metabolomics in Agriculture. **Journal of Integrative Biology**, Larchmont, v. 16, n. 4, p. 49-59, 2012.
- PANDEY, A.; MISRA, P.; CHANDRASHEKAR, K.; TRIVEDI, P. K. Development of AtMYB12-expressing transgenic tobacco callus culture for production of rutin with biopesticidal potential. **Plant Cell Reports**, Berlin. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/v0884125q2012622/>>. Acesso em: 20 ago. de 2012.
- PAUWELS, L.; INZÉ, D.; GOOSSENS, A. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? **Trends Plant Science**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 87–91, 2009.

- PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUESA, M.; LOPESA, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 176, p. 5-16, 2012.
- PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; MORAES, M. C. B.; BRUCE, T. J. A.; CHAMBERLAIN, K.; GORDON-WEEKS, R.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; SMART, L. E.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. *cis*-Jasmone as allelopathic agent in inducing plant defence. **Allelopathy Journal**, Hisar, v. 19, n. 1, p. 109-118, 2007.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; FRANCHINI, J. C.; LARA, F. M. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its affect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, n. 5, p. 1223-1233, 2003.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. de. Are chemical compounds importante for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 7, p. 1509-1525, 2005.
- RAO, M. V.; LEE, H.; CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E.; DAVIS, K. R. Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 1633-1646, 2000.
- ROSE, R. L.; SPARKS, T. C.; SMITH, M. C. Insecticide Toxicity to the Soybean Looper and the Velvetbean Caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) as Influenced by Feeding on Resistant Soybean (PI 227687) Leaves and Coumestrol. **Journal of Economy Entomology**, Lanham, v. 81, n. 5, p. 1288-1294, 1988.
- SALVADOR, M. C.; BOIÇA JR, A. L.; OLIVEIRA, M. C. N. de; GRAÇA, J. P.; SILVA, D. M.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)? **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 5, p. 774-783, 2010.
- SHARMA, H. C.; NORRIS, D. M. Chemical basis of resistance in soya bean to cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 55, n. 3, p. 353-364, 1991.

- SIMMONDS, M. S. J. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. **Phytochemistry**, New York, v. 56, n. 3, p. 245-252, 2001.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, 5ª edição. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2010. 782 p.
- THALER, J. S.; HUMPHREY, P. T.; WHITEMAN, N. K. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 260-270, 2012.
- TURNER, J. G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. suppl 1, p. S153-S164, 2002.
- VEITCH, G. E.; BOYER, A.; LEY, S. V. The Azadirachtin Story. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 47, n. 49, p. 9402-9429, 2008.
- VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316). 16 p. 2010.
- WASTERNAK, C. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. **Annals of Botany**, London, v. 100, p. 681-697, 2007.
- WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B. Isoflavonoids. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry**; London: Academic Press, 1989; p 421-449.
- ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, New York, v. 23, n. 4, p. 283–333, 2005.
- ZHOU, M. L.; ZHU, X. M.; SHAO, J. R.; WU, Y. M.; TANG, Y. X. Transcriptional response of the catharanthine biosynthesis pathway to methyl jasmonate/nitric oxide elicitation in *Catharanthus roseus* hairy root culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 88, p. 737-750, 2010.
- ZHOU, Y. Y.; LUO, S. H.; YI, T. S.; LI, C. H.; LUO, Q.; HUA, J.; LIU, Y.; LI, S. H. Secondary Metabolites from glycine soja and their growth inhibitory effect against *Spodoptera litura*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 11, p. 6004–6010, 2011.

CAPÍTULO 2 - Aplicação exógena de *cis*-Jasmone em plantas de soja afeta o peso do percevejo *Euschistus heros* por desencadear a produção de isoflavonoides em vagens e grãos.

RESUMO - *cis*-Jasmone é um fitormônio conhecido pela indução de metabólitos secundários e por afetar a biologia de insetos. No presente trabalho foi avaliada a aplicação exógena dos *cis*-Jasmone em plantas de soja e seu efeito no ganho de peso do percevejo *Euschistus heros* e sua capacidade de induzir a produção de isoflavonoides nas vagens e grãos de três cultivares de soja BRS 134 (suscetível), IAC 100 e Dowling (resistentes). Gaiolas com o percevejo *E. heros* foram utilizadas para testar o ganho de peso. Essas gaiolas continham vagens dos genótipos com três diferentes tratamentos (Água; Tween 20; e *cis*-Jasmone). Na cultivar Dowling foi observada a redução do peso do inseto nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone (2,17 mg), em relação às plantas tratadas tanto com Água como Tween 20 (11,84 mg e 12,93 mg) respectivamente. Pelas comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) nas vagens tratadas com *cis*-Jasmone observou-se o aumento na concentração das isoflavonas glicosídicas (daidzina e genistina), assim como as malonís (daidzina e genistina) e também das agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína) nas cultivares BRS 134 e Dowling. No entanto, na cultivar IAC 100 o *cis*-Jasmone reduziu a concentração das malonís. No grão, o *cis*-Jasmone aumentou a concentração de daidzeína nas cultivares BRS 134 e IAC 100 e da malonil genistina na Dowling. Os resultados obtidos sugerem a influência negativa no ganho de peso do inseto e aumento dos isoflavonoides, o que permite inferir que o *cis*-Jasmone tem papel importante na indução de compostos secundários que podem afetar o desenvolvimento de insetos-praga da cultura da soja.

Palavras-chave: Fabaceae, *Glycine max*, HPLC, jasmonatos, percevejo-marrom, resistência a insetos

2.1. INTRODUÇÃO

Os jasmonatos (ácido jasmônico e seus derivados metil jasmonato e *cis*-Jasmone) têm sido descritos quanto sua função na indução de barreiras químicas que atuam negativamente no desenvolvimento de insetos herbívoros (TURNER et al., 2002; KOO & HOWE, 2009; GEYTER et al., 2012). O *cis*-Jasmone é um fitormônio derivado do ácido jasmônico e tem importante função como repelente de afídeos e por atrair predadores e parasitoides (BIRKETT et al., 2000; BRUCE et al., 2003), assim como induzir a síntese de metabólitos secundários que afetam o desenvolvimento de pragas (PICKETT et al., 2007). Esse fitormônio foi identificado como um semioquímico por atuar negativamente em espécies de afídeos e positivamente para insetos antagonistas como parasitoides e predadores (CHAMBERLAIN et al., 2001). Em *Lonicera japonica* resultados indicaram que o *cis*-Jasmone atuou como um cairomônio por mediar à atração de *Thrips obscuratus* (EL-SAYED et al., 2009). Na soja a aplicação exógena do *cis*-Jasmone provocou a produção de compostos voláteis orgânicos que serviram de atração de parasitoides de ovos de percevejo (MORAES et al., 2009).

Metabólitos secundários podem ser ativados pela aplicação exógena de alguns tipos de indutores como os jasmonatos, que tem apresentado eficiência na produção de compostos de defesa (WANG & WU, 2005; MORAES et al., 2008). Esses são hormônios que desencadeiam respostas contra herbívoros, patógenos e outras injúrias ambientais (KOO & HOWE, 2009), e foram definidos como essenciais para a indução nas defesas biológicas de *Arabidopsis thaliana* durante a interação planta-inseto (McCONN et al., 1997).

O controle de doenças e pragas nas culturas geram desafios para pesquisadores e prejuízos aos produtores. Na soja os percevejos como as espécies *Euschistus heros*, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* e *Dichelops melacanthus* consistem em uma das pragas que causam maior dano econômico para a produtividade da lavoura (PANIZZZI & CORRÊA-FERREIRA, 1997). Genótipos ou fontes de variabilidade são pesquisados na busca de características de resistência e estudos são realizados com intuito de

entender como as plantas respondem ao ataque dos herbívoros e como os elicitores podem atuar na indução de resistência (BRUCE et al., 2003; PICKETT et al., 2007; BRUCE et al., 2008; DEWHIRST & PICKETT, 2010; HEGDE et al., 2012).

Nesse sentido, as plantas apresentam um arsenal de defesas em resposta aos herbívoros, e no caso da soja um grupo de substâncias conhecidos como flavonoides têm oferecido informações do efeito destes compostos sobre o comportamento e biologia de insetos-praga (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; PIUBELLI et al., 2003). Estes compostos podem ser constitutivos, no entanto, a maioria é induzida nas plantas durante a infestação por doenças ou no ataque de pragas (DIXON & STEELE, 1999; VOGT, 2000). Entre os isoflavonoides daidzina e genistina tiveram suas concentrações aumentadas (induzidas) em plantas de soja após sofrerem injúrias por percevejo (PIUBELLI et al., 2003), e em outro trabalho, rutina e genistina (constitutivos na planta) afetaram negativamente as lagartas *Trichoplusia ni* e *Anticarsia gemmatalis* (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001, HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do *cis*-Jasmone no ganho de peso do percevejo *E. heros* pela da indução da resistência em genótipos de soja tratados com *cis*-Jasmone e a determinação do conteúdo de metabólitos secundários (isoflavonoides).

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Material Vegetal

As sementes foram obtidas no banco de germoplasma de soja da Embrapa-Soja. Foram utilizadas as cultivares BRS 134 (suscetível), assim como as cultivares resistentes como a IAC 100 que apresenta resistência múltipla tanto para a lagarta (LOURENÇÃO et al., 2000) como para percevejo (PIUBELLI et al., 2003) e a cultivar Dowling que apresenta resistência ao afídeo da soja (LI et al., 2008). Essas foram semeadas em vasos plástico de 5 litros e mantidas em casa-de-vegetação com

fotoperíodo de 14 horas, temperatura de 28 °C e umidade relativa de 65 % até estágio R6 (FEHR et al., 1971). Neste estágio as plantas foram pulverizadas com um dos três diferentes tratamentos como descrito no item 2.2.2.

2.2.2. Tratamento com *cis*-Jasmone

Plantas de soja em estágio R6 foram submetidas à aplicação exógena dos seguintes tratamentos segundo MORAES et al. (2009): (Água) água destilada; (Tween 20) água destilada + tween 20 (0,1%); e (*cis*-Jasmone) água destilada + tween 20 (0,1 %) + *cis*-Jasmone ($1,4 \text{ mmol}^{-1}$). As plantas tratadas com *cis*-Jasmone foram mantidas em outra casa-de-vegetação sob as mesmas condições de temperatura e umidade descritas no item 2.2.1, para evitar a indução nas plantas controle (Água e Tween 20), já que o *cis*-Jasmone é conhecido por ser um fitormônio volátil.

2.2.3. Bioensaio com o percevejo *E. heros*

Plantas dos genótipos foram crescidas e pulverizadas com os mesmos tratamentos como descritos nos itens 2.2.1. e 2.2.2. Após 24 h da pulverização dos tratamentos foram conduzidos bioensaios com o percevejo *E. heros* para avaliar o ganho de peso. Adultos recém emergidos da criação de insetos da Embrapa-Soja foram pesados para a obtenção do peso inicial e individualizados em gaiolas feitas com placas de petri adaptadas contendo um percevejo e uma vagem sem ser removida das plantas (Figura 1), sendo mantidas sob condições de casa-de-vegetação descrita no item 2.2.1. Após 144 horas as placas foram removidas das plantas da casa-de-vegetação e levadas ao laboratório onde foi obtido o peso final do percevejo e subtraído do peso inicial para determinar o ganho de peso do inseto.



Figura 1. Plantas de soja e gaiolas utilizadas para o bioensaio contendo uma vagem e percevejo *Euschistus heros*.

2.2.4. Extração dos isoflavonoides

Após a aplicação dos tratamentos (item 2.2.2.), as vagens foram coletadas em 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas em nitrogênio líquido, e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até a extração e análise dos isoflavonoides.

Para extração e quantificação das isoflavonas, as vagens e grãos foram separados, pesados, macerados e extraídos com metanol 80% (MeOH 80%) e levados ao banho de ultrassom por 20 min. As amostras foram então centrifugadas a 20800 g a 4°C por 12 min e filtradas em membrana Millipore® 0,45 µm e analisadas em HPLC (High Performance Liquid Chromatography) – Shimadzu – modelo Prominence.

2.2.5. Identificação e Quantificação por HPLC

Os extratos metanólicos das amostras foram analisados através de HPLC em coluna C18 de fase reversa (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5 micra). Alíquotas de 20µL foram injetadas automaticamente no equipamento Prominence da Shimadzu, com controlador CBM-20A; detector SPD-20A; desgaseificador DGU 20A5; bomba LC-20AT; amostrador automático SIL-20A e forno CTO 20A (Figura 2). A fase móvel foi composta de dois solventes: (A)-2% de ácido acético (HOAc) e (B): uma mistura de metanol (MeOH), ácido acético e água MilliQ® (H₂O) (MeOH:HOAc:H₂O; 18:1:1). O sistema de gradiente linear utilizado na análise partiu da condição inicial com 75% de A e 25% de B, atingindo após 40 minutos a situação inversa, ou seja, 25% de A e 75% de B, mantida por cinco minutos. Ao atingir 45 minutos voltou à situação inicial permanecendo por 5 minutos antes da injeção seguinte. O fluxo do solvente foi de 1mililitro/minuto e o registro na região do ultravioleta (UV) no comprimento de onda 260 nanômetro (nm). As concentrações das agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína), assim como das formas glicosídica (daidzina, glicitina, genistina) e malonil glicosídica (malonil daidzina, malonil glicitina, malonil genistina), foram identificados por meio da comparação de espectro e tempo de retenção dos padrões com o espectro e tempo de retenção de cada amostra analisada.



Figura 2. Imagem do equipamento do HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizado para identificação e quantificação de compostos secundários de extratos vegetais obtidos de vagem e grão de soja.

2.2.6. Análise Estatística

Para o bioensaio com o percevejo *E. heros* foi usado o delineamento de blocos ao acaso em arranjo fatorial: com três cultivares (BRS 134, IAC 100 e Dowling), três tratamentos (Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone) e 30 repetições dos blocos, com total de 270 plantas. O modelo matemático para esta pesquisa é o que segue:

$$Y_{ijk} = m + \text{Trats}_i + \text{Bloco}_j + \text{Culti var}_k + \text{Trats} * \text{Culti var}_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

com

$$i = 1, \dots, I, j = 1, \dots, J, k = 1, \dots, K.$$

em que,

Y_{ijk} é o efeito da variável resposta

m é o efeito da média geral do experimento;

$Trat_i$ é o efeito do tratamento i ;

$Bloco_j$ é o efeito do bloco j ;

Cultivar k é o efeito das cultivares nas parcelas;

$Trats * Cultivar_{ik}$ é o efeito da interação dos tratamentos i pelas cultivares k ;

ε_{ijk} é o efeito do resíduo aleatório $N \cong (0, \sigma^2)$ associado a cada unidade experimental.

O experimento de quantificação de isoflavonoides foi realizado em blocos ao acaso em arranjo fatorial: com três cultivares (BRS 134, IAC 100 e Dowling), três tratamentos (Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone), seis tempos de coletas (24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas) e cinco repetições dos blocos, totalizando 270 plantas. O modelo matemático para esta pesquisa é o que segue:

$$Y_{ijkl} = m + Trat_i + Bloco_j + Cultivar_k + Tempo_l + Trats * Cultivar_{ik} + Trats * Tempo_{il} + Cultivar * Tempo_{kl} + Trats * Cultivar * Tempo_{ikl} + \varepsilon_{ijkl}$$

$$com i = 1, \dots, I, j = 1, \dots, J, k = 1, \dots, K, l = 1, \dots, L$$

em que,

Y_{ijkl} é o efeito da variável resposta

m é o efeito da média geral do experimento;

$Trat_i$ é o efeito do tratamento i ;

$Bloco_j$ é o efeito do bloco j ;

Cultivar k é o efeito das cultivares nas parcelas;

$Tempo_l$ é o tempo de avaliação e retirada das vagens de soja l ;

$Trats * Cultivar_{ik}$ é o efeito da interação dos tratamentos i pelas cultivares k ;

$Trats * Tempo_{il}$ é o efeito da interação dos tratamentos i pelo tempo l

$Cultivar * Tempo_{kl}$ é o efeito da interação dos cultivares k pelo tempo l

$Trats * Cultivar * Tempo_{ikl}$ é o efeito da interação dos tratamentos i pelas cultivares k e pelo tempo l;

ε_{ijkl} é o efeito do resíduo aleatório $N \cong (0, \sigma^2)$ associado a cada unidade experimental.

Os dados foram submetidos à análise exploratória para verificação da existência de todos os pressupostos exigidos para a análise de variância (ANOVA). Para genistina (potência $p=0,8641$), malonil daidzina e daidzeína ($\sqrt{x+1}$) (vagem) os dados foram transformadas quando algum dos requisitos para o emprego da estatística (normalidade da distribuição dos erros, homogeneidade das variâncias, e aditividade dos efeitos dos fatores de variação) não foram atendidos pelos dados da amostra experimental. Em seguida, realizaram-se as comparações múltiplas das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fatores com valores quantitativos foram submetidos à análise de regressão. Os programas estatísticos utilizados foram os pacotes SAS-Statistical Analysis System, versão 9.2 (2009) e Sanest para DOS (ZONTA et al., 1982). Para o cálculo das esperanças do Quadrado Médio, os efeitos do modelo foram considerados como fixos, com exceção do efeito do bloco, que foi aleatório.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Ganho de peso do inseto

Os resultados obtidos no ganho de peso do percevejo indicaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) assim como entre cultivares e tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Quadro da análise de variância (Graus de liberdade – GL, e valores de quadrado médio (Q.M.)) para o ganho de peso do percevejo *E. heros* alimentados com três cultivares de soja após aplicação dos tratamentos com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone.

Variação	GL	Valor de Q.M.
		Ganho de peso
Bloco	29	144,85 ^{ns}
Genótipo (Gen)	2	283,23 ^{ns}
Tratamento (Trat)	2	437,42*
Gen x Trat	4	373,62*
Resíduo	232	114,17
Total	269	-

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, ^{ns} não significativo $p > 0,05$

Pelo teste de médias, o maior ganho de peso dos percevejos foi observado quando eles se alimentaram das cultivares Dowling e IAC 100 pulverizadas com Água (Figura 3). Nas plantas tratadas com Tween 20 houve um aumento no ganho de peso dos insetos que se alimentaram na cultivar BRS 134 e uma redução dos insetos alimentados na cultivar IAC 100, enquanto os da cultivar Dowling apresentaram o maior ganho de peso. Nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone o peso de *E. heros* não foi diferente independentemente da cultivar que serviu de alimento. Entretanto, quando comparado cada cultivar entre os diferentes tratamentos houve uma redução significativa no ganho de peso do percevejo na cultivar Dowling pulverizada com *cis*-Jasmone quando comparado com as plantas tratadas com Água e Tween 20. Não houve diferença significativa no ganho de peso do percevejo pela aplicação dos diferentes tratamentos para as cultivares BRS 134 e IAC 100.

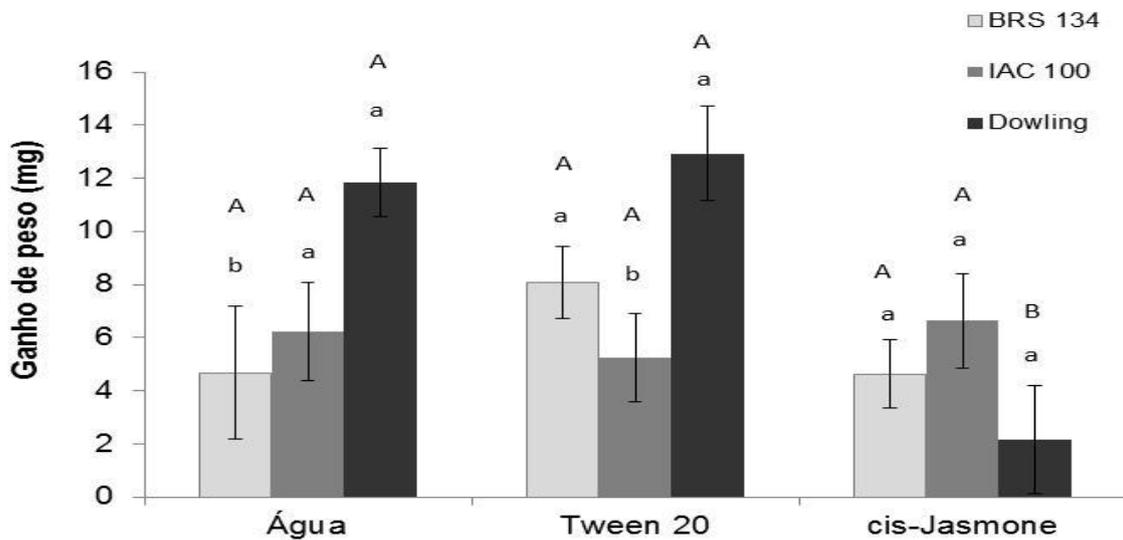


Figura 3. Ganho de peso do percevejo *E. heros* alimentado com três cultivares de soja tratadas com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. Letra minúscula compara as cultivares no tratamento. Letra maiúscula compara a cultivar nos diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.2. Isoflavonoides – Vagem

Os resultados da análise de variância para a concentração de isoflavonoides na vagem (Tabela 2) indicaram efeitos significativos ($p \leq 0,05$) de genótipos (Gen), tratamentos (Trat) e tempo (Temp) tanto na forma isolada como em suas interações para as isoflavonas daidzina, genistina, daidzeína e gliciteína. Para malonil daidzina e malonil genistina não houve significância para o efeito de tratamento ($p > 0,05$). Para a genisteína houve resposta significativa apenas para o fator genótipo e na interação genótipo x tratamento. Embora tenha sido observada interação tripla Genótipo x Tempo x Tratamento nas concentrações de alguns compostos, devido a sua complexidade, essas não serão interpretadas neste estudo.

Tabela 2. Quadro da análise de variância (Graus de liberdade – GL, e valores de quadrado médio (Q.M.)) para concentração de isoflavonoides da vagem de três cultivares de soja após aplicação dos tratamentos Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone.

Variação	GL	Valor de Q.M.						
		Daidzina (ng/mg)	Genistina (ng/mg)	Malonil daidzina (ng/mg)	Malonil genistina (ng/mg)	Daidzeína (ng/mg)	Gliciteína (ng/mg)	Genisteína (ng/mg)
Bloco	4	9,48 ^{ns}	1,54*	1464,42*	20,97 ^{ns}	0,04 ^{ns}	1,80 ^{ns}	0,04 ^{ns}
Genótipo (Gen)	2	48,27**	34,25***	2601,39***	612,35***	25,08***	120,16***	5,95***
Tratamento (Trat)	2	100,59***	15,24***	385,11 ^{ns}	13,29 ^{ns}	0,20***	56,71***	0,10 ^{ns}
Tempo (Temp)	5	44,48***	35,54***	4453,70***	75,79***	0,19***	3,71**	0,03 ^{ns}
Gen x Trat	4	84,69***	10,47***	4529,60***	98,19***	0,20***	63,28***	0,10*
Gen x Temp	10	21,98***	9,26***	1708,47***	37,45**	0,19***	3,89***	0,03 ^{ns}
Trat x Temp	10	14,92*	1,24**	2055,52***	30,16*	0,06**	5,50***	0,03 ^{ns}
GenxTratxTemp	20	12,47*	1,18***	1378,37**	43,34***	0,06***	6,14***	0,03 ^{ns}
Resíduo	212	6,68	0,49	570,51	12,92	0,02	1,07	0,04
Total	269	-	-	-	-	-	-	-

*p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001, ^{ns} não significativo p>0,05

De modo geral, na comparação dos isoflavonoides houve um aumento na concentração de algumas substâncias ou redução de acordo com o genótipo e/ou tratamento. Na comparação dos genótipos tratados com Água, a cultivar IAC 100 e Dowling apresentaram as maiores concentrações de daidzina (Figura 4A) quando comparado com a BRS 134. A aplicação do Tween 20 não indicou diferença entre as cultivares, no entanto, das plantas pulverizadas com *cis*-Jasmone a BRS 134 foi a que apresentou a maior concentração em relação às outras cultivares. Comparando-se cada cultivar nos diferentes tratamentos, a BRS 134 apresentou um aumento na concentração, diferindo dos tratamentos com Água ou com Tween 20. Nos genótipos IAC 100 e Dowling os diferentes tratamentos não apresentaram diferença dentro de cada cultivar.

A concentração de genistina não apresentou diferença significativa nas plantas tratadas com Água (Figura 4B). A cultivar BRS 134 quando tratada com Tween 20 apresentou um aumento da genistina em relação às cultivares IAC 100 e Dowling. Com a aplicação do *cis*-Jasmone a BRS 134 apresentou a maior concentração seguida da cultivar IAC 100 e Dowling. Na comparação da cultivar entre os tratamentos, a concentração de genistina aumentou significativamente nas cultivares BRS 134 tratadas tanto com Tween 20 e *cis*-Jasmone, assim como, a cultivar IAC 100 tratada com *cis*-Jasmone. Na cultivar Dowling não se observou diferenças estatísticas entre os tratamentos.

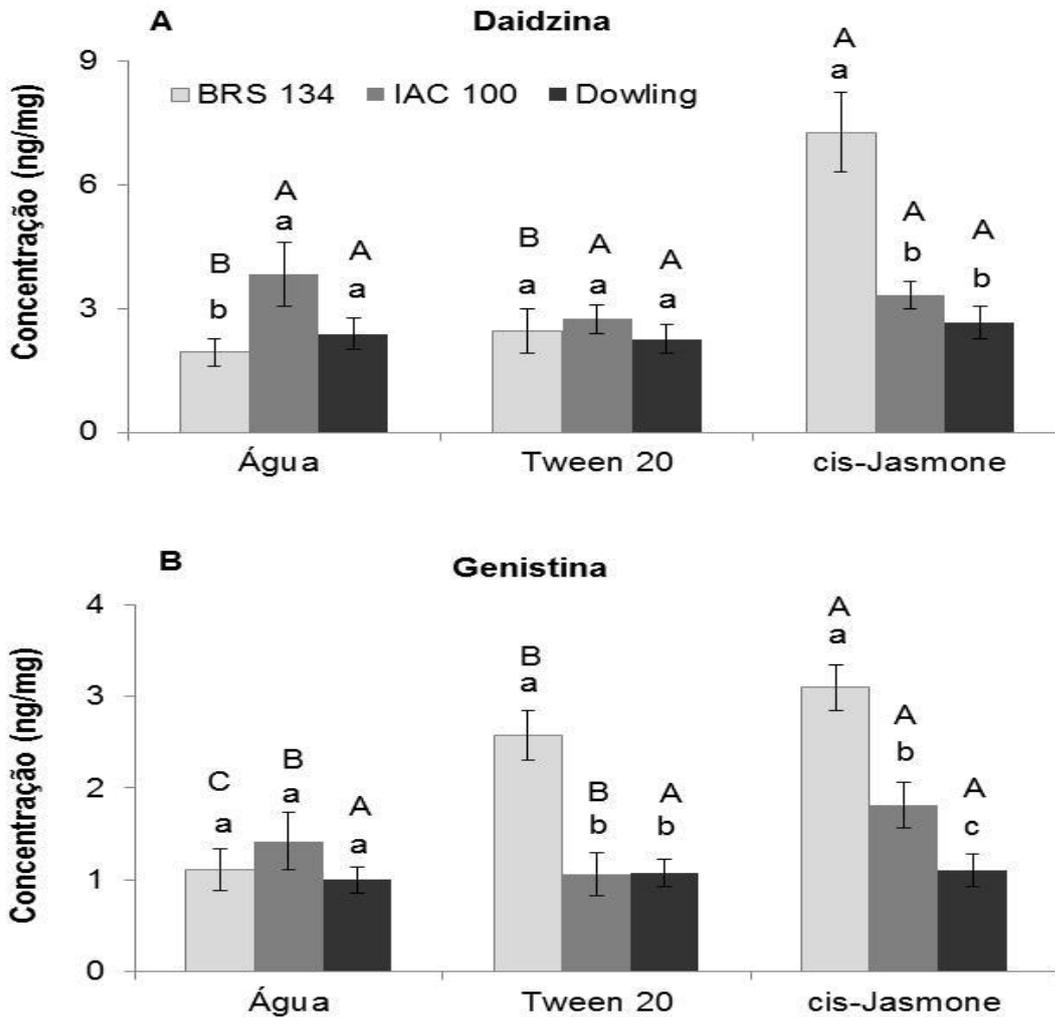


Figura 4. Concentração de daidzina (A) e genistina (B) na vagem de três genótipos de soja (BRS 134, IAC 100 e Dowling) tratados com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. Letra minúscula compara as cultivares no tratamento. Letra maiúscula compara a cultivar nos diferentes tratamentos. Genistina apresenta médias originais e significância do ajuste com transformação potência com $p=0,8641$. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Malonil daidzina foi identificada em todos os tratamentos e não apresentou diferença nas plantas tratadas com Água (Figura 5A). Quando tratadas tanto com Tween 20 e *cis*-Jasmone as cultivares BRS 134 e Dowling indicaram aumento na

concentração quando comparadas a IAC 100. Na BRS 134 houve um aumento da concentração nas plantas tratadas com Água (30,93 ng/mg) e *cis*-Jasmone (56,61 ng/mg). Por outro lado, a cultivar IAC 100 apresentou redução na concentração desse composto nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone (26,64 ng/mg) em relação as plantas tratadas com Água (49,33 ng/mg).

A maior concentração de malonil genistina foi determinada na cultivar Dowling tratada com Água (Figura 5B), enquanto que aquelas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone não diferiram da cultivar BRS 134. Dentro da BRS 134 foi observado um aumento da concentração de malonil genistina quando tratada com Água comparada ao Tween 20 e *cis*-Jasmone. Na cultivar IAC 100 houve uma redução na concentração de malonil genistina nos tratamentos com Tween 20 e *cis*-Jasmone quando comparados com a Água.

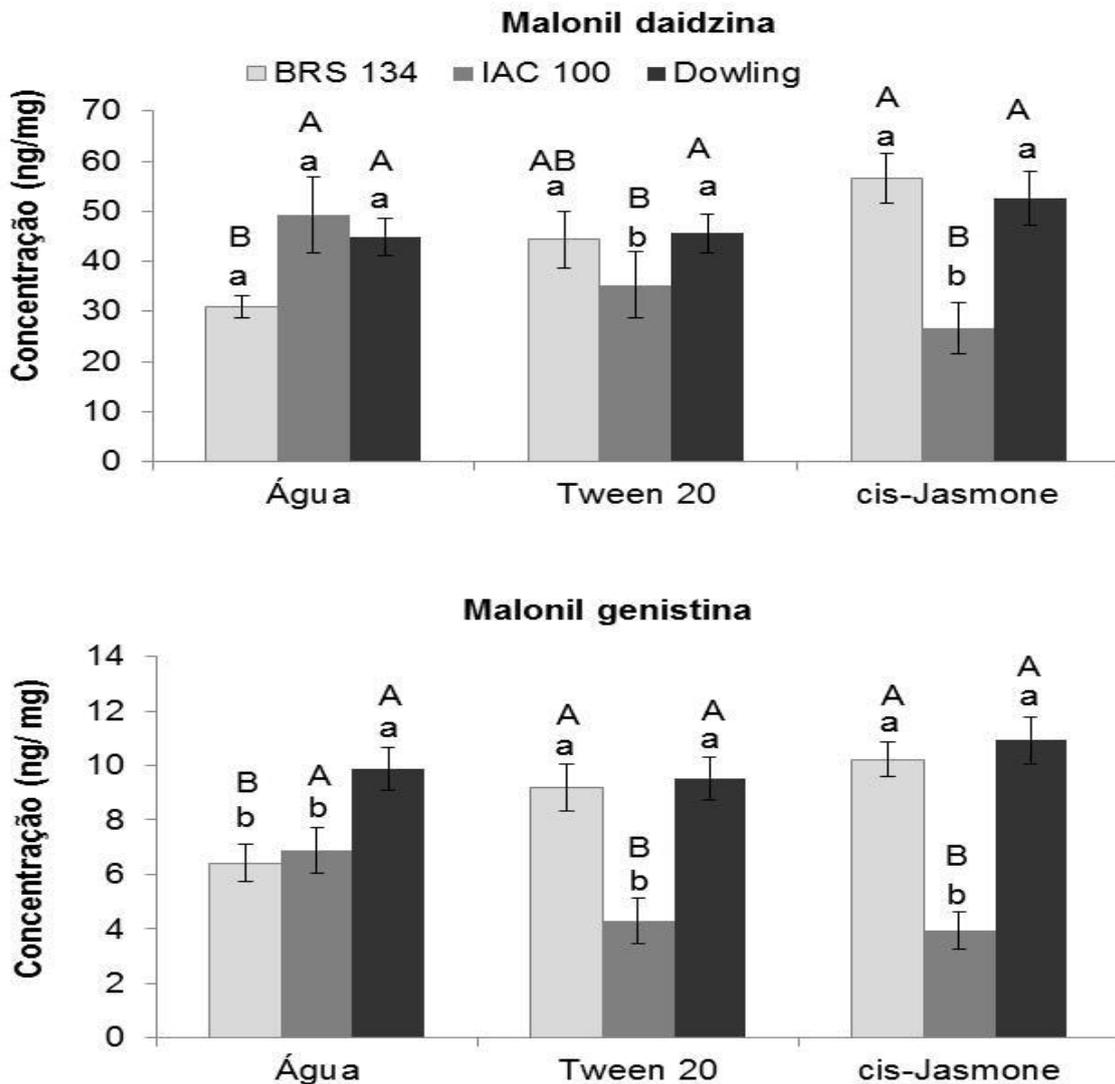


Figura 5. Concentração de malonil daidzina (A) e malonil genistina (B) na vagem de três genótipos de soja (BRS 134, IAC 100 e Dowling) tratadas com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. Letra minúscula compara as cultivares no tratamento. Letra maiúscula compara a cultivar nos diferentes tratamentos. Malonil daidzina apresenta médias originais e significância do ajuste com transformação de $\sqrt{x+1}$. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A concentração das agliconas daidzeína e genisteína (Figura 6A, 6B) aumentou na cultivar Dowling tratadas com *cis*-Jasmone, não sendo detectadas nas cultivares

BRS 134 e IAC 100. A concentração de gliciteína foi diferente nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone (Figura 6C). A cultivar BRS 134 tratada com *cis*-Jasmone apresentou um aumento significativo na produção de gliciteína (5,06 ng/mg) quando comparado com a IAC 100 (0,47 ng/mg). Na cultivar Dowling não foi detectada a produção desta aglicona.

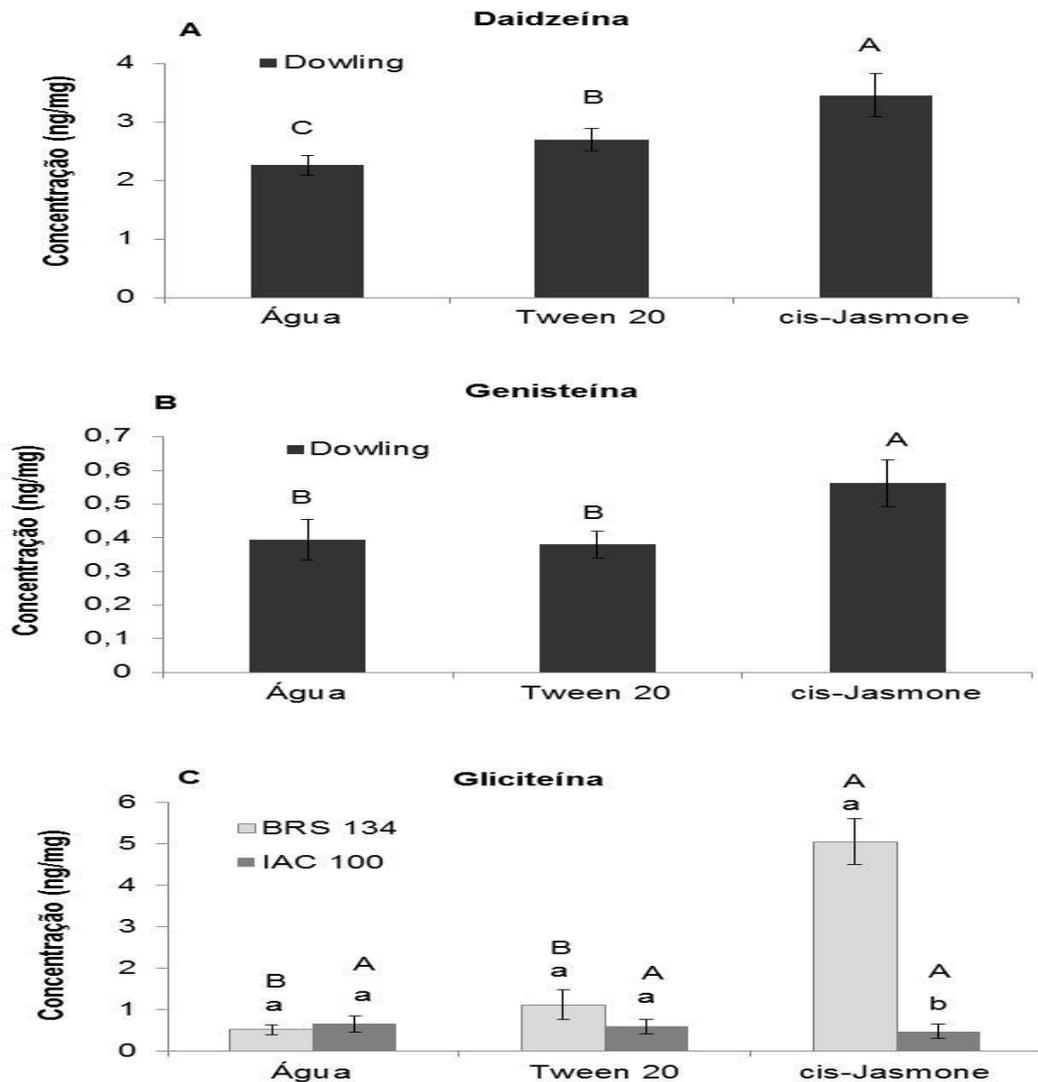


Figura 6. Concentrações de daidzeína (A), genisteína (B) e gliciteína (C) na vagem de três genótipos de soja (BRS 134, IAC 100 e Dowling) tratadas com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. Letra minúscula compara as cultivares no tratamento. Letra maiúscula compara a cultivar nos diferentes tratamentos. Daidzeína apresenta médias originais e significância do ajuste com

transformação de $\sqrt{x+1}$. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Figura 7 são apresentadas as curvas de regressão relacionadas à interação genótipo x tempo. Devido à complexidade para explicar biologicamente a resposta das concentrações das substâncias pelas regressões de grau cúbico foram utilizadas apenas as regressões dos graus lineares e quadráticos quando significativos. Por causa da falta de informação na literatura e por ser inédito os dados obtidos em relação à produção de compostos secundários de plantas de soja após a aplicação do *cis*-Jasmone foram apresentadas as regressões com R^2 mesmo com valores inferiores a $R^2=0,50$ para alguns compostos. A resposta da produção de daidzina nas vagens (Figura 7A), à aplicação dos tratamentos foi linear (BRS 134) e quadrática (IAC 100). A produção de daidzina na BRS134 apresentou um aumento em 48 e 72 horas, com um declínio em 96, 120 e 144 horas. Em IAC 100, daidzina apresentou um aumento em 72 horas, porém nos demais tempos sua concentração manteve-se constante. As curvas de regressão de todos os genótipos indicaram resposta de nível quadrático significativo para a genistina (Figura 7B). As cultivares BRS 134 e Dowling apresentaram uma redução acentuada na concentração da genistina a partir de 96 horas. Na cultivar IAC 100 houve um aumento nos períodos de 48 e 72 horas com redução em 96 horas.

Na Figura 7C são apresentadas as curvas para malonil daidzina, sendo as respostas quadrática (BRS 134) e linear (IAC 100). Na cultivar BRS 134 houve uma redução de malonil daidzina em 48, 72 e 96 horas com aumento em 120 e 144 horas. Na cultivar IAC 100, a concentração da malonil daidzina aumentou durante os tempos (48, 96, 120 e 144 horas).

A concentração de malonil genistina (Figura 7D) apresentou resposta linear (IAC 100 e Dowling) com um aumento desta substância ao longo do tempo, enquanto que para a BRS 134 a resposta foi quadrática com redução em 72, 96 e 120 horas e aumento em 144 horas. Em relação à gliciteína (Figura 7E) a resposta foi quadrática para a BRS 134 com redução em 48, 72 e 96 horas e aumento da concentração da

substância em 120 e 144 horas. Em IAC 100 a concentração de gliciteína ajustou ao modelo linear com aumento ao longo das horas.

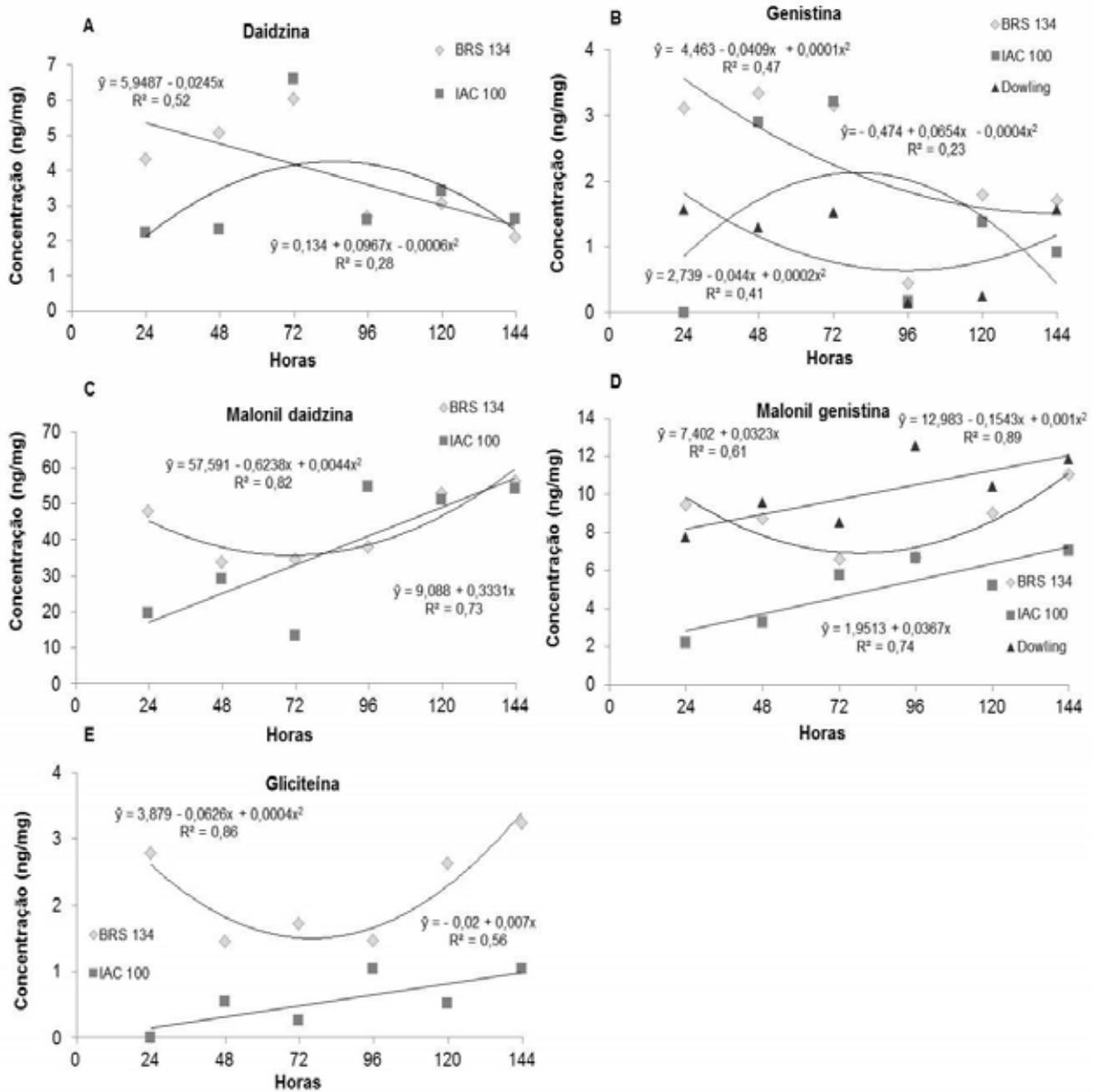


Figura 7. Concentração de daidzina (A), genistina (B), malonil daidzina (C), malonil genistina (D) e gliciteína (E) em vagem dos genótipos BRS 134, IAC 100 e Dowling pulverizadas com os diferentes tratamentos. Análise de regressão polinomial para os níveis de horas dentro do genótipo.

Na Figura 8, são apresentadas as curvas de regressão relacionadas à interação tratamento x tempo. A resposta para concentração da daidzina nas plantas tratadas com Água (Figura 8A) foi quadrática com um aumento em 72 horas. Para as plantas tratadas com *cis*-Jasmone a resposta foi linear observando-se um aumento da concentração da daidzina até às 72 horas, seguida de uma redução na concentração nos demais horários (96, 120 e 144 horas). Para a genistina (Figura 8B), Água e Tween 20 apresentaram resposta quadrática com redução da concentração em 96, 120 e 144 horas. Para as plantas tratadas com o *cis*-Jasmone a concentração de genistina a resposta foi linear com um aumento até às 72 horas, com redução em 96 horas e aumento em 120 e 144 horas. Malonil daidzina e malonil genistina (Figura 8C e 8D) apresentaram respostas lineares para Tween 20 e *cis*-Jasmone com um aumento das substâncias ao longo dos horários.

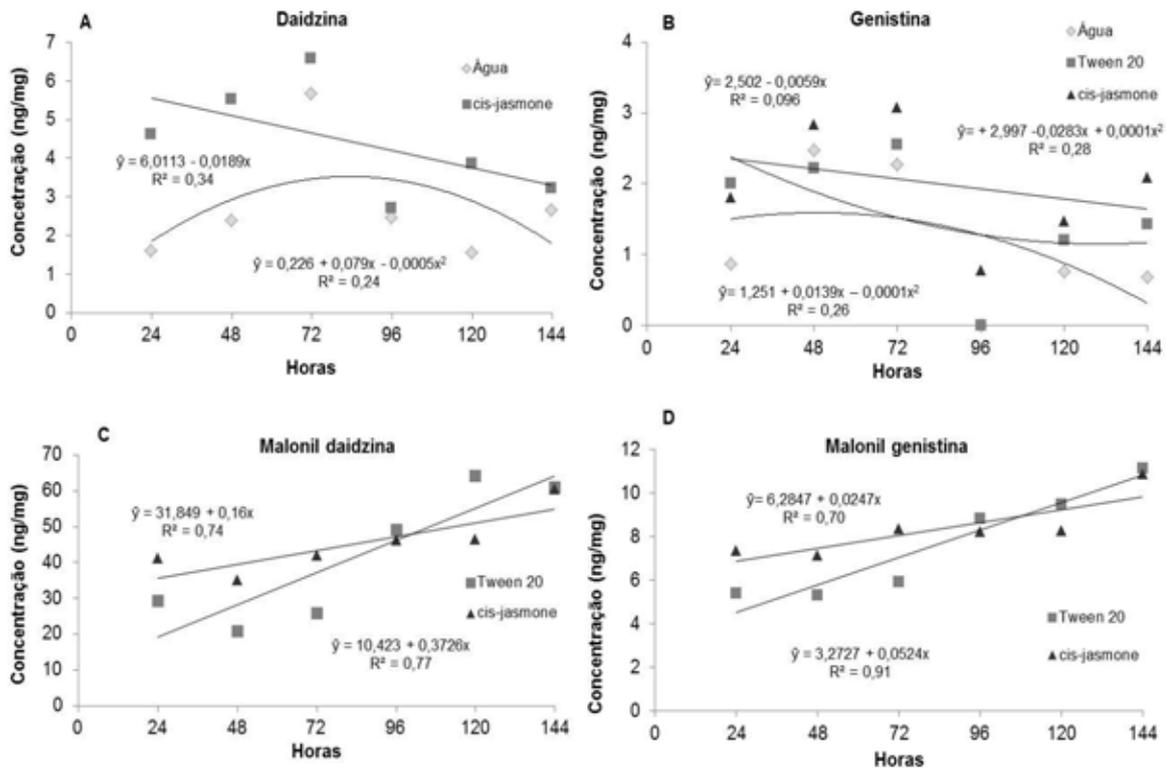


Figura 8. Concentração de daidzina (A), genistina (B), malonil daidzina (C), malonil genistina (D) em vagem dos genótipos BRS 134, IAC 100 e Dowling

pulverizadas com o diferentes tratamentos. Análise de regressão polinomial para os níveis de horas dentro do tratamento.

2.3.3. Isoflavonoides – Grão

Os resultados da análise de variância para a concentração de isoflavonoides no grão (Tabela 3) indicaram efeitos significativos ($p \leq 0,05$) entre os fatores genótipo (Gen), tratamentos (Trat) e tempo (Temp) tanto na forma isolada como em suas combinações para a daidzeína e genisteína. Para daidzina e genistina, e as malonís (daidzina, glicitina e genistina) não houve interação entre (Trat x Temp).

A concentração da daidzina no grão das plantas tratadas com Água (Figura 9A) foi maior na BRS 134 e Dowling quando comparada com IAC 100. Quando tratadas com Tween 20, BRS 134 e Dowling diferiram uma da outra. A daidzina nas plantas pulverizadas com *cis*-Jasmone não houve diferença significativa entre as cultivares. A cultivar BRS 134 não apresentou similaridade na concentração de daidzina entre os tratamentos com Água e *cis*-Jasmone, com redução nas plantas tratadas com Tween 20. As cultivares IAC 100 e Dowling tratadas com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone não apresentaram diferenças na concentração de daidzina.

A concentração de glicitina foi diferente apenas nas plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone (Figura 9B). Na cultivar BRS 134 não apresentou diferença estatística entre os tratamentos com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. A cultivar IAC 100 houve aumento da concentração de glicitina nas plantas tratadas com Tween 20. Em Dowling a concentração nas plantas tratadas com Água foi significativamente maior que as plantas desta cultivar tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone.

As concentrações de genistina nas plantas tratadas com Água e *cis*-Jasmone foram maiores em Dowling seguido da BRS 134 e IAC 100 (Figura 9C). Nas plantas tratadas com Tween 20 as cultivares Dowling e BRS 134 apresentaram as maiores concentrações de genistina. A aplicação dos tratamentos não afetou a concentração de genistina nas cultivares BRS 134 e IAC 100. No entanto, as plantas da cultivar Dowling tratada com *cis*-Jasmone se observou a maior concentração de genistina.

Tabela 3. Quadro da análise de variância (Graus de liberdade – GL, e valores de quadrado médio (Q.M.)) para concentração de isoflavonoides no grão de três cultivares de soja (BRS 134, IAC 100 e Dowling) após aplicação dos tratamentos Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone.

Variação	GL	Valor de Q.M.							
		Daidzina (ng/mg)	Glicitina (ng/mg)	Genistina (ng/mg)	Malonil daidzina (ng/mg)	Malonil glicitina (ng/mg)	Malonil genistina (ng/mg)	Daidzeína (ng/mg)	Genisteína (ng/mg)
Bloco	4	22,38 ^{ns}	11,46 ^{ns}	190,00 ^{ns}	472,83 ^{ns}	64,30 ^{ns}	3142,80 ^{ns}	0,005 ^{ns}	0,040 ^{ns}
Genótipo (Gen)	2	1822,80 ^{***}	281,93 ^{***}	24630,98 ^{***}	321767,66 ^{***}	3745,37 ^{***}	452138,0 ^{***}	0,142 ^{***}	1,230 ^{***}
Tratamento (Trat)	2	542,30*	3,40 ^{ns}	2736,55**	50501,39**	61,38 ^{ns}	45488,25 ^{***}	0,134 ^{***}	0,270 ^{***}
Tempo (Temp)	5	5302,55 ^{***}	799,43 ^{***}	15658,50 ^{***}	131296,41 ^{***}	1756,22 ^{***}	114501,2 ^{***}	0,226 ^{***}	0,350 ^{***}
Gen x Trat	4	678,68 ^{***}	229,67 ^{***}	1450,17*	46143,46 ^{***}	302,25 ^{ns}	58762,21 ^{***}	0,156 ^{***}	0,092*
Gen x Temp	10	1593,50 ^{***}	316,37 ^{***}	4236,66 ^{***}	61080,13 ^{***}	884,58 ^{***}	53629,51 ^{***}	0,123 ^{***}	0,194 ^{***}
Trat x Temp	10	145,78 ^{ns}	68,50*	787,06 ^{ns}	4786,47 ^{ns}	201,82 ^{ns}	9149,73 ^{ns}	0,027 ^{**}	0,091 ^{**}
GenxTratxTemp	20	270,90 ^{**}	41,06 ^{ns}	1151,92 ^{**}	8341,99 ^{ns}	198,97 ^{ns}	8593,72 ^{ns}	0,025 ^{***}	0,106 ^{***}
Resíduo	212	131,93	36,14	474,07	6927,91	152,11	5894,19	0,009	0,036
Total	269	-	-	-	-	-	-	-	-

*p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001, ^{ns} não significativo p>0,05

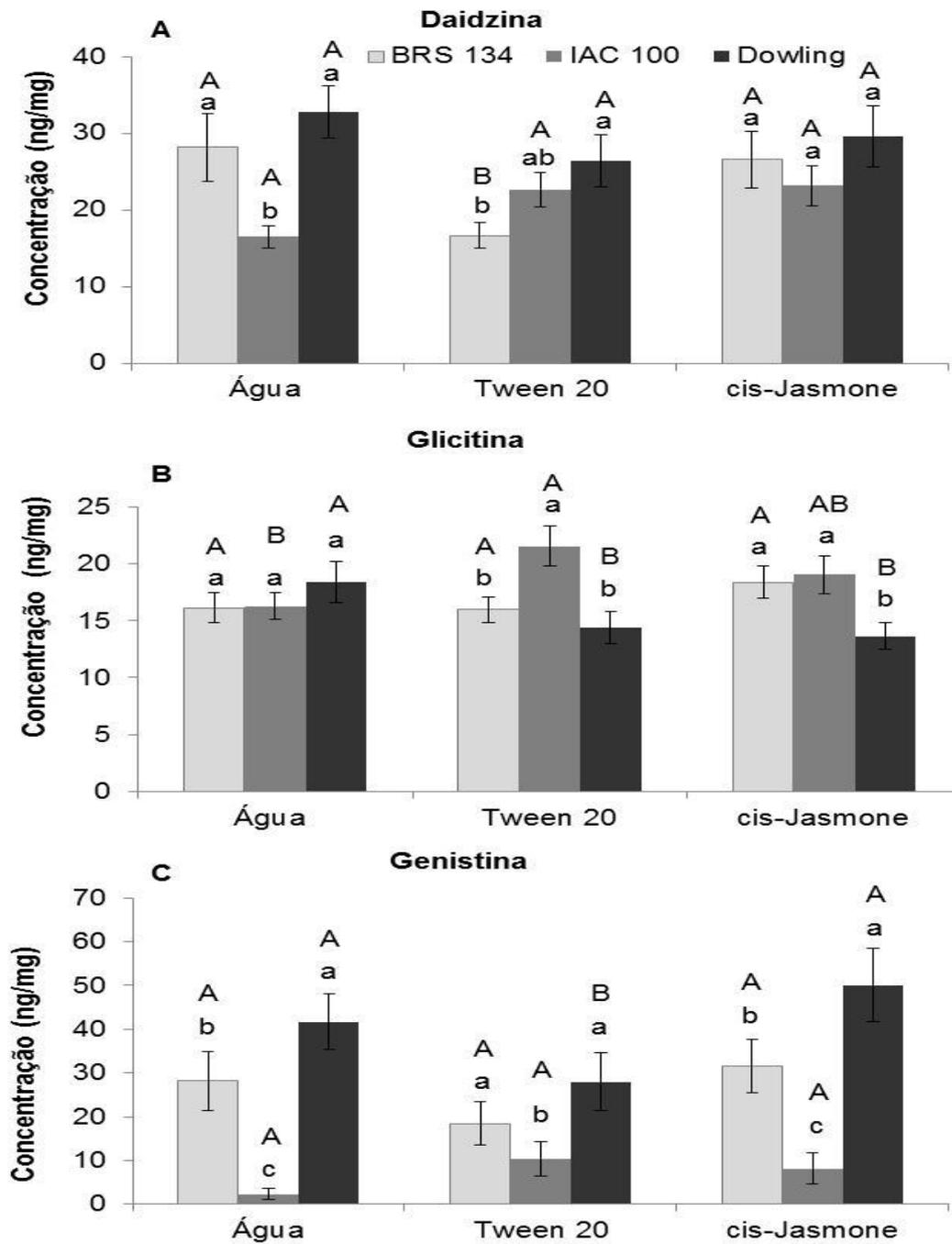


Figura 9. Concentração de daidzina (A), glicitina (B) e genistina (C) no grão de três genótipos de soja (BRS 134, IAC 100 e Dowling) tratados com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. Letra minúscula compara as cultivares no tratamento. Letra maiúscula compara a cultivar nos diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A concentração de malonil daidzina (Figura 10A) nas plantas tratadas com Água foi maior nas cultivares BRS 134 e Dowling. Das plantas pulverizadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone, a cultivar Dowling apresentou a maior concentração. Foi observada uma redução na concentração de malonil daidzina na cultivar BRS 134 tratada com Água (258,52 ng/mg) em relação as plantas tratadas com *cis*-Jasmone (176,85 ng/mg) e Tween 20 (139,76 ng/mg). Para IAC 100 não houve diferença entre os tratamentos. Em Dowling nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone (279,12 ng/mg) foram observadas as maiores concentrações de malonil daidzina seguidas das plantas tratadas com Água (248,52 ng/mg) e Tween 20 (218,82).

A concentração da malonil genistina (Figura 10B) na BRS 134 e Dowling tratadas com Água tiveram as maiores concentrações. Nas plantas tratadas com Tween 20, a cultivar Dowling apresentou a maior concentração diferindo da BRS 134 e IAC 100. A aplicação do *cis*-Jasmone aumentou a concentração da malonil genistina em Dowling em relação a BRS 134 e IAC 100. A concentração da malonil genistina foi reduzida nas plantas da cultivar BRS 134 tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone. A IAC 100 não diferiu significativamente entre os tratamentos. Na Dowling tratadas com *cis*-Jasmone a concentração da malonil genistina foi maior do que nas plantas tratadas com Água e Tween 20.

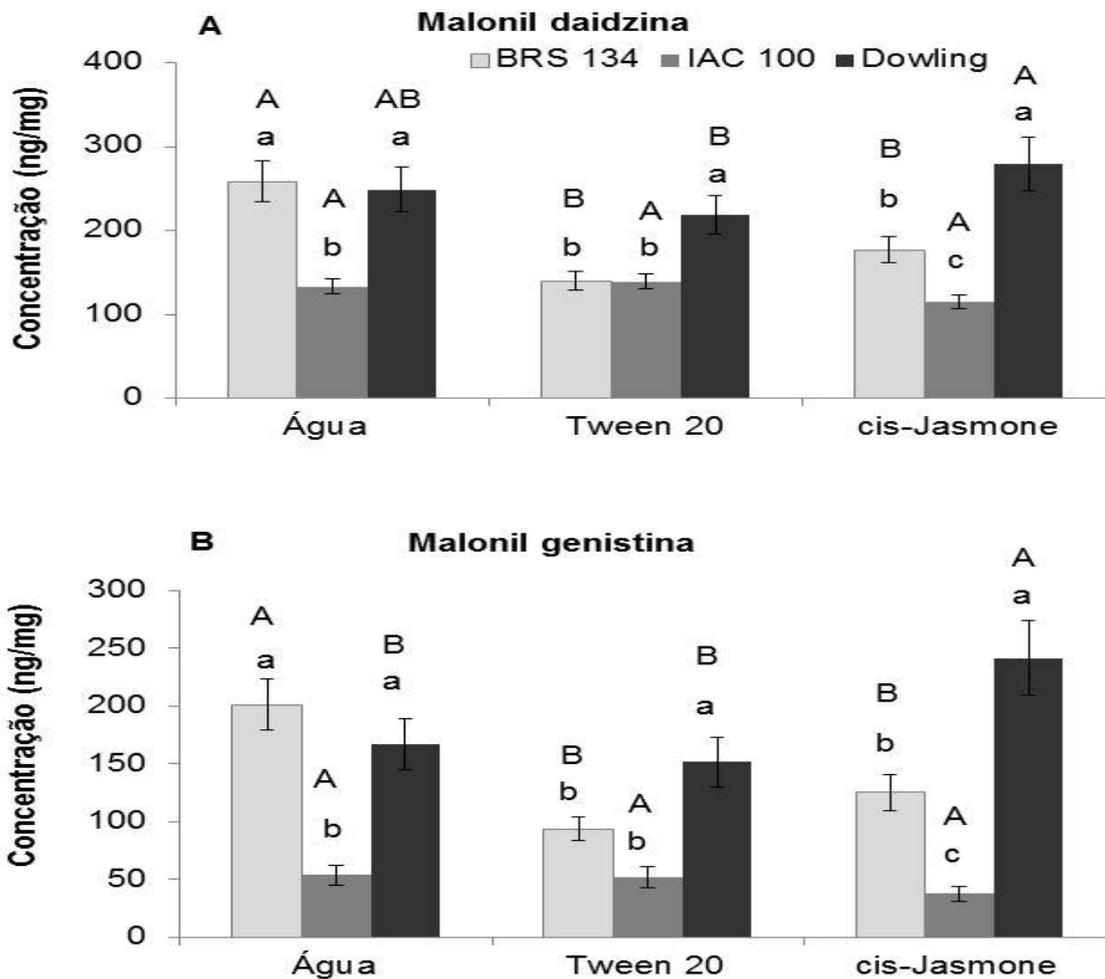


Figura 10. Concentração de malonil daidzina (A) e malonil genistina (B), no grão de três genótipos de soja (BRS 134, IAC 100 e Dowling) tratados com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. Letra minúscula compara as cultivares no tratamento. Letra maiúscula compara a cultivar nos diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A concentração da aglicona daidzeína (Figura 11A) nas plantas tratadas com Água indicou diferença entre a cultivar Dowling e IAC 100. Nas plantas tratadas com Tween 20 a daidzeína foi reduzida em Dowling que diferiu da BRS 134 e IAC 100. Nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone, a concentração da daidzeína da BRS 134 (0,263 ng/mg) diferiu das cultivares IAC 100 (0,154 ng/mg) e Dowling (0,058 ng/mg), tendo na BRS 134 a maior resposta comparada às plantas tratadas com Tween 20 e Água. A

cultivar IAC 100 também indicou um aumento na concentração de daidzeína nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone. Entretanto, sua concentração foi reduzida em Dowling quando tratada com Tween 20 e *cis*-Jasmone.

A concentração de genisteína nas plantas tratadas com Água (Figura 11B) foi maior na cultivar Dowling seguido de BRS 134. Nestas mesmas cultivares, as plantas tratadas com Tween 20 reduziram a concentração de genisteína. Nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone houve diferença entre a cultivar Dowling em comparação com BRS 134 e a indução da genisteína em IAC 100. Na cultivar BRS 134 não houve diferença na concentração da genisteína entre os tratamentos, sendo o composto identificado apenas na IAC 100 no tratamento com *cis*-Jasmone. A maior concentração de genisteína foi observada em Dowling tratadas *cis*-Jasmone, e reduzida nas plantas tratadas com Tween 20.

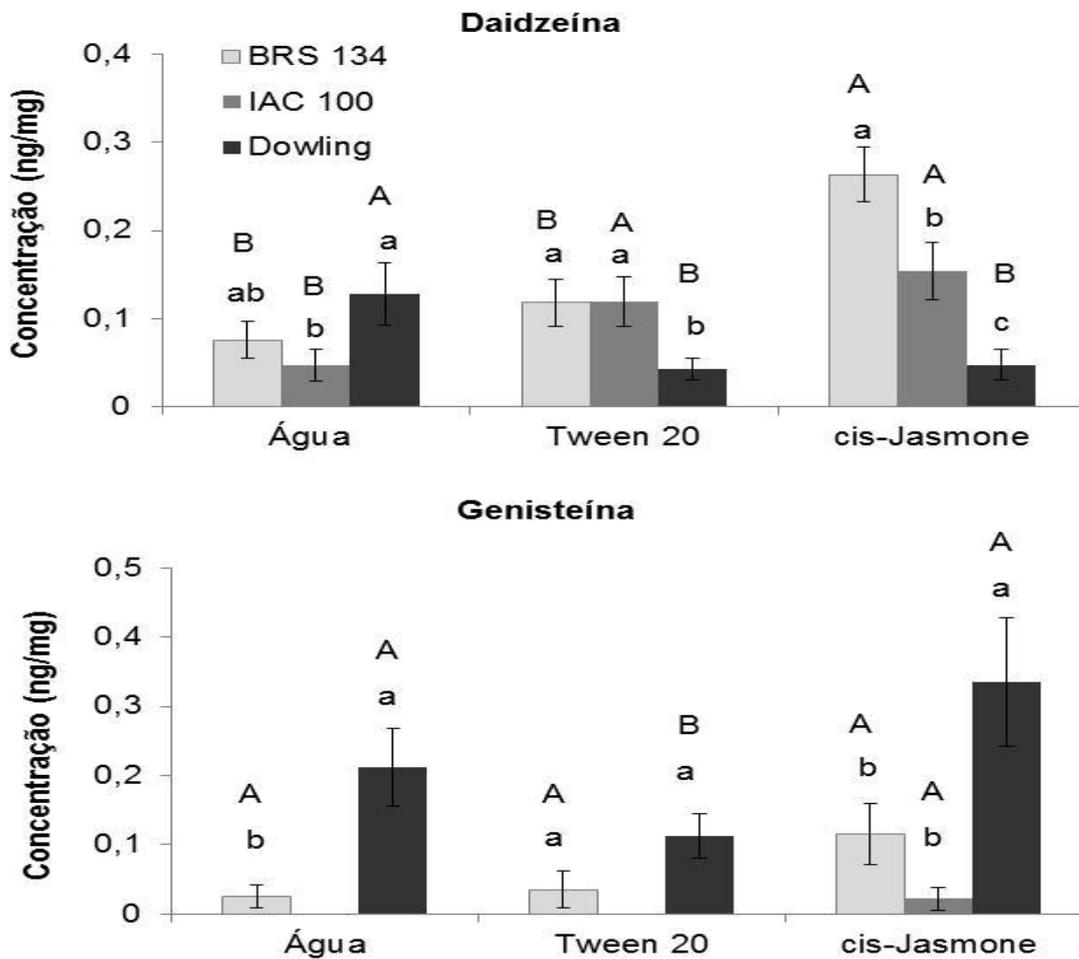


Figura 11. Concentração de daidzeína (A) e genisteína (B) no grão de três genótipos de soja (BRS 134, IAC 100 e Dowling) tratados com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. Letra minúscula compara as cultivares no tratamento. Letra maiúscula compara a cultivar nos diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De modo geral, as substâncias tiveram um aumento de suas concentrações nos genótipos ao longo do tempo de análise. Na Figura 12 são apresentadas as curvas de regressão relacionadas à interação genótipo x tempo. A resposta da concentração das formas glicosídicas daidzeína, glicitina e genisteína (Figura 12A, 12B, 12C) nos grãos o ajuste foi linear para os genótipos BRS 134 e IAC 100 pela aplicação dos tratamentos com um aumento ao longo dos horários, enquanto para cultivar Dowling o efeito quadrático foi significativo com uma redução da concentração nos horários de 48 e 72

horas e aumento em 96, 120 e 144 horas. As malonís daidzina e genistina (Figura 12D, 12F) a cultivar BRS 134 apresentou resposta linear com um aumento da concentração, enquanto a cultivar Dowling apresentou resposta quadrática com redução da concentração em 48 e 72 horas e aumento em 96, 120 e 144 horas. A cultivar IAC 100 obteve um ajuste linear para a concentração da malonil glicitina (Figura 12E). Esse ajuste na cultivar Dowling foi quadrático e teve uma redução na concentração em 48 e 72 horas e aumento em 96, 120 e 144 horas. A daidzeína (Figura 13G) apresentou resposta quadrática em todos os genótipos com aumento da concentração na cultivar IAC 100 e BRS 134 e redução em Dowling. A genisteína (Figura 12H) apresentou ajuste linear para a cultivar BRS 134 assim como para a cultivar Dowling que teve aumento de sua concentração em 96, 120 e 144 horas.

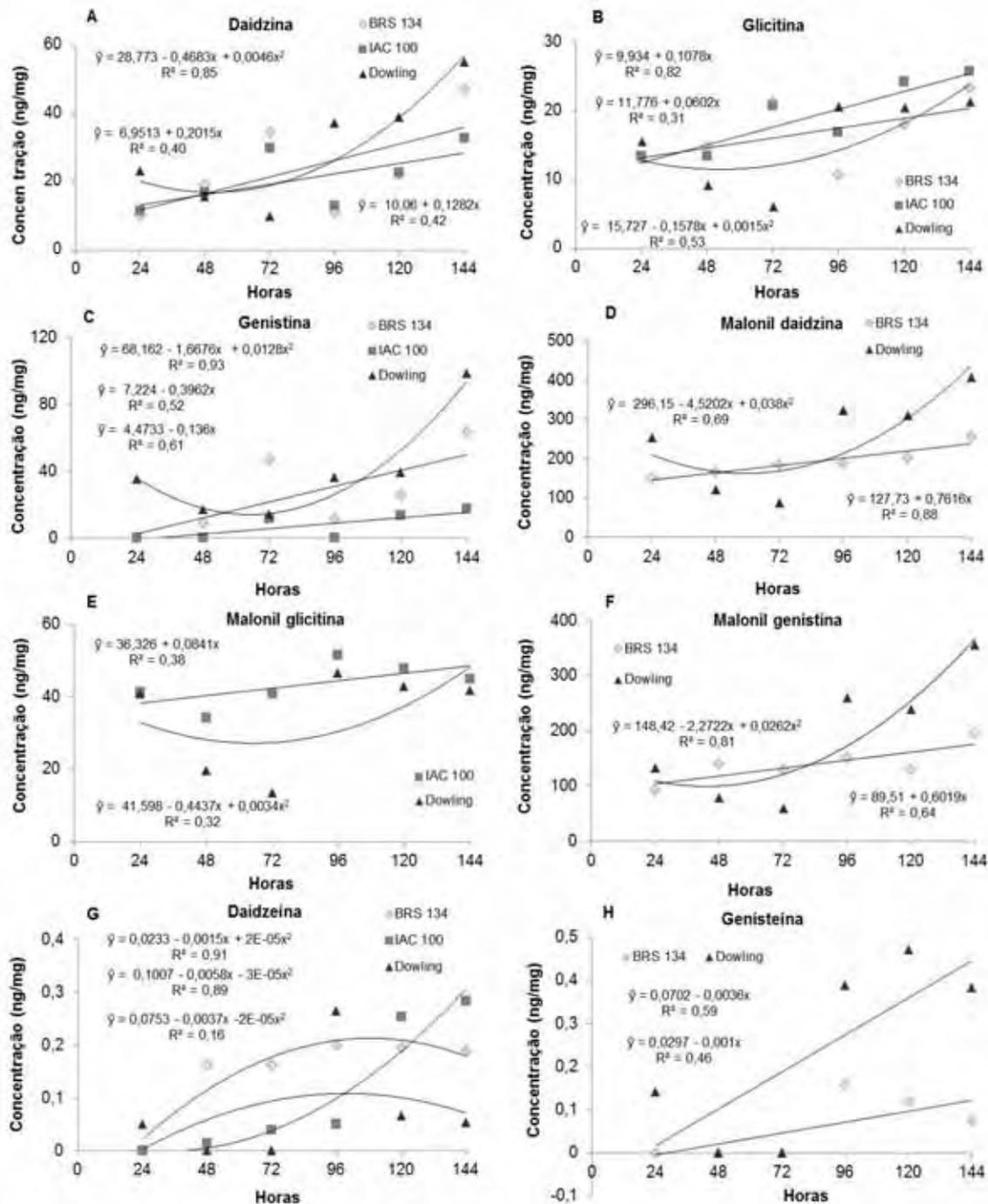


Figura 12. Concentração de daidzina (A), glicitina (B), genistina (C), malonil daidzina (D), malonil glicitina (E) malonil genistina (F), daidzeína (G) e genisteína (H) em grãos de três genótipos de soja (BRS 134, IAC 100 e Dowling) pulverizadas com os diferentes tratamentos. Análise de regressão polinomial para os níveis de horas dentro do genótipo.

Na Figura 13, são apresentadas as curvas de regressão relacionadas à interação tratamento x tempo, que indicaram um aumento da concentração das substâncias nos tempos pela aplicação dos tratamentos. A glicitina apresentou resposta linear para as plantas tratadas com Água e Tween 20 (Figura 13A) com um aumento da concentração após 72 horas. Nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone a concentração de glicitina obteve ajuste quadrático com aumento da concentração em 72, 120 e 144 horas. A concentração de daidzeína nas plantas tratadas com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone apresentaram resposta linear (Figura 13B), com aumento na concentração nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone. A resposta da concentração de genisteína foi linear para as plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone (Figura 13C).

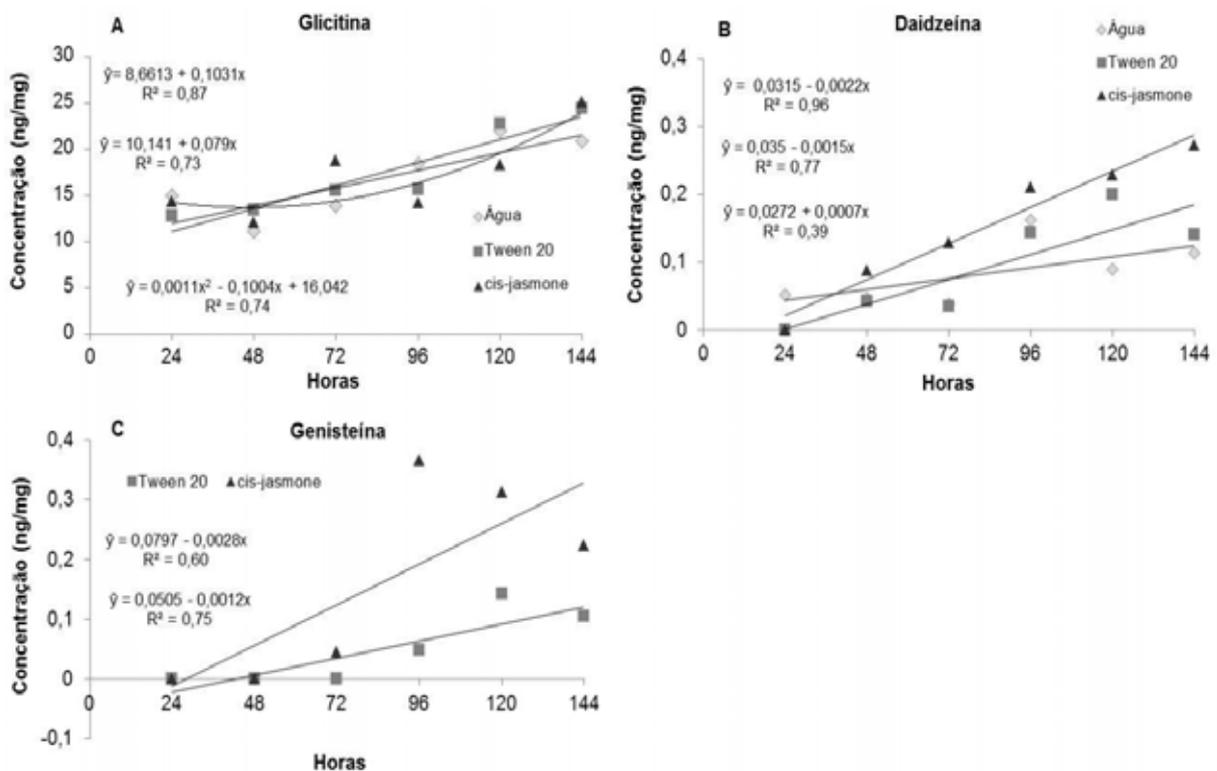


Figura 13. Concentração de glicitina (A), daidzeína (B) e genisteína (C) em grãos de três genótipos de soja (BRS 134, IAC 100 e Dowling) pulverizadas com os diferentes tratamentos. Análise de regressão polinomial para os níveis de horas dentro do tratamento.

2.4. DISCUSSÃO

De modo geral, o tratamento dos genótipos de soja com *cis*-Jasmone ocasionou mudanças nos níveis das substâncias químicas da planta que afetaram o desenvolvimento do inseto. O *cis*-Jasmone desempenha um papel importante na indução de metabólitos de resistência, e seus sinais químicos induzem defesas na soja similares aos danos causados por insetos (MORAES et al., 2009). Os efeitos da indução pelo ataque de insetos ou pela aplicação exógena são similares, pois, podem repelir insetos-praga e atrair inimigos naturais que predam ou parasitam as pragas (BRUCE et al., 2003; BRUCE et al., 2008).

A capacidade de afetar o desenvolvimento de insetos-praga foi observada em videira (*Vitis vinifera*) através da aplicação do ácido jasmônico que promoveu reduções na fecundidade, número de ovos e nos instares ninfal (OMER et al., 2000). Em tomate (*Lycopersicon esculentum*) a aplicação do ácido jasmônico reduziu a longevidade e a taxa de reprodução de afídeos adultos, causando um impacto negativo na sobrevivência destes (COOPER & GOGGIN, 2005). No presente trabalho a aplicação do *cis*-Jasmone na cultivar Dowling promoveu uma redução no peso do *E. heros* devido à indução de compostos que afetaram o desenvolvimento do percevejo. As lipoxigenases (EC. 1.13.11) são enzimas conhecidas como precursoras dos passos da via dos jasmonatos, principalmente em resposta ao ataque de pragas (TURNER et al., 2002). Estas enzimas são responsáveis por desencadear a indução de metabólitos secundários, assim como alterarem a expressão de genes como os de inibidores de proteinases que atuam negativamente na digestão das proteínas vegetais pelos herbívoros (KOIAWA et al., 1997; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). Esses dados sugerem que houve influência no metabolismo das plantas de soja, principalmente da cultivar Dowling que apresentou redução significativa no peso de *E. heros* tratadas com *cis*-Jasmone (2,17 mg), em relação a Água e Tween 20 (11,84 e 12,93 mg respectivamente). Além de afetar o desenvolvimento de insetos, e induzir mudanças químicas nas plantas, os jasmonatos podem causar alterações estruturais que resultam

no aumento da densidade do número de tricomas glandulares em plantas de tomate (BOUGHTON et al., 2005). A importância dos jasmonatos observada em plantas selvagem e mutante de tomate com deficiência na produção do ácido jasmônico demonstrou que este é um componente essencial na regulação da expressão de defesa direta e indireta (herbívoro e inimigo natural) contra lagartas de *Spodoptera exigua* (THALER et al., 2002). Entre as características dos jasmonatos, nos testes em olfatômetro o *cis*-Jasmone provou ser repelente à *Sitobion avenae* um afídeo que ataca o trigo (*Triticum aestivum*) e também por diminuir a suscetibilidade das plantas e reduzir o crescimento populacional do pulgão (BRUCE et al., 2003). Genes associados com a via do octadecanóico (lipoxigenase, aleno óxido sintase, 12-OPDA reductase, divinil éter sintase e hidroperóxido liase) foram induzidos em plantas resistentes de *Medicago truncatula* infestadas com o afídeo *Acyrtosiphon kondoi* (GAO et al., 2007). Os autores destacam que a aplicação de metil jasmonato em plantas suscetíveis reduziu a infestação do afídeo, e sugerem que a via octadecanoico é uma forma de resistência da planta a essa praga, confirmando a participação dos jasmonatos na indução de resistência contra insetos-praga. A ativação da resistência em arroz (*Oryza sativa*) pela aplicação foliar do ácido jasmônico reduziu a longevidade e eclodibilidade dos ovos de *Nilaparvata lugens*, e afetou a quantidade de alimento ingerido e assimilado, causando impacto negativo direto na sobrevivência do inseto (SENTHIL-NATHAN et al., 2009). A cultivar Dowling apresenta resistência ao afídeo da soja *Aphis glycines* (LI et al., 2008), e no presente estudo seu desempenho foi relacionado à aplicação do *cis*-Jasmone que possivelmente, ativou substâncias químicas envolvidos na defesa direta desta cultivar.

A aplicação de indutores de resistência tem apresentado efeitos sobre as plantas através da indução direta, onde muitas das respostas de defesa latentes da planta são elicitadas e expressas na forma de compostos químicos que atuam no comportamento e/ou biologia dos herbívoros (MATTHES et al., 2010; CREELMAN et al., 1992). O modo de atuação dos jasmonatos demonstra que este fitormônio apresenta ação sistêmica na planta e o silenciamento desta via tem demonstrado a vulnerabilidade das plantas a novas espécies de herbívoros (KESSLER et al., 2004). Pesquisas demonstram que os jasmonatos podem desencadear a síntese de uma gama de metabólitos secundários e

antinutricionais envolvidos na defesa de diversas espécies de plantas. Em trigo a aplicação de *cis*-Jasmone teve importante função na indução de compostos relacionados na defesa como DIMBOA e ácidos fenólicos relacionados com a capacidade de reduzir o desenvolvimento de pragas e doenças (MORAES et al., 2008).

No presente trabalho a aplicação do *cis*-Jasmone nas plantas de soja induziu a produção dos isoflavonoides nas vagens das cultivares BRS 134 e Dowling (daidzina, genistina, malonil daidzina, malonil genistina, genisteína, daidzeína e gliciteína) e reduziu a produção na cultivar IAC 100 (malonil daidzina e malonil genistina). As formas glicosídicas como daidzina e genistina são descritas como formas constitutivas, assim como observado no presente trabalho nas plantas controle (Água eu Tween 20), enquanto que a aglicona daidzeína tem sido considerada um precursor de gliceolinas em soja (GRAHAM et al., 1990). O aumento da concentração das agliconas daidzeína e genisteína, principalmente na cultivar Dowling permite sugerir a participação destas substâncias na redução do peso do inseto. Os resultados da aplicação do *cis*-Jasmone indicou que o grão foi mais responsivo a produção dos isoflavonoides do que em vagens (Trat x Tem). Em resposta ao ataque do percevejo *Nezara viridula*, plantas de soja apresentaram um aumento da concentração das isoflavonas daidzina e genistina (PIUBELLI et al., 2003). HOFFMANN-CAMPO et al. (2001) estudando os efeitos dos extratos de genótipos de soja resistente observou que frações compostas de dois flavonoides glicosídicos (rutina e quercetina 3-O-glucosilgalactosídeo) e de uma isoflavona (genistina) afetaram negativamente o tempo de alimentação de larvas de *Trichoplusia ni*. Desta forma, o *cis*-Jasmone parece desempenhar papel importante no metabolismo secundário das plantas de soja atuando na produção de substâncias, com efeito sobre a biologia e desenvolvimento de pragas.

Em relação ao tempo de resposta, as análises de regressão para a daidzina e genistina (Gen x Tem ou Trat x Tem) nas vagens indicaram um aumento até 72 horas, redução em 96 horas e aumento em 120 e 144 horas. O inverso foi observado para malonil daidzina, malonil genistina e gliciteína que aumentaram suas concentrações ao longo dos horários. Resultados semelhantes foram observados em plantas de *Gossypium hirsutum* tratadas com *cis*-Jasmone que resultaram no aumento de

compostos voláteis orgânicos relacionadas à defesa (HEGDE et al., 2012). Em outro estudo foi observado em plantas de *Vicia faba* tratadas com *cis*-Jasmone uma indução na produção de (E)- β -ocimene, um monoterpene, com efeito, deterrente para pulgões e atrativo de parasitoides (BIRKETT et al., 2000).

De modo geral, as análises de regressão indicaram um aumento da concentração de todos os isoflavonoides analisados no grão ao longo do tempo (Gen x Tem). Interação significativa para tratamento x tempo foram observadas para glicitina, daidzeína e genisteína. A pré-existência de daidzina e malonil daidzina, glicosídeos de daidzeína, e a genistina e malonil genistina, glicosídeos de genisteína, parecem contribuir para a resistência de soja a infecções (GRAHAM & GRAHAM 1991; GRAHAM et al., 1990). O efeito das isoflavonas genisteína e daidzina foi observado como tóxico e também por alterarem negativamente o desenvolvimento e biologia de pragas como *Nezara viridula*, *Trichoplusia ni* e *Anticarsia gemmatalis* (SHARMA & NORRIS, 1991; HOFFMANN-CAMPO et al. 2001; PIUBELLI et al. 2003; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). A forma aglicona daidzeína é um precursor de fitolexinas como as gliceolinas e coumestrol. Estas substâncias de baixo peso molecular tem sido associadas à resistência da soja a doenças (GRAHAM, 1999; LOZOVAYA et al., 2004) e testes demonstraram que a aplicação de ácido jasmônico pode reduzir os danos causados por diferentes tipos de patógenos (THALER et al., 2004). A relação de flavonoides e antocianinas em sementes de *Vigna unguiculata* indicou uma baixa incidência de insetos-praga devido à altas concentrações destas substâncias (MAKOI et al., 2010).

WANG & WU (2005) observaram o aumento da atividade das enzimas lipoxigenase (LOX) e fenilalanina amônia liase (PAL) em *Taxus chinensis* pela exposição ao metil jasmonato e na indução do metabolismo secundário. XUE & ZHANG (2007) testaram o efeito da superexpressão do gene *NTR1* que codifica para a enzima ácido jasmônico carboxil metiltransferase e observaram que o aumento endógeno de metil jasmonato apresentou alterações na morfogênese de plantas de soja. A indução dos genes de nodulação por ácido jasmônico e metil jasmonato, indicaram os jasmonatos como uma nova classe de moléculas sinalizadoras no processo de simbiose entre *Bradyrhizobium*-soja (MABOOD & SMITH, 2005; MABOOD et al., 2006).

Deste modo, o aumento da concentração destas substâncias de defesa pode resultar em plantas com arsenal químico pré-formado que possa garantir rapidez e eficiência na resposta contra herbívoros ou na atração de inimigos naturais (RODRIGUEZ-SAONA et al., 2012), e também conciliar novas técnicas e métodos de controle de pragas com produtos que possam beneficiar tanto a cadeia produtiva de orgânicos como a produção em larga escala de alimentos.

2.5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos conclui-se que:

- A aplicação do *cis*-Jasmone ativou vias secundárias em plantas de soja na cultivar Dowling que atuaram na redução do peso do percevejo *E. heros*.
- A aplicação do *cis*-Jasmone desencadeou a produção de isoflavonoides tanto em vagem como no grão.
- A produção de isoflavonoides no grão foi induzida em todas as cultivares devido a aplicação do *cis*-Jasmone em todas as cultivares.
- As agliconas daidzeína e genisteína tiveram suas concentrações induzidas e aumentadas em vagem e grão respectivamente, pela aplicação do *cis*-Jasmone.

2.6. REFERÊNCIAS

- BIRKETT, M. A.; CAMPBELL, C. A. M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A. J.; MARTIN, J. L.; MATTHES, M.; NAPIER, J. A.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J. A.; POPPY G. M.; POW, E. M.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS G. H.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. New roles for *cis*-Jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 16, p. 9329-9334, 2000.
- BOUGHTON, A. J.; HOOVER, K.; FELTON, G. W. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 9, p. 2211-2216, 2005.
- BRUCE, T. J. A.; MARTIN, J. L.; PICKETT, J. A.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS, L. J. *cis*-Jasmone treatment induces resistance in wheat plants against the grain aphid, *Sitobion avenae* (Fabricius) (Homoptera:Aphididae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, n. 9, p.1031-1036, 2003.
- BRUCE, T. J. A.; MATTHES, M. C.; CHAMBERLAIN, K.; WOODCOCK, C. M.; MOHIB, A.; WEBSTER, B.; SMART, E. L.; BIRKETT, J. A.; NAPIER, J. A. *cis*-Jasmone induces Arabidopsis genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 12, p. 4553-4558, 2008.
- CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; PENNACCHIO, F.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J. A.; POPPY, G. M.; POWELL, W.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Can aphid-induced plant signals be transmitted aerielly and through the rhizosphere? **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1063-1074, 2001.
- COOPER, W. R.; GOGGIN, F. L. Effects of jasmonate-induced defenses in tomato on the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 115, n. 1, p. 107–115, 2005.
- CREELMAN, R. A.; TIERNEY, M. L.; MULLET J. E. Jasmonic acid/methyl Jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 89, n. 11, p. 4938-4941, 1992.

DEWHIRST, S. Y.; PICKETT, J. A. Production of semiochemical and allelopathic agents as a consequence of aphid feeding. **Chemoecology**, Basel, v. 20, n. 2, p. 89-96, 2010.

DIXON, R. A.; STEELE, C. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 10, p. 394-400, 1999.

EL-SAYED, A. M.; MITCHELL, V. J.; MCLAREN, G. F.; MANNING, L. M.; BUNN, B.; SUCKLING, D. M. Attraction of new zealand flower thrips, *Thrips obscuratus*, to cis-Jasmone, a volatile identified from Japanese honeysuckle flowers. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 6, p. 656-663, 2009.

FEHR, W.R.; CAVINESS C. E.; BURMOOD D. T.; PENNINGTON J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Madison, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.

GAO, L. L.; ANDERSON, J. P.; KLINGLER, J. P.; NAIR, R. M.; EDWARDS, O. R.; SINGH, K. B. Involvement of the Octadecanoid Pathway in Bluegreen Aphid Resistance in *Medicago truncatula*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 1, p. 82-93, 2007.

GEYTER, N.; GHOLAMI, A.; GOORMACHTIG, S.; GOOSSENS, A. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 349-59, 2012.

GRAHAM, T. L. Biosynthesis and distribution of phytoestrogens and their roles in plant defense, signal transduction, and cell-to-cell signaling. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 2, n. 3-4, p. 93-97, 1999.

GRAHAM, T. L.; GRAHAM, M. Y. Glyceollin elicitors induce major but distinctly different shifts in isoflavonoid metabolism in proximal and distal soybean cell populations. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 4, p. 60-68, 1991.

GRAHAM, T. L.; KIM, J. E.; GRAHAM, M. Y. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 3, p. 157-166. 1990.

- HEGDE, M.; OLIVEIRA, J. N.; COSTA, J. G.; LOZA-REYES, E.; BLEICHER, E.; SANTANA, A. E. G.; CAULFIELD, J. C.; MAYON, P.; DEWHIRST, S. P.; BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A. Aphid antixenosis in cotton is activated by the natural plant defence elicitor *cis*-Jasmone. **Phytochemistry**, New York, v. 78, p. 81-88, 2012.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; HARBORNE, J. B.; MCCAFFERY, A. R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 98, n. 2, p. 181-194, 2001.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; RAMOS NETO, J. A.; OLIVEIRA, M. C. N. DE.; OLIVEIRA, L. J. Detrimental effect of rutin on a main soybean defoliator pest, *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 10, p. 1453-1459, 2006.
- KESSLER, A.; HALITSCHKE, R.; BALDWIN, I. T. Silencing the jasmonate cascade: Induced plant defense and insect populations. **Science**, Champaign, v. 305, n. 5684, p. 665-668, 2004.
- KOIWA, H.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 10, p. 379-384, 1997.
- KOO, A. J. K.; HOWE, G. A. The wound hormone jasmonate. **Phytochemistry**, New York, v. 70, n. 13-14, p. 1571-1580, 2009.
- LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 5, n. 1, p. 93-109, 2002.
- LI, Y.; ZOU, J.; LI, M.; BILGIN, D. D.; VODKIN, L. O.; HARTMAN, G. L.; CLOUGH, S. J. Soybean defense responses to the soybean aphid. **New Phytologist**, Cambridge, v. 179, n. 1, p. 185-195, 2008.
- LOURENÇÃO, A. L.; PEREIRA, J. C. V. N. A.; MIRANDA, M. A. C.; AMBROSANO, G. M. B. Avaliação de danos causados por percevejos e por lagartas em genótipos de soja de ciclos precoce e semiprecoce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v. 35, p. 879-886, 2000.

- LOZOVAYA, V. V.; LYGIN, A. V.; ZERNOVA, O. V.; LI, S.; HARTMAN, G. L.; WIDHOLM, J. M. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 7-8, p. 671–679, 2004.
- MABOOD, F.; SMITH, D. Pre-incubation of *Bradyrhizobium japonicum* with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) at optimal and suboptimal root zone temperatures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 125, n. 3, p. 311-323, 2005.
- MABOOD, F.; SOULEIMANOV, A.; KHAN, W.; SMITH, D. L. Jasmonates induced Nod factor by *Bradyrhizobium japonicum*. **Plant Physiology and Biochemistry**. Paris, v. 44, n. 11-12, p. 759-765, 2006.
- MAKOI, J. H. J. R.; BELANE, A. K.; CHIMPHANGO, S. B. M.; DAKORA, F. D. Seed flavonoids and anthocyanins as markers of enhanced plant defence in nodulated cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 21-27, 2010.
- MATTHES, M. C.; BRUCE, T. J. A.; TON, J.; VERRIER, P. J.; PICKETT, J. A.; NAPIER, J. A. The transcriptome of *cis*-Jasmone-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence. **Planta**, Berlin, v. 232, n. 5, p. 1163-1180, 2010.
- McCONN, M.; CREELMAN, R. A.; BELL, E.; MULLET, J. E.; BROWSE, J. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 94, n. 10, p. 5473-5477, 1997.
- MORAES, M. C. B.; BIRKETT, M. A.; GORDON-WEEKS, R.; SMART, L. E.; MARTIN, J. L.; PYE, B. J.; BROMILOW, R.; PICKETT, J. A. *cis*-Jasmone induces accumulation of defence compounds in wheat, *Triticum aestivum*. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 1, p. 9-17, 2008.
- MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PAREJA, M.; SERENO, F. T. P. S.; MICHEREFF, M. F. F.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-Jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 131, n. 2, p. 178-188, 2009.

- OMER, A. D.; THALER, J. S.; GRANETT, J.; KARBAN, R. Jasmonic Acid Induced Resistance in Grapevines to a Root and Leaf Feeder. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 3, p. 840-845, 2000.
- PANIZZI, A.R.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. **Trends in Entomology**, Trivandrum, v. 1, p. 71-88, 1997.
- PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; MORAES, M. C. B.; BRUCE, T. J. A.; CHAMBERLAIN, K.; GORDON-WEEKS, R.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; SMART, L. E.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. *cis*-Jasmone as allelopathic agent in inducing plant defence. **Allelopathy Journal**, Hisar, v. 19, n. 1, p. 109-118, 2007.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; FRANCHINI, J. C.; LARA, F. M. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its affect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, n. 5, p. 1223-1233, 2003.
- RODRIGUEZ-SAONA, C.; BLAAUW, B. R.; ISAACS, R. Manipulation of natural enemies in agroecosystems: Habitat and semiochemicals for sustainable insect pest control. In. LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Eds). **Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics**. InTech, 2012, p. 89-126.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT: User's Guide: Statistics, Version 9.2**. Cary: SAS Institute, NC: Statistical Analysis Systems, 2009. 7869p.
- SETHIL-NATHAN, S.; KALAIVANI, K.; CHOI, M. Y.; PAIK, C. H. Effects of jasmonic acid-induced resistance in rice on the plant brownhopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 95, n. 2, p. 77-84, 2009.
- SHARMA, H. C.; NORRIS, D. M. Chemical basis of resistance in soybean to cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 55, n. 3, p. 353-364, 1991.
- THALER, J. S.; FARAG, M. A.; PARÉ, P. W.; DICKE, M. Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defences against herbivores. **Ecology Letters**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 764-774, 2002.

- THALER, J. S.; OWEN, B.; HIGGINS, V. J. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. **Plant Physiology**, Washington, v. 135, n.1, p. 530-538, 2004.
- TURNER, J. G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. suppl 1, p. S153-S164, 2002.
- VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 2-20, 2000.
- WANG, J. W.; WU, J. Y. Nitric oxide is involved in methyl jasmonate-induced defense responses and secondary metabolism activities of taxus cells. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 6, p. 923-930, 2005.
- XUE, R.; ZHANG, B. Increased endogenous methyl jasmonate altered leaf and root development in transgenic soybean plants. **Journal of Genetics and Genomics**, China, v. 34, n. 4, p. 339-346, 2007.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A. A., SILVEIRA JÚNIOR, P. **Sistema de Análise Estatística - SANEST**, Registro na SEI No. 066060, UFPEL, Pelotas, 1982. 63p.

CAPÍTULO 3 - Tween 20 ou *cis*-Jasmone estimulam o metabolismo secundário de plantas de soja e que afetam o peso da lagarta-da-soja?

Resumo - *cis*-Jasmone é um indutor conhecido por influenciar nas respostas diretas de defesa das plantas contra insetos. Foram avaliados os efeitos da aplicação exógena do surfactante Tween 20 e do fitormônio *cis*-Jasmone em plantas de soja e sobre o ganho de peso de *Anticarsia gemmatalis*. Foram utilizados as cultivares BRS 134 (suscetível), IAC 100 e Dowling (resistentes) submetidas à aplicação dos tratamentos: Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. Para o bioensaio, lagartas ao final do 2º instar foram pesadas e individualizadas em gaiolas contendo um trifólio; as lagartas foram retiradas após 96 horas de alimentação. Os resultados indicaram que o peso das lagartas de *A. gemmatalis* foi afetado negativamente na cultivar IAC 100 tratada com Tween 20 (34,17 mg), quando comparado com as plantas tratadas com *cis*-Jasmone (46,37 mg); e na cultivar Dowling tratada com Tween 20 (36,57 mg) e *cis*-Jasmone (43,14 mg), quando comparado com as plantas tratadas com Água (56,00 mg). Na interação Genótipo x Tratamento, as folhas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone aumentaram a concentração das isoflavonas malonís (daidzina, glicitina e genistina) e da aglicona daidzeína, em comparação com a Água. Pelas análises de regressão foi observado aumento da concentração da fitoalexina coumestrol e a rutina nas plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone. Os resultados permitem sugerir que o Tween 20 induziu compostos que afetaram o metabolismo da planta e que influenciaram negativamente o desenvolvimento da lagarta, com efeito, mais pronunciado que o *cis*-Jasmone. A capacidade do Tween 20 em desencadear a indução de compostos e afetar o peso do inseto é discutida.

Palavras-chave: Fitoalexina, flavonoides, lagarta-da-soja, resistência induzida, semioquímicos.

3.1. INTRODUÇÃO

As plantas quando atacadas por insetos herbívoros produzem uma série de compostos secundários que atuam na defesa das plantas, afetando diretamente o organismo invasor ou indiretamente pela atração de inimigos naturais (SCHALLER & STINTZI, 2008; DICKE, 2009). Durante o ataque, as plantas apresentam diferentes mecanismos estruturais e químicos que participam em sua defesa (EDWARDS & SINGH, 2006) e os jasmonatos (ácido jasmônico, metil jasmonato e *cis*-Jasmone) têm sido descritos como uma das vias de defesa contra pragas (THALER, 1999; THALER et al., 2002; BOUGHTON et al., 2005; WANG et al., 2010; ZHU & TIAN, 2012).

O *cis*-Jasmone é um fitormônio com importante função como repelente de pragas e também por atrair predadores e parasitoides (BIRKETT et al., 2000; BRUCE et al., 2003), assim como na indução de metabólitos secundários que afetam o desenvolvimento de pragas (PICKETT et al., 2007). Em trigo, a aplicação do *cis*-Jasmone induziu o acúmulo de substâncias de defesa (MORAES et al., 2008), enquanto que em algodão estimulou a produção de compostos que tornaram a planta repelente ao afídeo *Aphis gossypii* (HEGDE et al., 2012). Em soja, sua aplicação produziu uma série de compostos voláteis que foram atrativos ao parasitoide de ovos de percevejo *Telenomus podisi* (MORAES et al., 2009).

Para a aplicação de alguns fitormônios é necessário a utilização de um agente surfactante como o Tween 20 (Monolaurato de polioxietileno 20 sorbitano), um detergente não iônico muito utilizado nos estudos de ciências vegetais (HUNZICKER, 2009). Esse surfactante quebra a tensão superficial facilitando a dispersão dos produtos químicos sobre as folhas. No entanto, Tween 20 foi descrito com a habilidade de induzir duas redutases oxofitodienoato, OPR1 e OPR2 (BIESGEN & WEILER, 1999; HUNZICKER, 2009). Em plantas de *Arabidopsis thaliana* o gene OPR1 foi identificado pela aplicação do *cis*-Jasmone evidenciando a ativação de genes de defesa (BRUCE et al., 2008) tanto por Tween 20 como pelo *cis*-Jasmone. Estas enzimas (OPR) estão relacionadas na conversão do (-)-*cis*-OPDA em (+)-*cis*-OPDA, que é um precursor do

ácido jasmônico (FEUSSNER & WASTERNAK, 2002; TANI et al., 2008). Demonstrando dessa forma o efeito sinérgico/indutor do Tween 20 na resistência em plantas. Seis diferentes compostos são derivados do ácido jasmônico e entre eles estão o metil éster, 11- e 12 hidroxí-JA, ácido cucurbitico, aminoácido conjugados, jasmonoil-1- β -glucose e o *cis*-Jasmone (HAUSE et al., 2007).

Na soja um grupo de substâncias derivados da rota dos fenilpropanoides conhecidas como isoflavonoides, tem sido estudado quanto à capacidade de afetar o desenvolvimento de pragas e doenças (DU et al., 2010). Entre essas substâncias, as de baixa polaridade como daidzeína, coumestrol e gliceolinas foram descritas por apresentarem efeitos antibióticos e/ou antialimentar em *Trichoplusia ni* (SHARMA & NORRIS, 1991). HOFFMANN-CAMPO et al. (2001) observaram que extratos de soja contendo dois flavonóis glicosídicos entre eles a rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo) e o isoflavona glicosídica genistina (genisteína 7-O-glucosídeo) afetaram negativamente o tempo de alimentação de *T. ni*. Em genótipo de soja, entre eles a cultivar IAC 100, considerada resistente a insetos-praga (PIUBELLI et al., 2003) apresentou altas concentrações de rutina que foi relacionada como importante fator na resistência à lagarta-da-soja *A. gemmatilis* (PIUBELLI et al., 2005). No caso da rutina, suas consequências resultam em efeitos pré-ingestivos (redução no consumo) e pós-ingestivos (baixa conversão do alimento) em testes com dieta artificial contendo altas concentrações deste composto (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006; SALVADOR et al., 2010).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a indução da resistência de plantas de soja após a aplicação foliar do Tween 20 e do *cis*-Jasmone, e também sua influência na biologia da lagarta-da-soja *A. gemmatilis* e a determinação do conteúdo de metabólitos secundários nas folhas.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material Vegetal

As sementes foram obtidas no banco de germoplasma de soja da Embrapa-Soja. Foram utilizadas as cultivares BRS 134 (suscetível), assim como as cultivares resistentes como a IAC 100 que apresenta resistência múltipla tanto para a lagarta (LOURENÇÃO et al., 2000) como para percevejo (PIUBELLI et al., 2003) e a cultivar Dowling que apresenta resistência ao afídeo da soja (LI et al., 2008). Esses genótipos foram tratadas com inoculante (6 mililitro/1 quilograma sementes), semeadas em substrato contendo pedra e vermiculita esterilizadas (1:2) e irrigadas com solução nutritiva (BROUGHTON & DILWORTH, 1970). A partir de 10 dias após a germinação, foi realizada a suplementação com um mililitro de solução de nitrato de amônio (40 gramas/litro), uma vez por semana. As plantas foram cultivadas individualmente em tubetes em casa-de-vegetação com fotoperíodo de 14 horas, temperatura de 28 °C e umidade relativa de 65 % até estágio V3 (FEHR et al., 1971).

3.2.2. Tratamento das plantas com *cis*-Jasmone

Plantas de soja em estágio V3 foram submetidas à aplicação exógena dos tratamentos segundo MORAES et al. (2009): (Água) água destilada; (Tween 20) água destilada + tween 20 (0,1%); e (*cis*-Jasmone) água destilada + tween 20 (0,1 %) + *cis*-Jasmone (1,4 mmol⁻¹). Para evitar a indução de resistência nas plantas controle, devido às características voláteis do *cis*-Jasmone, as plantas neste tratamento foram mantidas em casa-de-vegetação contígua, sob as mesmas condições de fotoperíodo, temperatura e umidade.

3.2.3. Ganho de peso da lagarta *A. gemmatalis*

Plantas dos genótipos foram crescidas e pulverizadas com os mesmos tratamentos descritos no item 3.2.1 e 3.2.2. Após 24 h da pulverização, lagartas de 2° para 3° instar da criação de insetos da Embrapa-Soja foram pesadas (peso inicial) e

individualizadas em gaiolas contendo uma lagarta e um trifólio da planta (Figura 1), sendo mantidas sob as mesmas condições da casa-de-vegetação descrita no item 3.2.1. Após 96 horas as placas foram removidas das plantas da casa-de-vegetação e levadas ao laboratório onde foi obtido o peso final da lagarta e subtraído do peso inicial para determinar o ganho de peso do inseto.



Figura 1. Suporte contendo plantas de soja e gaiolas utilizadas para o bioensaio contendo uma folha trifoliada de soja e lagarta de *Anticarsia gemmatalis*.

3.2.4. Extração dos isoflavonoides

Amostras das folhas dos genótipos cultivadas e pulverizadas com os tratamentos descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2 foram coletadas em 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer (-80°C) até a extração e análise dos isoflavonoides.

Para extração e quantificação das isoflavonas, as folhas foram maceradas, pesadas e extraídas com etanol 80% HCl (0,001 mmol) na proporção de 1:10 (m:v) e levadas ao banho de ultrassom por 20 min. As amostras foram centrifugadas a 9.880g a 4°C por 12 min, secas sob fluxo de nitrogênio gasoso, e ressolubilizadas com metanol 80% (1,2 mL) e filtradas em membrana Millipore® 0,45 µm e analisadas em HPLC (High Performance Liquid Chromatography) -- Shimadzu – modelo Prominence.

3.2.5. Identificação e Quantificação por HPLC

Os extratos metanólicos das amostras foram analisados por HPLC em coluna C18 de fase reversa (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5 micra). Alíquotas de 20µL foram injetadas automaticamente no equipamento Prominence da Shimadzu, com controlador CBM-20A; detector SPD-20A; degaseificador DGU 20A5; bomba LC-20AT; amostrador automático SIL-20A e forno CTO 20A (Figura 2). A fase móvel foi composta de dois solventes: 2% de ácido acético (HOAc) (A) e uma mistura de metanol, ácido acético e água ultrapura (MeOH:HOAc:H₂O; 18:1:1) (B). O sistema de gradiente linear utilizado na análise partiu da condição inicial com 75% de A e 25% de B, atingindo após 40 minutos a situação inversa, ou seja, 25% de A e 75% de B, mantida por cinco minutos. Ao atingir 45 minutos voltou à situação inicial permanecendo por cinco minutos antes da injeção seguinte. O fluxo do solvente foi de um mililitro por minuto e o registro feito na região do UV (ultra-violeta), no comprimento de onda 260 nanômetros (nm). As concentrações de rutina, coumestrol e das agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína), assim como das formas glicosídicas (daidzina, glicitina, genistina) e malonil glicosídica (malonil daidzina, malonil glicitina, malonil genistina), foram avaliadas através da comparação de espectro

obtido no UV (260 nm) e o tempo de retenção (minutos) de cada amostra, com o respectivo padrão de cada substância.



Figura 2. Imagem do equipamento do HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizado para identificação e quantificação de extratos vegetais e imagem do software .

3.2.6. Análise Estatística

Para o bioensaio com *A. gemmatilis* foram usados delineamentos de blocos ao acaso em arranjo fatorial: com três cultivares (BRS 134, IAC 100 e Dowling), três tratamentos (Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone) e 30 repetições dos blocos, totalizando 270 plantas. O modelo matemático para esta pesquisa é o que segue:

$$Y_{ijk} = m + \text{Trats}_i + \text{Bloco}_j + \text{Culti var}_k + \text{Trats} * \text{Culti var}_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

com

$$i = 1, \dots, I, j = 1, \dots, J, k = 1, \dots, K.$$

em que,

Y_{ijk} é o efeito da variável resposta

m é o efeito da média geral do experimento;

$Trat_i$ é o efeito do tratamento i ;

$Bloco_j$ é o efeito do bloco j ;

$Cultivar_k$ é o efeito das cultivares nas parcelas;

$Trats * Cultivar_{ik}$ é o efeito da interação dos tratamentos i pelas cultivares k ;

ε_{ijk} é o efeito do resíduo aleatório $N \cong (0, \sigma^2)$ associado a cada unidade experimental.

O experimento de quantificação de isoflavonoides foi realizado em blocos ao acaso em arranjo fatorial: com três cultivares (BRS 134, IAC 100 e Dowling), três tratamentos (Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone), seis tempos de coletas (24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas) e seis repetições dos blocos, totalizando 324 plantas. O modelo matemático para esta pesquisa é o que segue:

$$Y_{ijkl} = m + Trats_i + Bloco_j + Cultivar_k + Tempo_l + Trats * Cultivar_{ik} + Trats * Tempo_{il} + Cultivar * Tempo_{kl} + Trats * Cultivar * Tempo_{ikl} + \varepsilon_{ijkl}$$

$$com i = 1, \dots, I, j = 1, \dots, J, k = 1, \dots, K, l = 1, \dots, L$$

em que,

Y_{ijkl} é o efeito da variável resposta

m é o efeito da média geral do experimento;

$Trat_i$ é o efeito do tratamento i ;

$Bloco_j$ é o efeito do bloco j ;

Cultivar k é o efeito das cultivares nas parcelas;

$Tempo_l$ é o tempo de avaliação e retirada das folhas de soja l;

$Trats * Cultivar_{ik}$ é o efeito da interação dos tratamentos i pelas cultivares k ;

$Trats * Tempo_{il}$ é o efeito da interação dos tratamentos i pelo tempo l

$Cultivar * Tempo_{kl}$ é o efeito da interação dos cultivares k pelo tempo l

$Trats * Cultivar * Tempo_{ikl}$ é o efeito da interação dos tratamentos i pelas cultivares k e pelo tempo l;

ε_{ijkl} é o efeito do resíduo aleatório $N \cong (0, \sigma^2)$ associado a cada unidade experimental.

Os dados foram submetidos à análise exploratória para a verificação da existência de todos os pressupostos exigidos para o processamento da análise de variância (ANOVA). Em seguida, realizaram-se as comparações múltiplas das médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Fatores com valores quantitativos foram submetidos à análise de regressão. Os programas estatísticos utilizados foram os pacotes Statistical Analysis System, versão 9.2 (2009) e Sanest para DOS (ZONTA et al., 1982). Para o cálculo das esperanças do quadrado médio, os efeitos do modelo foram considerados como fixos, com exceção do efeito do bloco, que foi aleatório.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Ganho de peso do inseto

Os resultados obtidos no ganho de peso de *A. gemmatilis* indicaram pela ANOVA diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as fontes de variação (Tabela 1).

Tabela 1. Quadro da análise de variância (Graus de liberdade – GL, e valores de quadrado médio (Q.M.)) para o ganho de peso da lagarta alimentada com três cultivares de soja após aplicação exógena dos tratamentos com Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone.

Variação	GL	Valor de Q.M.
		Ganho de peso
Bloco	29	294,15 ^{ns}
Genótipo (Gen)	2	8243,43 ^{***}
Tratamento (Trat)	2	2454,98 ^{**}
Gen x Trat	4	865,78 [*]
Resíduo	232	338,29
Total	269	-

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, ^{ns} não significativo $p > 0,05$.

Pelo teste de médias foi observada uma redução do peso das lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com a cultivar IAC 100 tratadas com Água, quando comparado com as cultivares BRS 134 e Dowling (Figura 3). Nas plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone houve redução do peso das lagartas nas cultivares IAC 100 e Dowling. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos na BRS 134. No entanto, o peso de *A. gemmatalis* foi reduzido em IAC 100 tratada com Tween 20 (34,17 mg) quando comparado com as plantas tratadas com *cis*-Jasmone (46,37 mg) e Água (43,48 mg). Com a cultivar Dowling a aplicação tanto do Tween 20 (36,57 mg) ou do *cis*-Jasmone (43,14 mg) provocaram uma redução no peso das lagartas quando comparados com as plantas tratadas com Água (56,00 mg).

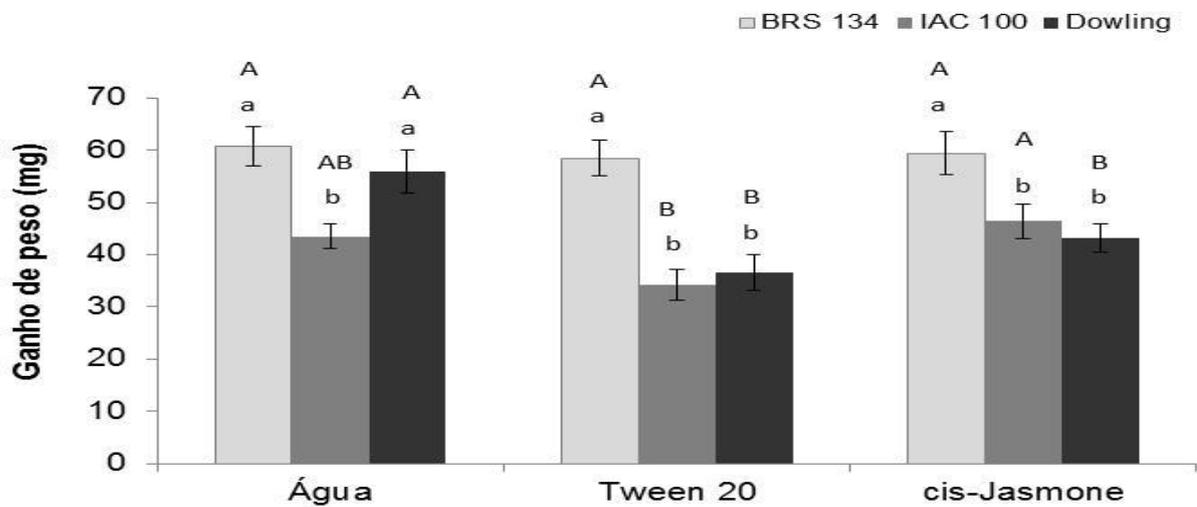


Figura 3. Ganho de peso de *A. gemmatilis* alimentadas com as cultivares BRS 134, IAC 100 e Dowling pulverizadas com os tratamentos Água, Tween 20 e cis-Jasmone. Comparação das cultivares dentro de cada tratamento (letra minúscula) e comparação de cada cultivar nos diferentes tratamentos (letra maiúscula). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3.2. Produção de isoflavonoides

Nas análises cromatográficas dos extratos foliares das cultivares de soja observou-se a produção dos isoflavonoides daidzeína, gliciteína e genisteína e suas formas glicosídicas e malonís, além do flavonoide rutina e da fitoalexina coumestrol. Os resultados da análise de variância (Tabela 2) para os fatores genótipos (Gen) e tempo (Temp), indicaram efeitos significativos ($p \leq 0,05$) na concentração de todos os isoflavonoides, e do flavonoide observado; no fator genótipo, não houve diferença na concentração de coumestrol. Entretanto, para tratamentos (Trat), não se observou diferença na concentração de rutina (flavonoide), mas houve diferença na fitoalexina (coumestrol).

As interações Gen x Trat ou Gen x Temp foram significativas no aumento das concentrações das malonís (daidzina, glicitina e genistina) e da aglicona daidzeína. Já a

interação Trat x Temp foi significativa para as concentrações de rutina, malonís glicitina e malonil genistina, gliciteína, genisteína e coumestrol. Embora tenha sido observada interação tripla (Gen x Temp x Trat) nas concentrações de alguns compostos, devido a sua complexidade, essas não serão interpretadas nesse trabalho.

Tabela 2. Resumo da análise de variância (Graus de liberdade – GL, e valores de quadrado médio (Q.M.)) para concentração de isoflavonoides da folha de três cultivares de soja após aplicação dos tratamentos Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone.

Variação	GL	Valor de Q.M.									
		Daidzina (ng/mg)	Genistina (ng/mg)	Rutina (ng/mg)	Malonil Daidzina (ng/mg)	Malonil Glicitina (ng/mg)	Malonil Genistina (ng/mg)	Daidzeína (ng/mg)	Gliciteína (ng/mg)	Genisteína (ng/mg)	Coumestrol (ng/mg)
Bloco		59,38 ^{NS}	730,53 ^{NS}	6596,73 ^{NS}	92,03 ^{NS}	12,03 ^{NS}	1053,72*	0,33 ^{NS}	104,10 ^{NS}	14,51 ^{NS}	9,62 ^{NS}
Genótipo (Gen)	2	155,80*	23552,27**	17814827,40***	89231,02***	422,46***	1394147,48**	10,56***	1024,83***	85,74**	0,67 ^{NS}
Tratamento (Trat)	2	7192,96***	18847,53**	30910,46 ^{NS}	4756,80***	646,05***	5596,64***	8,04***	3155,03***	84,33**	574,95***
Tempo (Temp)	5	166,88**	4284,10***	34342,65*	312,10*	24,12**	2321,63***	2,63***	1039,80***	99,03***	42,52***
Gen x Trat	4	46,80 ^{NS}	589,32 ^{NS}	21646,25 ^{NS}	4756,80***	68,77***	5596,64***	1,49*	127,43 ^{NS}	16,12 ^{NS}	0,49 ^{NS}
Gen x Temp	10	61,84 ^{NS}	663,88 ^{NS}	55097,23 ^{NS}	312,10***	31,00***	2321,63***	0,48*	50,08 ^{NS}	48,62 ^{NS}	6,83 ^{NS}
Trat x Temp	10	78,30 ^{NS}	323,21 ^{NS}	60602,75***	177,76 ^{NS}	21,68***	734,83*	0,54 ^{NS}	142,58*	32,62*	19,24***
Gen x Trat x Temp	20	156,24***	399,929 ^{NS}	48174,81***	177,76 ^{NS}	25,52***	734,83**	0,44 ^{NS}	144,21**	45,87***	9,74**
Resíduo	265	44,81	401,84	13825,06	130,11	5,73	357,34	0,47	60,11	15,39	4,77
Total	323	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001, ^{NS} não significativo p>0,05.

Malonil daidzina foi identificada apenas na cultivar Dowling (Figura 4A) onde observou-se aumento da concentração nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone (61,96 ng/mg) e Tween 20 (60,59 ng/mg), quando comparadas as plantas tratadas com Água (26,81 ng/mg). A concentração de malonil glicitina nas plantas tratadas com Água não apresentaram diferenças significativas (Figura 4B), entretanto, quando tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone todas as cultivares tiveram um aumento na concentração deste composto. Na cultivar BRS 134 a concentração de malonil glicitina aumentou em 5,05 ng/mg e 5,67 ng/mg nas plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone, respectivamente em relação as plantas tratadas com Água (1,32 ng/mg). Na cultivar IAC 100 apresentou um aumento da concentração de malonil glicitina nas plantas tratadas com Tween 20 (2,85 ng/mg) e *cis*-Jasmone (2,36 ng/mg) em relação às plantas tratadas com Água (0,61 ng/mg). A cultivar Dowling apresentou o maior aumento na concentração da malonil glicitina nas plantas tratadas com Tween 20 (7,91 ng/mg) e *cis*-Jasmone (8,33 ng/mg) em relação as plantas tratadas com Água (1,46 ng/mg). Concentrações de malonil genistina (Figura 4C) foram observadas apenas para cultivar Dowling e apresentaram aumento nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone (213,13 ng/mg) e Tween 20 (204,93 ng/mg) em relação às plantas tratadas com Água (172,31 ng/mg).

Malonil daidzina foi identificada apenas na cultivar Dowling (Figura 4A) onde observou-se aumento da concentração nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone (61,96 ng/mg) e Tween 20 (60,59 ng/mg), quando comparadas as plantas tratadas com Água (26,81 ng/mg). A concentração de malonil glicitina nas plantas tratadas com Água não apresentaram diferenças significativas (Figura 4B), entretanto, quando tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone todas as cultivares tiveram um aumento na concentração deste composto. Na cultivar BRS 134 a concentração de malonil glicitina aumentou em 5,05 ng/mg e 5,67 ng/mg nas plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone, respectivamente em relação as plantas tratadas com Água (1,32 ng/mg). Na cultivar IAC 100 apresentou um aumento da concentração de malonil glicitina nas plantas tratadas com Tween 20 (2,85 ng/mg) e *cis*-Jasmone (2,36 ng/mg) em relação às plantas tratadas com Água (0,61 ng/mg). A cultivar Dowling apresentou o maior aumento na

concentração da malonil glicitina nas plantas tratadas com Tween 20 (7,91 ng/mg) e *cis*-Jasmone (8,33 ng/mg) em relação as plantas tratadas com Água (1,46 ng/mg). Concentrações de malonil genistina (Figura 4C) foram observadas apenas para cultivar Dowling e apresentaram aumento nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone (213,13 ng/mg) e Tween 20 (204,93 ng/mg) em relação às plantas tratadas com Água (172,31 ng/mg).

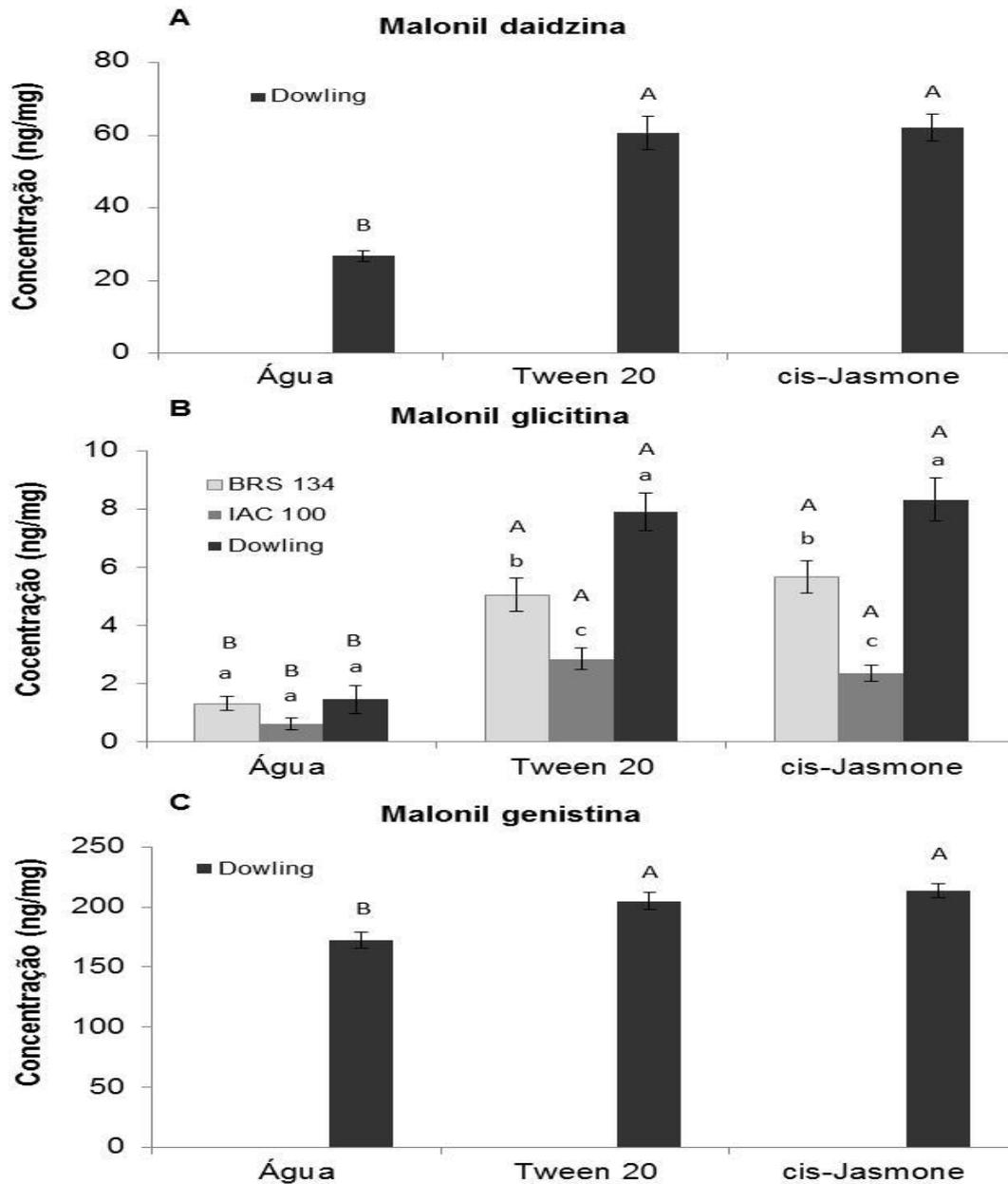


Figura 4. Concentração de malonil daidzina (A), malonil glicitina (B) e malonil genistina (C) nas folhas das cultivares BRS 134, IAC 100 e Dowling tratados com pulverização foliar dos tratamentos Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. Comparação das cultivares dentro de cada tratamento (letra minúscula) e comparação de cada cultivar nos diferentes tratamentos (letra maiúscula). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Das agliconas identificadas, apenas daidzeína apresentou diferença significativa (Figura 5), cuja concentração aumentou nas plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone. A concentração de daidzeína aumentou significativamente na cultivar IAC 100 tratada com Tween 20 e *cis*-Jasmone. A aplicação do Tween 20 (0,224 ng/mg) e *cis*-Jasmone (0,555 ng/mg) induziram a produção de daidzeína na cultivar Dowling, não sendo detectada nas plantas tratadas com Água.

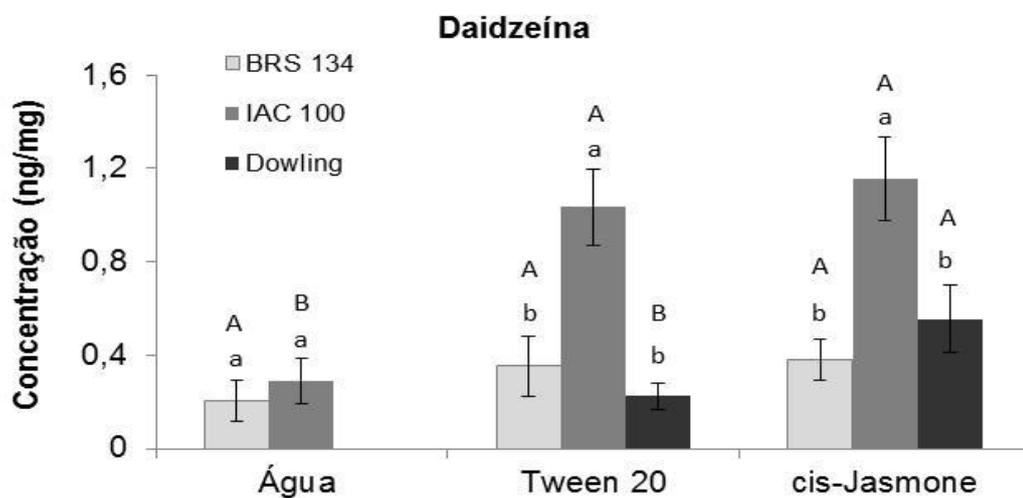


Figura 5. Concentração de daidzeína nas folhas das cultivares BRS 134, IAC 100 e Dowling tratados com pulverização foliar dos tratamentos Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. Comparação das cultivares dentro de cada tratamento (letra minúscula) e comparação de cada cultivar nos diferentes tratamentos (letra maiúscula). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na Figura 6 são apresentadas as curvas de regressão relacionadas à interação genótipo x tempo. Devido à complexidade para explicar biologicamente a resposta das concentrações das substâncias por meio de análise de regressão de grau cúbico, será utilizada apenas as regressões nos níveis lineares e quadráticos quando significativos. Por causa da falta de informação na literatura e por ser inédito os dados obtidos em relação à produção de compostos secundários de plantas de soja após a aplicação do *cis*-Jasmone foram apresentadas as regressões com R^2 mesmo com valores inferiores

a $R^2=0,50$. Malonil daidzina só ocorreu em folhas de Dowling (Figura 6A) e a sua concentração respondeu de forma linear. O modelo ajustado para a concentração de malonil glicitina (Figura 6B) nas cultivares IAC 100 e Dowling foi linear, com redução ao longo do tempo nas duas cultivares. Para a concentração de malonil genistina (Figura 6C) a resposta foi quadrática em Dowling, com um pico em 96 horas, diminuindo, na sequência, até próximo aos níveis anteriores. A concentração de daidzeína teve ajuste linear e quadrático (Figura 6D) em folhas das cultivares BRS 134 e IAC 100, respectivamente. Na cultivar BRS 134, concentrações de daidzeína foram reduzidas a zero em 144 horas, enquanto que na cultivar IAC 100 houve uma redução até 96 horas, e aumento em 120 horas e 144 horas.

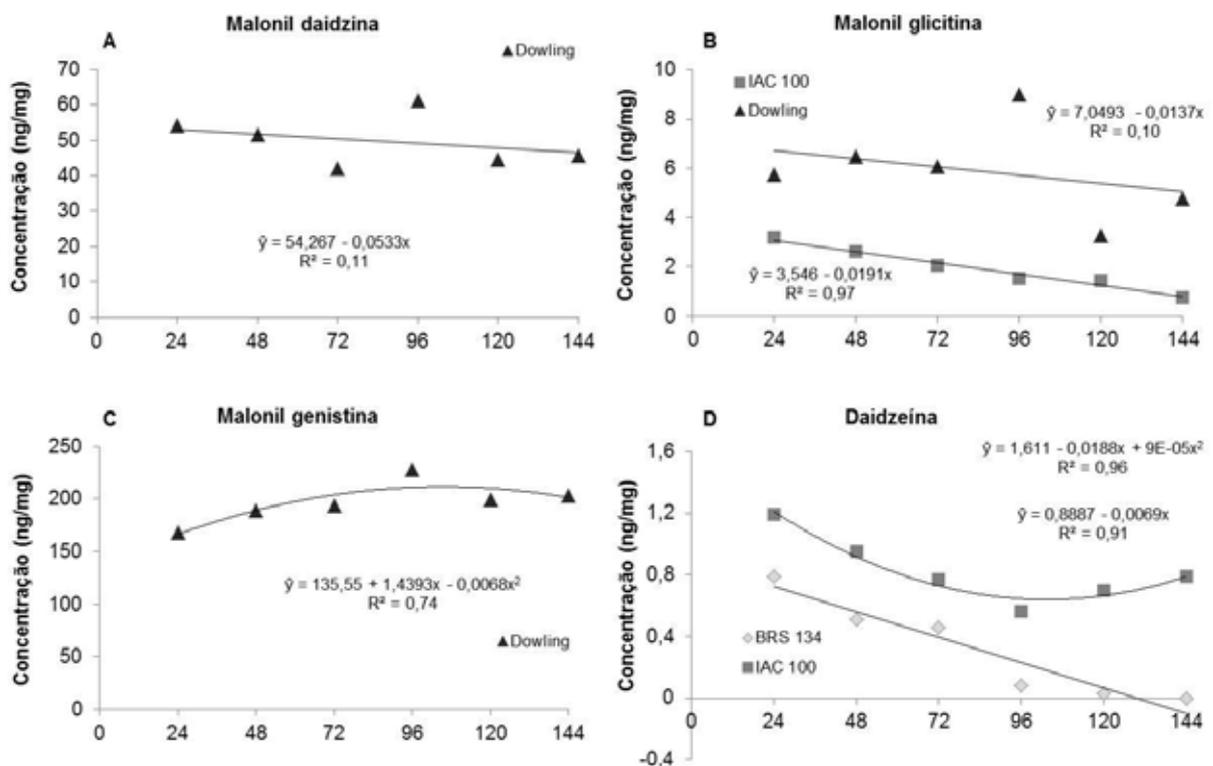


Figura 6. Concentrações de malonil daidzina (A), malonil glicitina (B), malonil genistina (C) e daidzeína (D) em folhas de plantas tratadas com pulverização foliar dos diferentes tratamentos. Análise de Regressão polinomial para os níveis de hora dentro de genótipo.

Na Figura 7, são apresentadas as curvas de regressão relacionadas à interação tratamento x tempo. As respostas para concentração de rutina (Figura 7A) foi quadrática para as plantas tratadas com Tween 20 com aumento até 96 horas e redução na concentração em 120 e 144 horas. Nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone o ajuste foi linear com redução da concentração do flavonoide ao longo do período experimental. A concentração de malonil glicitina (Figura 7B) apresentou ajuste quadrático para as plantas tratadas com Tween 20 e linear para as plantas tratadas com *cis*-Jasmone. Em ambos os tratamentos, a concentração de malonil glicitina foi reduzida no tempo. As concentrações de gliciteína (Figura 7C) tiveram ajuste quadrático (Água e *cis*-Jasmone) e linear (Tween 20). De modo geral, plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone apresentaram aumento da concentração de gliciteína, em comparação com as plantas tratadas com Água. Concentrações de genisteína (7D) apresentaram ajuste linear para as plantas tratadas com Água, enquanto que as plantas tratadas com *cis*-Jasmone apresentaram ajuste quadrático com redução da concentração após 48 horas e aumento em 144 horas. A fitoalexina coumestrol (Figura 7E) aumentou a sua concentração no tempo, apresentando ajuste quadrático para as plantas tratadas com Tween 20, com aumento acentuado em 96 horas; resposta linear foi observada para as plantas tratadas com *cis*-Jasmone com aumento da concentração ao longo do tempo.

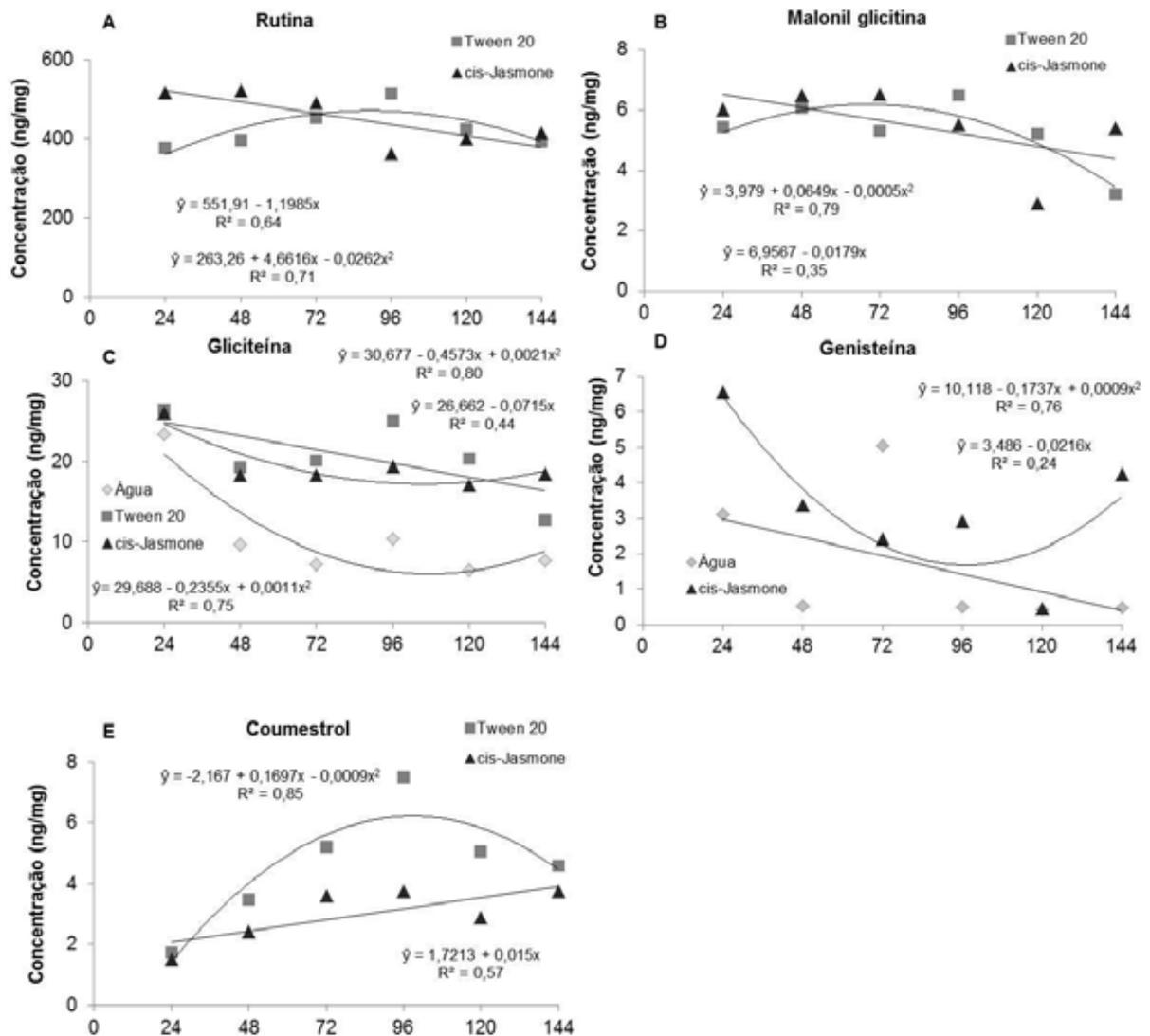


Figura 7. Concentrações de rutina (A), malonil glicitina (B), gliciteína (C), genisteína (D) e coumestrol (E) em folhas de plantas tratadas com pulverização foliar de Água, Tween 20 e *cis*-Jasmone. Análise de Regressão polinomial para os níveis de hora dentro de tratamento.

3.4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos extratos foliares demonstram que aplicação exógena do Tween 20 e *cis*-Jasmone provocaram alterações no metabolismo das plantas que afetaram diretamente a biologia do inseto. *cis*-Jasmone é conhecido por apresentar

ativação de defesas diretas e indiretas nas plantas (PICKETT et al., 2007; MATTHES et al., 2010). Na soja a aplicação do *cis*-Jasmone inclui desde a indução de compostos voláteis pela planta, assim como na atração de inimigos naturais como parasitoides de ovos (MORAES et al., 2009). Nesse experimento a pulverização foliar induziu defesas diretas, como a produção de metabólitos secundários em soja que reduziram o peso de *A. gemmatalis* nas plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone. A resposta observada nas plantas tratadas com Tween 20 pode ser atribuída a sua composição química que entre outras substâncias apresenta uma maior concentração do ácido láurico (MITTENDORF et al., 1999), um composto isolado da secreção higroscópica de *Forcipomyia nigra* e com atividade antimicrobiana (URBANEK et al., 2012). Segundo HUNZICKER (2009) o Tween 20 pode alterar a composição de transcritos em *Arabidopsis* com características semelhantes aos padrões moleculares associados aos patógenos em repostas de defesa.

Desta forma, a indução de resistência de plantas de soja tratadas com Tween 20 foi relacionada ao estímulo de substâncias do metabolismo secundário da planta e seu efeito na redução do peso do inseto, devido ao aumento da produção de compostos como gliciteína, coumestrol e rutina. A rutina, genistina e coumestrol, identificados tanto nas plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone (Trat x Temp), são compostos, conhecido por atuar negativamente no desenvolvimento e biologia de lagartas como *A. gemmatalis* (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006; SALVADOR et al., 2010) e *Pseudoplusia includens* (ROSE et al., 1988).

A forma como o *cis*-Jasmone desempenha a indução de resistência em *Triticum aestivum* indicam uma menor suscetibilidade das plântulas e uma redução na taxa da população do afídeo *Sitobion avenae* (BRUCE et al., 2003) e também no acúmulo de substâncias do metabolismo secundário com a capacidade de afetar o desenvolvimento de pragas e doenças (MORAES et al., 2008). A participação dos jasmonatos na defesa de plantas contra pragas (KOO & HOWE, 2009) foi observada em plantas de *Nicotiana attenuata* com genes da via dos jasmonatos silenciados, onde demonstraram que estas plantas se tornaram suscetíveis ao ataque de larvas de *Manduca sexta*, devido à

alteração do metabolismo secundário da planta, sendo a resistência a herbívoros restabelecida pela aplicação de metil jasmonato (KESSLER et al., 2004).

O *cis*-Jasmone pode induzir a produção de semioquímicos em plantas que são capazes de afetar o desenvolvimento de pragas (MORAES et al., 2008). Em nossos experimentos, os isoflavonoides aumentaram suas concentrações na soja devido à aplicação do Tween 20 e *cis*-Jasmone, principalmente dos compostos malonil daidzina, malonil glicetina, malonil genistina e daidzeína (Gen x Trat).

Em *Glycine soja* a daidzeína foi o isoflavonoide mais abundante e que também inibiu o crescimento de larvas de *Spodoptera litura*, relacionado como um componente da defesa constitutiva contra pragas (ZHOU et al., 2011). Na soja, compostos como a aglicona daidzeína e coumestrol exibiram efeito de antibiose e/ou antialimentar contra larvas de *Trichoplusia ni* (SHARMA & NORRIS, 1991). Em testes com escolha, *Epilachna varivestis* Mulsant preferiram discos foliares sem o isoflavonoide coumestrol (BURDEN & NORRIS, 1992). Por exemplo, a ocorrência do coumestrol e daidzeína em extratos foliares de soja foi relacionada por reduzir o consumo alimentar de *Trichoplusia ni* (NEUPANE & NORRIS, 1990), e ainda, o coumestrol foi associado na redução da biomassa de larvas e aumentar a mortalidade de *Pseudoplusia includens* (CABALLERO et al., 1986; KOGAN & PAXTON, 1991). No presente trabalho o aumento da concentração de daidzeína na cultivar IAC 100 tratada com Tween 20, e a maior concentração de coumestrol das plantas tratadas com Tween 20 (Trat x Temp) foram importantes na redução do peso de *A. gemmatilis*, considerando que a daidzeína é um precursor da síntese das fitoalexinas gliceolinas e coumestrol em plantas de soja com efeito de proteção contra pragas e doenças (ABBASI & GRAHAM, 2001; DHAUBHADEL et al., 2003).

Desta maneira, pesquisas em biotecnologia têm buscado melhorar a qualidade e produtividade das culturas (OKAZAKI & SAITO, 2012), e o estudo do metabolismo dos isoflavonoides são alvos da engenharia metabólica (DU et al., 2010; WANG, 2011). A descoberta de eliciadores químicos de respostas induzidas levou a um interesse em manipular as respostas induzíveis de plantas para a proteção de culturas (STOUT et al., 2002). Na soja os isoflavonoides são o grupo de metabólitos conhecidos por atuarem na

defesa da planta contra doenças e insetos-praga (ABBASI & GRAHAM, 2001; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006), e a aplicação de jasmonatos em plantas de soja demonstram a capacidade destes indutores em melhorar a tolerância a seca e reduzir os danos causados pelo cádmio (ANJUM et al., 2011; KERAMAT et al., 2010), e por promover o crescimento das plantas e de grãos em condições de campo (MABOOD et al., 2006). Em plantas de soja a resposta ao ataque de insetos herbívoros como *A. gemmatalis* demonstra a ativação da via das lipoxigenases, tendo como produtos desta via os jasmonatos e inibidores de protease (FORTUNATO et al., 2007).

3.5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos conclui-se que:

- O Tween 20 desencadeou a produção de compostos secundários, que atuaram diretamente na biologia da lagarta-da-soja *A. gemmatalis*, como observado nas cultivares resistentes IAC 100 e Dowling.
- As isoflavonas malonil daidzina e malonil genistina foram identificadas apenas na cultivar Dowling, tendo suas concentrações aumentadas nas plantas tratadas com Tween 20 e *cis*-Jasmone.
- A aglicona daidzeína teve sua concentração aumentada significativamente na cultivar IAC 100 tratada com Tween 20 e *cis*-Jasmone, e induzida na cultivar Dowling.
- A fitoalexina coumestrol teve sua concentração aumentada principalmente nas plantas tratadas com Tween 20, mais do que nas plantas tratadas com *cis*-Jasmone.
- Além da importância nos estudos biológicos como agente surfactante, o Tween 20 pode exercer atividade elicitora de semioquímicos em folhas de plantas de soja.

3.6. REFERÊNCIAS

- ABBASI, P. A.; GRAHAM, T. L. Age-related regulation of induced isoflavonoid responses in soybean lines differing in inherent elicitation competency. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 3, p. 143-152, 2001.
- ANJUM, S. A.; WANG, L.; FAROOQ, M.; KHAN, I.; XUE L. Methyl Jasmonate-Induced Alteration in Lipid Peroxidation, Antioxidative Defence System and Yield in Soybean Under Drought. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Singapore, v. 197, n. 4, p. 296-301, 2011.
- BIESGEN, C.; WEILER, E. W. Structure and regulation of *OPR1* and *OPR2*, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10,11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v. 208, n. 2, p. 155-165, 1999.
- BIRKETT, M. A.; CAMPBELL, C. A. M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A. J.; MARTIN, J. L.; MATTHES, M.; NAPIER, J. A.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J. A.; POPPY G. M.; POW, E. M.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS G. H.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. New roles for *cis*-Jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 16, p. 9329-9334, 2000.
- BOUGHTON, A. J.; HOOVER, K.; FELTON, G. W. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 9, p. 2211-2216, 2005.
- BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J. Plant nutrient solutions: In SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. (Eds). **Handbook for rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium technology**. Niftal Project, University of Hawaii, Hawaii, 1970. p. 245-249.
- BRUCE, T. J. A.; MARTIN, J. L.; PICKETT, J. A.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS, L. J. *cis*-Jasmone treatment induces resistance in wheat plants against the grain aphid, *Sitobion avenae* (Fabricius) (Homoptera:Aphididae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, n. 9, p.1031-1036, 2003.
- BRUCE, T. J. A.; MATTHES, M. C.; CHAMBERLAIN, K.; WOODCOCK, C. M.; MOHIB, A.; WEBSTER, B.; SMART, E. L.; BIRKETT, J. A.; NAPIER, J. A. *cis*-Jasmone induces

- Arabidopsis genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 12, p. 4553-4558, 2008.
- BURDEN, B. J.; NORRIS, D. M. Role of the isoflavonoid coumestrol in the constitutive antixenotic properties of "Davis" soybeans against an oligophagous insect, the Mexican bean beetle. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 18, n. 7, p. 1069-1081, 1992.
- CABALLERO P., SMITH C.M., FRONCZEK F.R.; FISCHER N.H. Isoflavones from an insect-resistant variety of soybean and the molecular structure of afrormosin. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 49, n. 6, p. 1126-1129, 1986.
- DHAUBHADEL, S.; MCGARVEY, B. D.; WILLIAMS, R.; GIJZEN, M. Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 53, n. 6, p. 733-743, 2003.
- DICKE, M. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 654-665, 2009.
- DU, H.; HUANG, Y.; TANG, Y. Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 5, p. 1293-1312, 2010.
- EDWARDS, O.; SINGH, K. B. Resistance to insect pests: What do legumes have to offer? **Euphytica**, Wageningen, v. 147, n.1-2, p. 273-285, 2006.
- FEHR, W.R.; CAVINESS C. E.; BURMOOD D. T.; PENNINGTON J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Madison, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.
- FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 275-297, 2002.
- FORTUNATO, F. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; BRUMANO, M. H. N.; SILVA, C. H. O.; GUEDES, R. N. C.; MOREIRA, M. A. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 80, n. 4, p. 241-247, 2007.
- HAUSE, B.; MROSK, C.; ISAYENKOV, S.; STRACK, D. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. **Phytochemistry**, New York, v. 68, n. 1, p. 101-110, 2007.

- HEGDE, M.; OLIVEIRA, J. N.; COSTA, J. G.; LOZA-REYES, E.; BLEICHER, E.; SANTANA, A. E. G.; CAULFIELD, J. C.; MAYON, P.; DEWHIRST, S. P.; BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A. Aphid antixenosis in cotton is activated by the natural plant defence elicitor *cis*-Jasmone. **Phytochemistry**, New York, v. 78, p. 81-88, 2012.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; HARBORNE, J. B.; MCCAFFERY, A. R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia nigrowth*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 98, n. 2, p. 181-194, 2001.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; RAMOS NETO, J. A.; OLIVEIRA, M. C. N. DE.; OLIVEIRA, L. J. Detrimental effect of rutin on a main soybean defoliator pest, *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 10, p. 1453-1459, 2006.
- HUNZICKER, G. M. A novel regulatory system in plants involving médium-chain fatty acids. **Planta**, Berlin, v. 231, n. 1, p. 143-153, 2009.
- KERAMAT, B.; KALANTARI, K. M.; ARVIN, M. J. Effects of methyl jasmonate treatment on alleviation of cadmium damages in soybean. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 33, n. 7, p. 1016-1025, 2010.
- KESSLER, A.; HALITSCHKE, R.; BALDWIN, I. T. Silencing the jasmonate cascade: Induced plant defense and insect populations. **Science**, Champaign, v. 305, n. 5684, p. 665-668, 2004.
- KOGAN, M.; FISCHER, D. C. Inducible defenses in soybean against herbivorous insects. In: TALLAMY D. W.; RAUPP, M. J. (Eds), **Phytochemical induction by herbivores**. New York: Wiley, 1991. p 347-378.
- KOO, A. J. K.; HOWE, G. A. The wound hormone jasmonate. **Phytochemistry**, New York, v. 70, n. 13-14, p. 1571-1580, 2009.
- LI, Y.; ZOU, J.; LI, M.; BILGIN, D. D.; VODKIN, L. O.; HARTMAN, G. L.; CLOUGH, S. J. Soybean defense responses to the soybean aphid. **New Phytologist**, Cambridge, v. 179, n. 1, p. 185-195, 2008.
- LOURENÇÃO, A. L.; PEREIRA, J. C. V. N. A.; MIRANDA, M. A. C.; AMBROSANO, G. M. B. Avaliação de danos causados por percevejos e por lagartas em genótipos de soja

- de ciclos precoce e semiprecoce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v. 35, p. 879-886, 2000.
- MABOOD, F.; ZHOU, X.; LEE, K. D.; SMITH, D. L. Methyl jasmonate, alone or in combination with genistein, and *Bradyrhizobium japonicum* increases soybean (*Glycine max* L.) plant dry matter production and grain yield under short season conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 95, n. 2-3, p. 412-419, 2006.
- MATTHES, M. C.; BRUCE, T. J. A.; TON, J.; VERRIER, P. J.; PICKETT, J. A.; NAPIER, J. A. The transcriptome of *cis*-Jasmone-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence. **Planta**, Berlin, v. 232, n. 5, p. 1163-1180, 2010.
- MITTENDORF, V.; BONGCAM, V.; ALLENBACH, L.; COULLEREZ, G.; MARTINI, N. POIRIER. Polyhydroxyalkanoate synthesis in transgenic plants as a new tool to study carbon flow through β -oxidation. **The Plant Journal**, Oxford, v.20, n. 1, p. 45-55, 1999.
- MORAES, M. C. B.; BIRKETT, M. A.; GORDON-WEEKS, R.; SMART, L. E.; MARTIN, J. L.; PYE, B. J.; BROMILOW, R.; PICKETT, J. A. *cis*-Jasmone induces accumulation of defence compounds in wheat, *Triticum aestivum*. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 1, p. 9-17, 2008.
- MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PAREJA, M.; SERENO, F. T. P. S.; MICHEREFF, M. F. F.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-Jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 131, n. 2, p. 178-188, 2009.
- NEUPANE F. P.; NORRIS D. M. Iodoacetic acid alteration of soybean resistance to the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, n. 2, p. 215–221, 1990.
- OKAZAKI, Y.; SAITO, K. Recent advances of metabolomics in plant biotechnology. **Plant Biotechnology Reports**, Tokyo, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2012.
- PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; MORAES, M. C. B.; BRUCE, T. J. A.; CHAMBERLAIN, K.; GORDON-WEEKS, R.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; SMART, L. E.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. *cis*-Jasmone as allelopathic agent in inducing plant defence. **Allelopathy Journal**, Hisar, v. 19, n. 1, p. 109-118, 2007.

- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. de. Are chemical compounds importante for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 7, p. 1509-1525, 2005.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; FRANCHINI, J. C.; LARA, F. M. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its affect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, n. 5, p. 1223-1233, 2003.
- ROSE, R. L.; SPARKS, T. C.; SMITH, M. C. Insecticide Toxicity to the Soybean Looper and the Velvetbean Caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) as Influenced by Feeding on Resistant Soybean (PI 227687) Leaves and Coumestrol. **Journal of Economy Entomology**, Lanham, v. 81, n. 5, p. 1288-1294, 1988.
- SALVADOR, M. C.; BOIÇA JR, A. L.; OLIVEIRA, M. C. N.; GRAÇA, J. P.; SILVA, D. M.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)? **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 5, p. 774-783, 2010.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT: User's Guide: Statistics, Version 9.2**. Cary: SAS Institute, NC: Statistical Analysis Systems, 2009. 7869p.
- SCHALLER, A.; STINTZI, A. Jasmonate biosynthesis and signaling for induced plant defense against herbivory. In: SCHALLER, A. (Ed). **Induced Plant resistance to Herbivory**. The Netherlands: Springer Dordrecht, 2008. p. 349-366.
- SHARMA, H. C.; NORRIS, D. M. Chemical basis of resistance in soybean to cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 55, n. 3, p. 353-364, 1991.
- STOUT, M. J.; ZEHNDER, G. W.; BAUR, M. E. Potential for the Use of Elicitors of Plant Resistance in Arthropod Management Programs. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 51, n. 4, p. 222–235, 2002.
- TANI, T.; SOBAJIMA, H.; OKADA, K.; CHUJO, T.; ARIMURA, S.; TSUTSUMI, N.; NISHIMURA, M.; SETO, H.; NOJIRI, H.; YAMANE, H. Identification of the *OsOPR7*

- gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. **Planta**, Berlin, v. 227, n. 3, p. 517-526, 2008.
- THALER, J. S. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. **Nature**, London, v. 399, n. 6737, p. 686-688, 1999.
- THALER, J. S.; FARAG, M. A.; PARÉ, P. W.; DICKE, M. Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defences against herbivores. **Ecology Letters**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 764-774, 2002.
- URBANEK, A.; SZADZIEWSKI, R.; STEPNOWSKI, P.; BOROS-MAJEWSKA, J.; GABRIEL, I.; DAWGUL, M.; KAMYSZ, W.; SOSNOWSKA, D.; GOLEBIOWSKI, M. Composition and antimicrobial activity of fatty acids detected in the hygroscopic secretion collected from the secretory setae of larvae of the biting midge *Forcipomyia nigra* (Diptera: Ceratopogonidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 1265-1276, 2012.
- WANG, X. Structure, function, and engineering of enzymes in isoflavonoid biosynthesis. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 11, n. 1, p. 13-22, 2011.
- WANG, H.; MA, C.; LI, Z.; MA, L.; WANG, H.; YE, H.; XU, G.; LIU, B. Effects of exogenous methyljasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, Maastricht, v. 31, n. 2, p. 214-218, 2010.
- ZHOU, Y. Y.; LUO, S. H.; YI, T. S.; LI, C. H.; LUO, Q.; HUA, J.; LIU, Y.; LI, S. H. Secondary Metabolites from glycine soja and their growth inhibitory effect against *Spodoptera litura*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 11, p. 6004-6010, 2011.
- ZHU, Z.; TIAN, S.; Resistant responses of tomato fruit treated with exogenous methyl jasmonate to *Botrytis cinerea* infection. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 142, n. 13, p. 38-43, 2012.
- ZONTA, E.P., MACHADO, A. A., SILVEIRA JÚNIOR, P. **Sistema de Análise Estatística - SANEST**, Registro na SEI No. 066060, UFPEL, Pelotas, 1982. 63p.

