



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Estudo bioquímico da soja em defesa induzida pela
herbivoria do percevejo-marrom *Euchistus heros*
(Heteroptera: Pentatomidae)**

Renata Velôzo Timbó

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima

Brasília, 2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Estudo bioquímico da soja em defesa induzida pela
herbivoria do percevejo-marrom *Euchistus heros*
(Heteroptera: Pentatomidae)**

Renata Velôzo Timbó

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima

Co-orientação: Dra. Débora Pires Paula

**Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília, como requisito à
obtenção do grau de mestre em Biologia Molecular.**

Brasília, 2013

*“Tudo o que é necessário para o triunfo
do mal é que os bons nada façam.”*

Edmund Burke

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que eu tivesse saúde e força para percorrer esse trajeto!

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima pela oportunidade, confiança, apoio e atenção durante todo o tempo de desenvolvimento desse projeto e por demonstrar tanta paixão e força para defender seus ideais, sem se deixar abalar por qualquer coisa.

À minha co-orientadora Dra. Débora Pires Paula por sempre acreditar no meu potencial, pelo apoio, carinho e amizade, sem os quais não conseguiria conquistar tantos objetivos. Uma grande mulher, batalhadora, apaixonada pela pesquisa, questionadora e incentivadora. Obrigada por todas as oportunidades que me destes, desde um simples estágio ao incentivo para estudar para ser mestre em Biologia Molecular. És uma pessoa especial e que tive sorte por tê-la encontrado!

Aos pesquisadores Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes, Dr. Miguel Borges e Dr. Raul A. Laumann, pela ajuda com o plantio da soja e sugestões para montagem dos bioensaios, e à toda equipe de Ecologia Química da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), pelo apoio e ajuda com a manutenção da colônia de insetos *Euschistus heros*, sem os quais esse projeto não aconteceria.

À pesquisadora Clara Beatriz Hoffmann-Campo por nos ceder as sementes de soja utilizadas durante o mestrado.

Aos pesquisadores Dra. Ângela Mehta e Dr. Luciano Paulino Silva, pela ajuda, apoio e confiança ao permitirem que eu fizesse parte do grupo de pesquisa e por incentivarem nesse grande passo que é o mestrado.

Aos meus pais, Maria Darque Velôzo Timbó e Francisco Parente Timbó, que sempre apoiaram e me estimularam a sempre querer mais e, nunca deixar que eu desistisse dos meus sonhos e objetivos; pelo amor incondicional e por serem pessoas tão maravilhosas e boas, o que me deixam orgulhosa de poder dizer que faço parte dessa família.

Ao meu irmão Juan Velôzo Timbó, que sempre demonstrou uma força fora do comum, que mesmo após grandes batalhas se reerguia com mais coragem e determinação do que nunca e, me ensinou a superar toda e qualquer discriminação. Que mesmo de um jeito

torto e engraçado, nunca deixou que nada de mau me acontecesse, se tornando um exemplo de pessoa e irmão!!!

Às minhas amigas Luciana Ramalho, Gabriela Villeth, Lilian Travassos, Carla Caixeta e Lunalva Pedroso por me ajudarem em muitos momentos e por me proporcionarem momentos maravilhosos, cheios risos e descontração quando eu mais precisava, principalmente por me aturarem nos dias de estresse e nervosismo.

Ao meu amigo e prof. Dr. Paulo Roberto Queiroz pelo apoio, ajuda e troca de experiências desde a graduação.

Ao meu amigo Rafael Burtet por ter me apoiado e incentivado a procurar um novo estágio, o que acabou se transformando em um mestrado.

Ao amigo Daniel Carneiro, pelo apoio, ajuda e por compartilhar todo seu conhecimento nos experimentos de estresse oxidativo!

Ao prof. Demerson Poli (UnB), pelos ensinamentos na área de análises de dados, mais precisamente, com o programa de estatística R!

Aos amigos da UnB e do Cenargen que de uma forma ou de outra sempre estiveram ao meu lado durante essa trajetória.

À Universidade de Brasília (UnB) pela oportunidade e qualidade no ensino!

À Embrapa Cenargen pela oportunidade e confiança para o desenvolvimento desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de estudo e à FAP-DF pela concessão de diárias para participação de congresso.

Muito Obrigada!

Índice Geral

Lista de Figuras	iii
Lista de Quadros	v
Lista de Tabelas	v
Abreviações	vi
Resumo	vii
Abstract.....	viii
1 Introdução.....	01
2 Revisão bibliográfica.....	03
2.1 Soja.....	03
2.2 Percevejo-marrom	04
2.3 Defesa vegetal	06
2.3.1 Defesa direta	08
2.3.2 Defesa indireta.....	10
2.3.3 Tolerância vegetal.....	10
2.4 Estresse oxidativo.....	11
2.4.1 Enzimas envolvidas no processo redox	13
1. Guaiacol Peroxidase	14
2. Ascorbato Peroxidase	14
3. Glutathiona Peroxidase	16
4. Catalase	16
5. Superóxido Dismutase.....	16
6. Lipoxigenases.....	17
2.5 Proteômica.....	18
3 Objetivos.....	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 Material e Métodos.....	23
4.1 Cultivo da soja.....	23
4.2 Criação do percevejo-marrom	24
4.3 Bioensaio de herbivoria.....	25
4.4 Estudo do estresse oxidativo relacionado à defesa contra herbivoria.....	26

4.4.1	Preparo do homogenato para ensaios de atividade enzimática.....	26
4.4.2	Ensaio de atividade enzimática.....	26
4.5	Estudo do perfil protéico da soja com e sem herbivoria do percevejo-marrom.....	27
4.5.1	Eletroforese Bidimensional e espectrometria de massas.....	28
4.5.1.1	Extração protéica total	28
4.5.1.2	Ressolubilização protéica.....	30
4.5.1.3	Quantificação protéica	31
4.5.1.4	Reidratação das <i>strips</i>	31
4.5.1.5	Focalização isoeletrica	32
4.5.1.6	Redução e alquilação das <i>strips</i>	32
4.5.1.7	Eletroforese bidimensional	33
4.5.1.8	Digestão em gel com tripsina.....	33
4.5.1.9	Espectrometria de massas	35
5	Resultados.....	36
5.1	Atividades enzimáticas	36
5.1.1	Variedade Silvânia	36
5.1.2	Variedade IAC-100	38
5.2	Proteômica.....	40
5.2.1	Comparação entre as extrações protéicas	40
5.2.2	Comparação entre os tempos de herbivoria	42
5.2.3	Eletroforese bidimensional.....	44
5.2.3.1	Análise da soja variedade Silvânia	44
5.2.3.2	Análise da soja variedade IAC-100	49
6.	Discussão.....	53
6.1	Atividade enzimática.....	53
6.2	Perfil proteômico em função da herbivoria.....	57
7.	Conclusão	65
	Referência Bibliográfica.....	66
	Anexo 1	80
	Anexo 2	81

Lista de Figuras

Figura 1. Percevejo-marrom adulto alimentando-se de diferentes partes da planta de soja.....	05
Fig. 2. Fenologia dos percevejos-praga da soja no norte do Paraná	06
Fig. 3. Vias de sinalização que desencadeiam o sistema de defesa direta e/ou indireta vegetal	07
Fig. 4. Funções das peroxidases	14
Fig. 5. Ciclo da glutathiona-ascorbato	15
Fig. 6. Formação do ácido jasmônico.....	18
Fig. 7. Etapas da análise proteômica	21
Fig. 8. Planta de soja em estágio V3 apresentando total separação da segunda folha trifoliolada	24
Fig. 9. Plantas de soja V3 mantidas em câmaras de germinação	25
Fig. 10. Avaliação temporal da atividade da enzima catalase em folhas de soja variedade Silvânia em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom	36
Fig. 11. Avaliação temporal da atividade da enzima guaiacol peroxidase em folhas de soja variedade Silvânia em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom.....	37
Fig. 12. Avaliação temporal da atividade da enzima ascorbato peroxidase em folhas de soja variedade Silvânia em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom.....	37
Fig. 13. Avaliação temporal da atividade da enzima lipoxigenase 3 em folhas de soja variedade Silvânia em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom.....	38
Fig. 14. Avaliação temporal da atividade da enzima catalase em folhas de soja variedade IAC-100 em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom.....	38
Fig. 15. Avaliação temporal da atividade da enzima guaiacol peroxidase em folhas de soja variedade IAC-100 em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom.....	39
Fig. 16. Avaliação temporal da atividade da enzima ascorbato peroxidase em folhas de soja variedade IAC-100 em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom.....	39
Fig. 17. Avaliação temporal da atividade da enzima lipoxigenase 3 em folhas de soja variedade IAC-100 em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom.....	39

Fig. 18. Comparação quanto a eficiência de eliminação de DNA genômico da extração protéica total pelos métodos de TCA/acetona e por fenol	41
Fig. 19. Comparação quanto ao número de bandas entre os métodos de extração protéica total por TCA/acetona e por fenol	42
Fig. 20. Perfil proteico foliar da variedade de soja Silvânia, em intervalos de 24 a 96 h, sem e com injúria de herbivoria pelo percevejo-marrom.....	43
Fig. 21. Perfil proteico foliar da variedade de soja IAC-100, em intervalos de 24 a 96 h, sem e com injúria de herbivoria pelo percevejo-marrom.....	43
Fig. 22. Normalização da extração protéica total foliar da variedade Silvânia	44
Fig. 23. Gel Bidimensional do perfil protéico foliar da variedade de soja Silvânia em estágio V3.....	45
Fig. 24. Proteínas com níveis diferenciais expressas em folhas da variedade de soja Silvânia em estágio V3 sob injúria do percevejo-marrom.....	46
Fig. 25. Normalização da extração protéica total foliar da variedade IAC-100	49
Fig. 26. Gel Bidimensional do perfil protéico foliar da variedade de soja variedade IAC-100 em estágio V3	50
Fig. 27. Proteínas com níveis diferenciais expressas em folhas da variedade de soja variedade IAC-100 em estágio V3 sob injúria do percevejo-marrom.....	51
Fig. 28. Resumo das três fases do ciclo de Calvin	62
Fig. 29. Resumo da biossíntese de compostos fenólicos	63

Lista de quadros

Quadro 1. Ensaio da atividade enzimática foliar das variedades de soja Silvânia e IAC-100 em estágio V3 com e sem herbivoria do percevejo-marrom.....	27
Quadro 2. Etapas da focalização isoelétrica a 20°C	32
Quadro 3. Etapas da eletroforese SDS-PAGE 12,5% a 25°C	33
Quadro 4. Resumo das enzimas estudadas nos artigos aqui citados	57

Lista de tabelas

Tabela 1. Comparação entre as atividades enzimáticas do grupo sem injúria das sojas variedades Silvânia e IAC-100.	40
Tabela 2. Massa, concentração protéica total e e número de bandas obtidas pelos métodos de extração TCA/acetona e fenol	41
Tabela 3. Número de bandas e concentração protéica obtidos pelos métodos de extração proteica de extração TCA/acetona e fenol em folhas de soja variedade Silvânia em estágio V3	43
Tabela 4. Identificação das proteínas com níveis diferenciais de expressão devido à herbivoria do percevejo-marrom em folhas de soja variedade Silvânia em estágio V3, após fracionamento por eletroforese bidimensional e sequenciamento por espectrometria de massas (MALDI-TOF), utilizando-se os programas Mascot e BLASTp, por MS/MS	47
Tabela 5. Identificação das proteínas com níveis diferenciais de expressão devido à herbivoria do percevejo-marrom em folhas de soja variedade IAC-100 em estágio V3, após fracionamento por eletroforese bidimensional e sequenciamento por espectrometria de massas (MALDI-TOF), utilizando-se os programas Mascot e BLASTp por MS/MS.....	52

Lista de Abreviaturas e Siglas

AA – ácido ascórbico

APX – ascorbato peroxidase

ABA – ácido abscísico

BOD – câmara de germinação

BSA – albumina de soro bovino

$C_6H_{12}O_6$ – glicose

CAT – catalase

CHAPS – 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato

CO_2 – dióxido de carbono

CPAC – Embrapa Cerrados

CuZn-SOD – superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

DAO – diamino oxidase

DHA – dehidroascorbato redutase

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

E. heros – *Euschistus heros*

ESI-MS – ionização por eletrospray

EROS – espécies reativas de oxigênio

FeSOD – superóxido dismutase dependente de ferro

GPx – guaiacol peroxidase

GR – glutathione redutase

GRP – proteína rica em glicina ligante de RNA

GSH – glutathione reduzida

GSSG – glutathione oxidada

H_2O – água

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

h – hora(s)

ha – hectare(s)

HCl – ácido clorídrico

HO₂[•] – radical hidroperoxil

HOCl – ácido hipocloroso

HR – resposta de hipersensibilidade

H. zea – *Helicoverpa zea*

IP – inibidor de protease

JA – ácido jasmônico

KPi – fosfato de potássio

kWh – unidade de potência quilo Watts/hora

LA – ácido linoléico

LeA – ácido linolênico

LOX – lipoxigenase

LOX 1 – lipoxigenase isoforma 1

LOX 3 – lipoxigenase isoforma 3

M – molar

mA – miliampere

MALDI-MS – espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MEP – rota do metileritritol fosfato

MJ – metil jasmonato

mM – milimolar

µg – micrograma

MgCl₂ – cloreto de magnésio

min – minuto

MnSOD – superóxido dependente de manganês

MS – espectrometria de massas

m/z – relação massa carga

NaCl – cloreto de sódio

NCBI- National Center for Biotechnology Information

ng – nanograma

NL – não linear
nm – nanômetro
O₂ – oxigênio
¹O₂ – oxigênio singlete
O₂^{•-} – superóxido
O₃ – ozônio
OH[•] – hidroxil
ONOO⁻ – peroxinitrito
OPDA – ácido 12-oxo-fitodienóico
pH – potencial hidrogeniônico
PMF – *peptide mass fingerprinting*
PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonila
POD – peroxidase
PPO – polifenol oxidase
Prxs – peroxireodixinas
PUFA – hidroperóxidos
RO[•] – alquoxil
RO₂[•] – peroxil
SDS-PAGE – gel de poliacrilamida desnaturante
SOD – superóxido dismutase
TCA – ácido tricloroacético
TOF – *time of flight* (tempo de voo)
UR – umidade relativa
V3 – estágio vegetativo três
3-PGA – 3-fosfoglicerato

Resumo

Atualmente a soja é uma das culturas mais importantes para o agronegócio nacional devido aos seus múltiplos usos, e tem na região Centro-Oeste a maior produção do país. Este trabalho de mestrado visou avaliar a resposta adaptativa bioquímica de duas variedades de soja sob herbivoria do percevejo-marrom (*Euschistus heros*), importante praga da cultura, através (i) da quantificação da atividade de determinadas enzimas do sistema antioxidante (guaiacol peroxidase, catalase, ascorbato peroxidase e lipoxigenase 3) e da (ii) identificação de enzimas envolvidas em vias metabólicas chaves através de análise proteômica. Duas variedades de soja, uma que é considerada resistente à herbivoria do percevejo (IAC-100), e outra susceptível (Silvânia) em estágio V3, foram expostas à herbivoria por 96 h, das quais as folhas foram coletadas em intervalos de 24 h. A variedade Silvânia foi a que apresentou significativa diferença na resposta antioxidante durante a herbivoria do percevejo-marrom. Exceto para a ascorbato peroxidase, todas as demais enzimas apresentaram atividade variada ao longo do tempo de herbivoria, evidenciando assim uma maior resposta ao estresse gerado pela herbivoria do percevejo-marrom. Adicionalmente, essa variedade apresentou, em média, 386 proteínas foliares totais, das quais 17 tiveram seu nível de expressão alterado quando em herbivoria. Dentre as proteínas com expressão diferenciada estão a CP4EPSPS (enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintase), a proteína rica em glicina do tipo 2b, e as chaperonas de 20 e 70 kDa. A variedade IAC-100 não apresentou modificações nas atividades das enzimas antioxidantes estudadas e apresentou em média 191 proteínas foliares totais, das quais 10 tiveram seu nível de expressão alterado em função da herbivoria - foram identificadas a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a enzima rubisco. A interpretação da função das proteínas diferencialmente expressas, aliada aos resultados do sistema de defesa antioxidante, possibilitou compreender melhor os mecanismos bioquímicos de resistência/susceptibilidade nas duas variedades de soja, assim como dar maior embasamento à proposta de que a IAC-100 é mais resistente à herbivoria do percevejo-marrom.

Palavras-chave: soja; percevejo-marrom; herbivoria; defesa vegetal.

Abstract

Currently soy is one of the most important crops for agribusiness because of its multiple uses, and has in the Midwest the biggest production of the country. This master thesis was to evaluate the biochemical adaptive response of two soybean varieties under herbivory brown stink bug (*Euschistus heros*), an important pest of culture through (i) the quantification of the activity of certain enzymes of the antioxidant system (guaiacol peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase and lipoxygenase 3) and (ii) identification of enzymes involved in key metabolic pathways through proteomic analysis. Two soybean varieties, one that is considered resistant to herbivory stink bug (IAC-100), and another susceptible (Silvânia) V3 stage were exposed to herbivory by 96 h, the leaves of which were collected at intervals of 24 h. The variety Silvânia showed the significant difference in antioxidant response during herbivory brown stink bug. Except for ascorbate peroxidase, all other enzymes showed activity varied over time from herbivory, thus revealing a greater stress response generated by herbivory of the brown stink bug. Additionally, the variety show, in average, 386 total leaf proteins, of which 17 had their expression level changed when herbivory. Among the proteins with differential expression are CP4EPSPS (enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase), glycine-rich protein 2b-like, and chaperones 20 and 70 kDa. IAC-100 showed no changes in the activities of antioxidant enzymes studied and showed an average of 191 total leaf proteins, of which 10 had their expression level changed depending on herbivores - were identified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the enzyme rubisco. The interpretation of the function of differentially expressed proteins, coupled with the results of the antioxidant defense system, enabled a better understanding of the biochemical mechanisms of resistance / susceptibility in two soybean varieties, as well as giving greater basis for the proposal that the IAC-100 is more resistant herbivory of the brown stink bug.

Keywords: brown stink bug, herbivory, plant defense

1. Introdução

A soja é uma cultura de grande importância socioeconômica devido a seus múltiplos usos, cuja demanda internacional aumentará progressivamente (Campos, 2010). A continuidade do incremento de produção da soja no país não deveria ocorrer pelo aumento da fronteira agrícola, mas graças ao avanço técnico-científico no controle de pragas e, portanto, na redução do uso de insumos agrícolas. No contexto da demanda mundial por um sistema agrícola mais sustentável e eficiente, o uso da defesa natural vegetal aliado ao controle biológico apresenta-se como uma solução alternativa muito promissora para o incremento de produtividade.

Os percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) são uma das pragas mais importantes da soja no Brasil. Pentatomídeos fitófagos se alimentam em várias estruturas da planta hospedeira, sendo que sementes e frutas imaturas são os principais sítios de alimentação. Ao se alimentarem dos grãos afetam sua qualidade e até afetar o desenvolvimento e amadurecimento das vagens. O percevejo-marrom *Euschistus heros*, dentre os sugadores pragas da soja, é hoje o mais abundante e tem a soja como seu hospedeiro principal. Adaptado às regiões mais quentes, é mais abundante do Norte do Estado do Paraná ao Centro-Oeste Brasileiro (Corrêa-Ferreira & Panizzi, 1999; Fernandes, 2000; Todd & Herzog, 1980).

As plantas possuem duas importantes estratégias de defesa contra injúrias provocadas pela alimentação de herbívoros: (i) a defesa direta, onde os insetos são afetados diretamente pelas plantas, envolvendo tanto a parte física e estrutural da planta (espinhos, tricomonas, cor, textura), como a parte química com a produção de metabólitos primários [aminoácidos, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos] e metabólitos secundários não voláteis (como ácidos fenólicos, ácidos hidroxâmicos entre outros) (Bi *et al.*, 1997; Baldwin *et al.*, 2001); e (ii) a defesa indireta, em que há a produção de metabólitos secundários voláteis que são capazes de atrair inimigos naturais (predadores e parasitóides) ou atuar como repelentes (Dicke & Hilker, 2003; Courtois *et al.* 2009). A defesa vegetal, tanto a direta quanto a indireta, é específica, variando entre as espécies e variedades vegetais e diretamente relacionadas ao tipo de agente estressor (Baldwin *et al.*, 2001).

Os estudos bioquímicos sobre defesa vegetal tem se concentrado em avaliar a resposta antioxidante e em elucidar as proteínas que participam do processo. Bi *et al.* (1994) revelaram que injúrias causadas pelo lepidóptero *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) em soja induz respostas que envolvem a produção de compostos primários, metabólitos secundários não voláteis e a produção de espécies reativas de oxigênio. Jacobs *et al.* (2000) mencionaram que o metabolismo secundário de plantas em defesa indireta pode ser acessado através do estudo proteômico comparativo entre variedades susceptíveis e resistentes, tornando-se possível identificar as principais proteínas envolvidas no processo de herbivoria.

Apesar da grande importância mundial da cultura da soja, não existem relatos de estudos da resposta ao estresse oxidativo associados aos estudos das rotas metabólicas que participam do processo de defesa contra herbivoria de percevejos. Tendo em vista a importância de levantar conhecimentos sobre o mecanismo de defesa em soja contra herbivoria do percevejo-marrom, o presente trabalho visou realizar o estudo da atividade antioxidante e mapear as rotas metabólicas envolvidas na defesa de duas variedades de soja, Silvânia e IAC-100. Os conhecimentos obtidos nesse trabalho poderão subsidiar a implementação de novas estratégias para manejo mais eficiente da praga.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Soja

A soja comercial (*Glycine max*) é uma planta herbácea, da classe Dicotyledoneae e família Leguminosae, tendo como centro de origem a China. Seu ciclo fenológico pode ser dividido em vegetativo, que compreende desde o surgimento da plântula até o surgimento das primeiras flores (60 dias em média), e reprodutivo, que inicia na floração até a produção de grãos e senescência (80 dias em média). A duração do ciclo da cultura no Brasil é diversificada, podendo durar de 100 a 160 dias, dependendo da região de cultivo e da variedade cultivada, o que permite que os cultivares sejam classificados em grupos de maturação precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio (Borém, 2005; Gomes, 1990). A época de plantio está associada ao

início do período chuvoso e, portanto, varia entre as diferentes regiões do Brasil (Cunha *et al.*, 2001; Silva Neto & Silva, 2010).

O primeiro cultivo de soja no Brasil foi feito em Santa Rosa (Rio Grande do Sul) no ano de 1914, vindo a atingir importância econômica na década de 40. Na década de 60 foi então estabelecida como cultura economicamente importante devido à política de subsídios ao trigo, que incentivou a cultura de soja como sucessora de verão do trigo, pois o aproveitamento da terra, a utilização de máquinas, implementos, a infraestrutura e a utilização da mão-de-obra, tornaram a cultura da soja como melhor opção. A produção ainda era quase exclusividade dos três Estados da Região Sul do país (Embrapa Soja, 2004).

Em 1980, a região Centro-Oeste passou a produzir 20% da produção nacional, em 1990 o percentual passou para 40%, e em 2003 chegou próximo aos 60%. Essa evolução nomeou o Estado do Mato Grosso como líder nacional de produção e produtividade de soja (Companhia Nacional de Abastecimento - Conab 2012; Embrapa Soja, 2004).

A soja é uma cultura de grande importância socioeconômica devido a seus múltiplos usos (como a produção de biodiesel, produtos alimentícios, óleo refinado, entre outros) cuja demanda nacional aumentará progressivamente (Embrapa Soja, 2004). De acordo com a Conab (2011/12), o cultivo da soja no Brasil em 2011/2012 teve crescimento de 0,7% de área quando comparado com a safra de 2010/2011, o que contribuiu para um volume de 24,35 milhões de hectares (ha), e a produção teve um aumento de 2,1%, alcançando 70,1 milhões de toneladas, e segundo previsões (Conab, 2013) o Brasil será o maior produtor mundial de soja, com uma produção de cerca de 83 milhões de toneladas.

A variedade de soja Silvânia BRS possui um ciclo médio de 123 dias, sendo assim classificada como uma variedade de ciclo semitardio (www.multigem.com.br/tabela.pdf) e faz parte de um grupo de sojas transgênicas resistentes ao herbicida glifosato (Souza, 2006).

A variedade de soja IAC-100 possui um ciclo médio de 95 dias, sendo classificada como uma variedade de ciclo precoce, e apresenta resistência à herbivoria de percevejos (Medina *et al.*, 1997; Rosseto *et al.*, 1995).

A continuidade do incremento de produção de soja no país deverá ocorrer devido ao aumento da fronteira agrícola e ao avanço técnico-científico no controle de pragas, sendo altamente desejável a redução do uso de insumos agrícolas. No contexto da demanda mundial por um sistema agrícola mais sustentável e eficiente, o uso da defesa natural vegetal apresenta-se como uma solução alternativa muito promissora para fortalecer o manejo integrado de pragas a incrementar a produtividade.

2.2 Percevejo-marrom

Os percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) e as lagartas desfolhadoras são hoje consideradas as pragas-chave da cultura da soja (Degrande & Vivan, 2008/2009). Pentatomídeos fitófagos (sugadores) se alimentam em diferentes partes da planta hospedeira e, como consequência, a natureza da injúria que causam é variável, sendo que sementes e frutas imaturas são os principais sítios de alimentação (Fernandes, 2000). Ao se alimentarem do grão, afetam o rendimento e a qualidade, podendo provocar a murcha e a má formação dos grãos e vagens, dessa forma a planta de soja não amadurece normalmente e na época da colheita permanece verde (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000).

O percevejo-marrom *Euschistus heros* (Figura 1) é hoje uma das pragas mais abundantes na cultura da soja e pode se alimentar de diferentes partes da planta, como caules, folhas e vagens, sendo nativo da região Neotropical e adaptado às regiões mais quentes, ocorrendo principalmente do norte do Estado do Paraná ao Centro-Oeste Brasileiro (Corrêa-Ferreira & Panizzi, 1999). A punctura, que é a perfuração do tecido da planta hospedeira pela introdução do aparelho bucal (estiletos), facilita a contaminação por patógenos e pode ainda causar distúrbios fisiológicos, como a retenção foliar (Todd & Herzog, 1980).

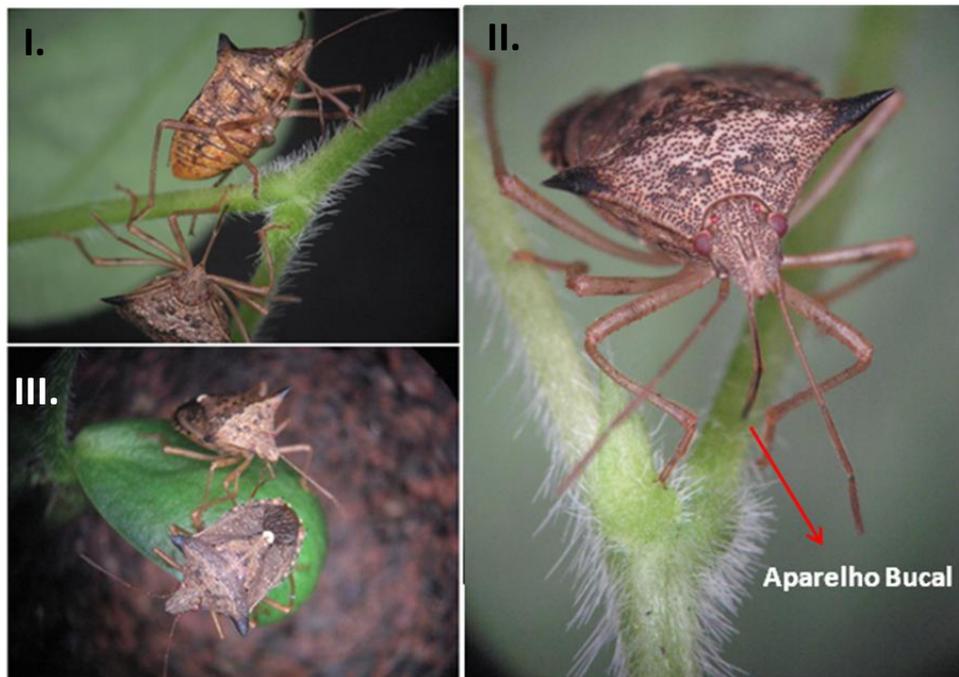


Figura 1. Percevejo-marrom adulto alimentando-se de diferentes partes da planta de soja em estágio V3. I e II. Alimentando-se do caule; e III. Do cotilédone.

De acordo com Corrêa-Ferreira & Panizzi (1999), o *E. heros* é encontrado na soja a partir do mês de novembro até o mês de abril (no Estado do Paraná), passando por três gerações nesse período (Fig. 2).

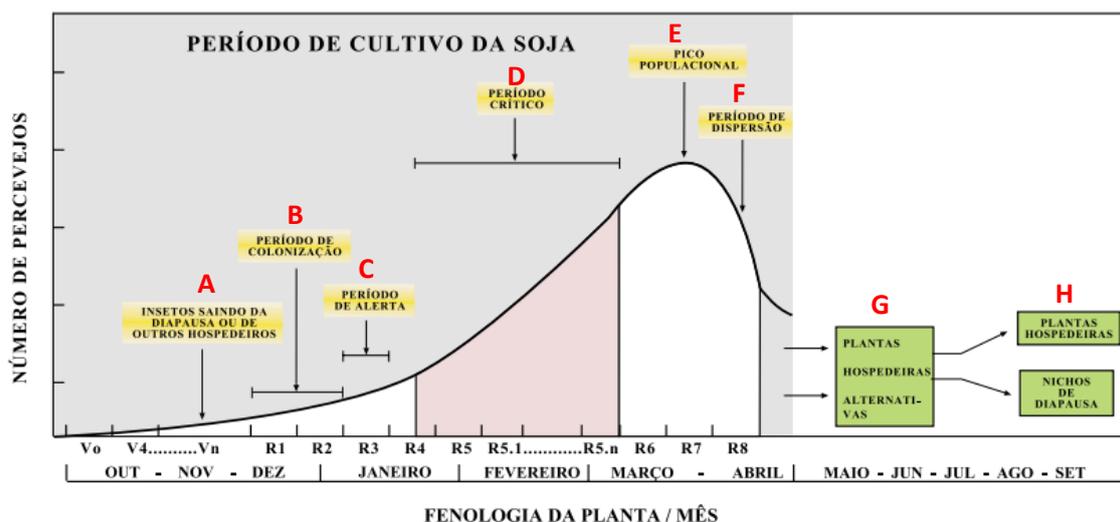


Fig. 2: Fenologia dos percevejos-praga da soja no norte do Paraná. A- Insetos saindo da diapausa ou outros hospedeiros; **B-** Início da colonização; **C-** Período de alerta. **D-** Período Crítico; **E-** Pico populacional; **F-** Período de dispersão; **G e H-** Retorno para plantas hospedeiras alternativas ou nichos de diapausa. **V₀**: germinação das sementes; **V₄ – V_n**: estágio vegetativo da cultura de soja; **R**: estágio reprodutivo da cultura de soja. Fonte: Corrêa-Ferreira & Panizzi (1999).

2.3 Defesa vegetal

As plantas estão expostas a estresses bióticos (patógenos, insetos, animais, dentre outros) e abióticos (seca, frio, excesso de água, salinidade, dentre outros) que podem prejudicar seu desenvolvimento e conseqüentemente sua produtividade. Tais alterações podem ativar os sistemas de defesa direta e indireta, além de possibilitar o desenvolvimento de tolerância ao agente estressor (Soares & Machado, 2007).

Qualquer agente físico ou químico capaz de estimular resposta de defesa em plantas é denominado indutor. Os indutores químicos podem ser desde carboidratos, proteínas/enzimas, glicoproteínas e outras substâncias liberadas pela parede celular vegetal durante a herbivoria do inseto, assim como substâncias químicas liberadas por patógenos (Nurnberger, 1999; Smith, 1996). Fatores bióticos e abióticos, através de indutores, podem ativar vias de sinalização como espécies reativas de oxigênio (EROs), fragmentos de parede celular, dentre outros, que por sua vez irão reconfigurar o metabolismo vegetal, onde tais mudanças redirecionam os recursos para a tolerância ou a produção de compostos antinutritivos, tóxicos e antidigestivos, afetando diretamente o herbívoro (defesa direta), ou através da liberação de compostos voláteis atraindo inimigos naturais (defesa indireta) (Fig. 3) (Dieke & Hilker, 2003; Kessler & Baldwin, 2002).

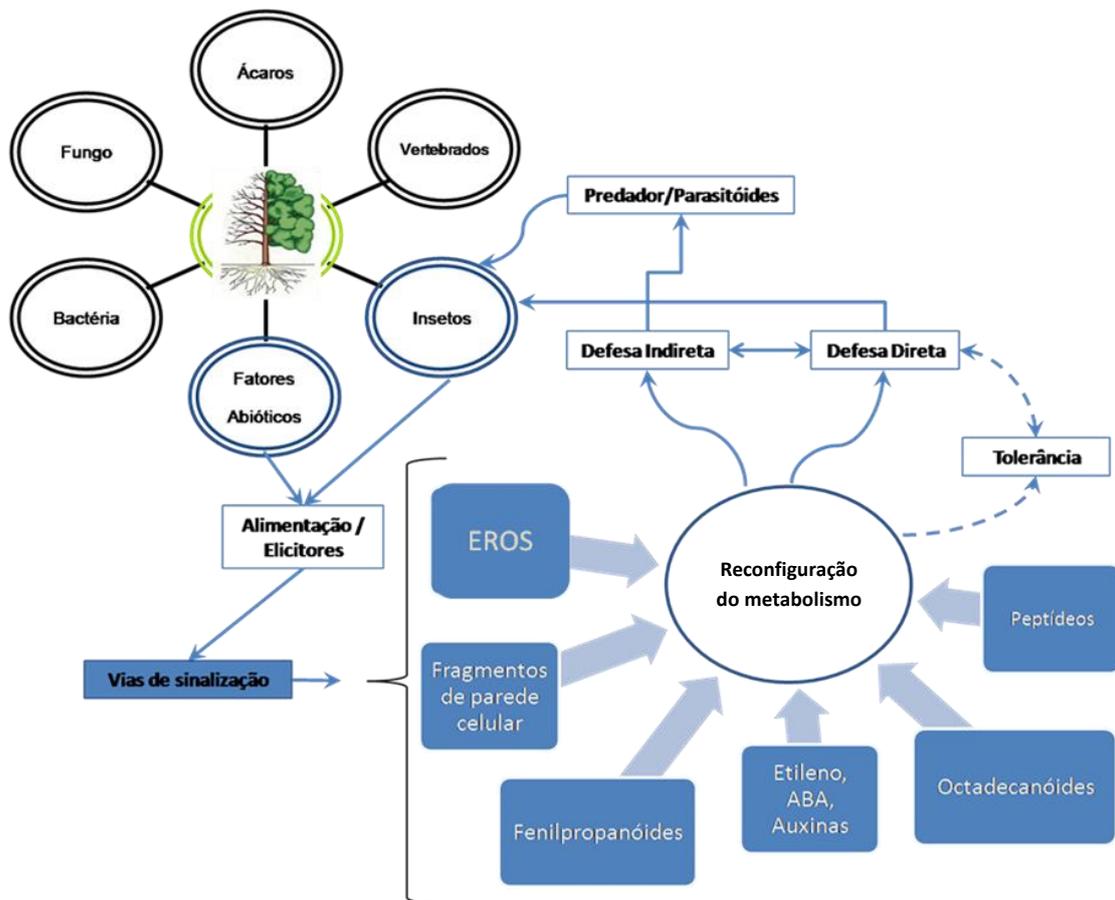


Fig. 3. Vias de sinalização que desencadeiam o sistema de defesa direta e/ou indireta vegetal. EROs: espécies reativas de oxigênio; ABA: ácido abscísico. Ilustração adaptada de Dicke & Hilker, 2003; Kessler & Baldwin, 2002.

A resistência contra a herbivoria pode ser classificada em três estratégias: (i) defesa direta; (ii) defesa indireta e (iii) tolerância (Dicke & Hilker, 2003; Kessler & Baldwin, 2002). Baldwin *et al.* (2001) relataram que os compostos produzidos pela planta em defesa direta e indireta são espécie-específica e podem variar, pelo menos quantitativamente, entre variedades da mesma espécie e de acordo com o tipo de indutor

Os agentes indutores da defesa vegetal advindos da injúria de insetos podem estar presentes tanto na secreção oral (saliva) liberados no processo de herbivoria, quanto no fluído de oviposição lançado minutos antes da deposição dos ovos na planta hospedeira. O primeiro indutor identificado em insetos foi a volicitina N-(17-hidroxilinoil)-L-glutamina (formado pela reação entre o ácido linolêico da planta com a glutamina presente no sistema digestivo do inseto), presente na secreção oral da *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), indutor de voláteis em *Zea mays* (Poales: Poaceae) (Alborn *et al.*, 1997). Outros indutores identificados são a β - glicosidase

[encontrada em secreção oral de *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae)], a glicose oxidase (encontrada em secreção oral de *Helicoverpa zea*). Já em insetos sugadores foi relatada a fosfatase alcalina como indutor presente em saliva de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Felton & Eichenseer, 1999; Funk, 2001; Mattiacci *et al.* 1995).

Doss *et al.* (2000) relataram que indutores presentes no fluido de oviposição (como por exemplo diols¹ de cadeias longa mono ou di-esterificadas com o ácido 3-hidroxiopropanóico) da praga de ervilha, *Bruchus pisorum* (Coleoptera: Bruchidae), induzem em alguns genótipos de ervilha a má formação das vagens, modificando a superfície onde os ovos são ovipositados, o que dificultaria a penetração das larvas nas vagens, deixando-as vulneráveis à predadores e parasitóides.

Os diferentes tipos de defesa vegetal serão detalhados nos tópicos subsequentes.

2.3.1 Defesa direta

Os compostos relacionados à defesa direta compreendem os metabólitos primários, os quais atuam no desenvolvimento e crescimento vegetal, tais como polissacarídeos, proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos, dentre outros, e os secundários não voláteis, os quais não possuem função no crescimento e desenvolvimento vegetal. Estes podem ser divididos em três classes de compostos: terpenos, compostos fenólicos e, compostos nitrogenados (Hoffmann-Campo *et al.*, 1996; Taiz & Zeiger, 2006).

Além da defesa química, as plantas excretam na superfície lipídios com função de proteção, tais como cutina, suberina e ceras, e ainda possuem estruturas de defesa preventiva tais como espinhoscutícula e periderme (Soares & Machado, 2007), que agem na defesa estrutural da planta. Os metabólitos primários e os secundários podem ser induzidos local e sistemicamente na planta, embora a indução ocorra, no geral, numa área específica da planta.

As proteínas envolvidas na defesa são aquelas relacionadas com os aspectos digestivos e de consumo dos alimentos pelo inseto, como inibidores de protease (IPs),

¹ Diols - compostos contendo dois grupos hidroxilas na cadeia carbônica

enzimas oxidativas (como a polifenol oxidase), enzimas que degradam aminoácidos, dentre outros (Howe & Jander, 2008).

A sinalização de defesa contra herbivoria é iniciada a partir da detecção por receptores presentes na membrana plasmática e, através das vias de sinalização de transdução de sinal celular, ativam a transcrição de genes específicos contra o estresse. A resposta de defesa vegetal se dá através da interação de fito-hormônios, fatores de transcrição, genes e proteínas (Pandey, 2008).

A sinalização da defesa está relacionada à produção de compostos, como o jasmonato e a sistemina, e que por sua vez estão relacionados à produção de IPs nas células vegetais, responsáveis pela inativação das enzimas que digerem as proteínas no intestino dos insetos. Os insetos após ingerirem IPs apresentam má digestão seguida da redução reprodutiva (Hilder, 1987). O jasmonato além da indução de formação de proteínas relacionadas à defesa, também é responsável pela regulação do desenvolvimento das plantas, como a senescência ou a formação do bulbo, dentre outras (Swamy, 2000). Outros octadecanóides como o ácido 12-oxo-fitodienóico (OPDA) e o metil jasmonato (MJ) e os derivados do ácido linoléico também são responsáveis pela sinalização para a produção de compostos defensivos (Kessler & Baldwin, 2002).

Kessler & Baldwin (2002) relataram ainda outro tipo de defesa direta contra patógenos que compreende a resposta hipersensível (HR), eficaz quando a área comprometida é pequena, que envolve a morte programada de células (apoptose) situadas ao redor da infecção e a produção de compostos antimicrobianos que impedem a dispersão do patógeno. Frequentemente a HR é precedida da produção de uma grande variedade de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ambos liberados local e sistemicamente), que podem contribuir com a apoptose. Entretanto, por mais que a HR seja eficiente, a apoptose é inapropriada para uma ampla área e ineficaz contra o ataque de herbívoros de vida livre, pois podem locomover-se para outra área e assim evitar a HR. Orozco-Cardenas *et al.* (2001) relataram que o H_2O_2 agiria como segundo mensageiro para HR quando as plantas sofrem ataques de herbivoria. Chen (2009) relatou que lesões causadas por insetos em plantas apresentaram sintomas característicos de lesões com resposta de hipersensibilidade, como por exemplo, lesões de herbivoria causadas pela mosca

Mayetiola destructor em trigo resistente (Grover, 1995) ou lesões causadas pela herbivoria do pulgão *Myzus persicae* em pêsego resistente (Sauge *et al.*, 1998).

2.3.2 Defesa Indireta

A defesa indireta consiste na produção de metabólitos secundários voláteis que são liberados mediante estresse biótico para atrair inimigos naturais (parasitóides e/ou predadores) de pragas (Howe & Jander, 2008; Swamy, 2000). Plantas vizinhas da mesma espécie ao captarem a presença de tais voláteis de defesa também são induzidas a ativarem os mecanismos de defesa direta e de resistência à herbivoria, tais como a produção de IPs, e também indireta pela produção e liberação de voláteis (Swamy, 2000; Tscharntk *et al.*, 2001).

Os compostos orgânicos voláteis podem ainda atuar como repelentes e dentre estes podem-se citar a citronela, a cânfora-pineno, o limoneno, o citronel, a citronelal e o timol (Courtois *et al.* 2009; Nerio *et al.* 2010).

De acordo com Kaloshian & Walling (2005), os voláteis mais comumente liberados por plantas após sofrerem herbivoria de insetos são o metil jasmonato, indols, salicilato de metila, monoterpenos, homoterpenos e sesquiterpenos.

2.3.3 Tolerância vegetal

De acordo com Simms (2000) e Stowe *et al.* (2000) tolerância vegetal é a capacidade de sobrevivência do organismo, mantendo suas funções fisiológicas, mesmo as reprodutivas, quando sobre efeitos de injúrias bióticas ou abióticas, não apresentando diferença assim do seu estado intacto. A tolerância está diretamente relacionada a uma propriedade genotípica do indivíduo e de uma população, sendo ativada apenas durante o estresse.

Pesquisadores relataram que uma das respostas mais comuns à injúria por herbivoria, ferimentos e ataque por patógenos, é o aumento na produção de sinal derivados do ácido linolênico, ao ácido linolêico e ao ácido hexadecatrienico (Kaloshina & Walling, 2005).

Laumann *et al.* (2008) relataram que as variedades de soja Silvânia, IAC-100, *Dowling* e Jataí, e a linhagem BRQ 96-306 5, expostas na fase reprodutiva às populações de percevejos (ninfas e adultos), respondem diferentemente quanto a formação de colônias de percevejos. Quando avaliado o número de indivíduos adultos presentes nas variedades estudadas, observaram que não houve diferença significativa entre as populações, porém quando avaliado o número de ninfas presentes em cada variedade, foram constatadas diferenças significativas, onde a população de ninfas na variedade Silvânia apresentou o maior número de indivíduos e, as variedades *Dowling* e a IAC-100 apresentaram um menor número de ninfas, sugerindo assim a resistência dessas duas variedades e a susceptibilidade da variedade Silvânia.

2.4 Estresse oxidativo

Um radical livre é definido como sendo todo átomo ou molécula que possui um elétron desemparelhado em sua última camada orbital e, que pode ser capaz danificar componentes celulares ou gerar a morte celular (Angelova *et al.*, 2000; Hermes-Lima, 2004). Dentre as espécies reativas de oxigênio (EROs) podemos citar compostos de origem radicalar (radicais livres) como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil (OH^{\cdot}), alquoxil (RO^{\cdot}), peroxil (RO_2^{\cdot}) e hidroperoxil (HO_2^{\cdot}); entre as espécies não-radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl), o ozônio (O_3), o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) e o oxigênio singlete (1O_2). Breusegem & Dat (2006) relataram o envolvimento das EROs na morte celular programada. As EROs podem agir como fator prejudicial, protetor ou como sinalizador, dependendo do equilíbrio entre a produção e sua eliminação (Boguszewska & Zagdańska, 2012).

Em plantas as EROs são continuamente produzidas durante o metabolismo aeróbico como subprodutos de diferentes vias metabólicas e em diversos compartimentos celulares, como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, regiões com alta atividade metabólica oxidante e alto fluxo de elétrons (Boguszewska & Zagdańska, 2012). A presença do oxigênio no ambiente celular induz a formação de EROs, que por sua vez podem inativar enzimas, danificar componentes celulares, células e tecidos devido sua ação tóxica e mutagênica. Tais danos ocorrem quando sua produção e remoção não estão sob controle homeostático (Angelova *et al.*, 2000;

Boguszewska & Zagdańska, 2012; Mallick & Mohn, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1991). Estresses bióticos e abióticos modificam o metabolismo celular vegetal e, dependendo dessa modificação, afetam a respiração celular e a fotossíntese e como consequência alteram a taxa de geração de EROs. Para manter os níveis basais de EROs, as plantas utilizam várias enzimas antioxidantes, dentre elas estão a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPOx), ascorbato peroxidase (APX) e peroxiredoxinas (Prxs), além de utilizar mecanismos não enzimáticos (ascorbato, tocoferol, compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides) (Navrot *et al.*, 2006; Tayefi-Nastabadi *et al.*, 2010).

Outros componentes celulares que auxiliam na manutenção dos níveis basais de EROs são a enzima oxidase alternativa e a proteína desacopladora, que possuem dentre outras a função de impedir uma fosforilação oxidativa exagerada e consequentemente, impedindo a formação de espécies reativas de oxigênio (Taiz & Zeiger, 2006).

Pesquisadores têm reportado a modificação dos perfis protéicos e nas concentrações de enzimas antioxidantes em plantas que sofreram herbivoria. Tscharrntke *et al.* (2001) demonstraram que o besouro de folha *Agelastica alni* (Coleoptera: Chrysomelidae) foi capaz de induzir o aumento da atividade das enzimas polifenol oxidase (PPO), LOX e peroxidase (POD) após causar injúrias de herbivoria em folhas de amieiro *Alnus glutinosa*. Já a herbivoria foliar causada pela *H. zea* foi capaz de aumentar a atividade das enzimas lipoxigenase (LOX), peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX) e a diamino oxidase (DAO), assim como foi observado o declínio acentuado na qualidade nutricional protéica foliar das plantas de soja atacadas (Bi & Felton, 1995; Felton *et al.*, 1994). Estresses abióticos podem estar relacionados com a modificação do metabolismo redox, por exemplo, foi demonstrado um aumento da atividade da enzima guaiacol peroxidase (GPOx) em folhas e raízes de plantas expostas a estresse por salinidade (Koji *et al.*, 2009) e o aumento da expressão das enzimas superóxido dismutase (CuZn-SOD) e ascorbato peroxidase em folhas de soja originadas de sementes que foram expostas a altas temperaturas (Ahsan *et al.*, 2010).

Além disso, estudos realizados em cevada e trigo relataram o aumento da atividade da enzima antioxidante secundária glutathione redutase (GR) após sofrerem herbivoria do pulgão *Sitobion avenae* (Argandoña, 1994). Bi *et al.* (1997) relataram que

a herbivoria em folha de algodão pela larva de *H. zea* induz o aumento dos níveis de H₂O₂, do ácido salicílico, da catalase e da ascorbato peroxidase.

2.4.1 Enzimas do metabolismo radicalar

Neste trabalho foram estudadas as principais enzimas envolvidas no processo antioxidante vegetal: oxiredutases lipoxigenase 3 (por suas várias funções no desenvolvimento vegetal), guaiacol peroxidase, ascorbato peroxidase e catalase (Sofa *et al.*, 2005; Tschardtke *et al.*, 2001). Essas enzimas podem agir como compostos antinutritivos ou estar envolvidas em processos de defesa vegetal, como a lipoxigenase que catalisa a produção de ácido jasmônico, a partir do ácido linoleico, que estimula a expressão de genes de defesa que agem como sinais secundários para a produção de outros compostos de defesa (Farmer *et al.*, 1992).

De acordo com Jones *et al.* (1998) as heme peroxidases são enzimas que catalisam a oxidação do peróxido de hidrogênio dependente de uma variedade de substratos, e podem ser divididas em três classes: peroxidases de classe I, como a citocromo *c* peroxidase e a ascorbato peroxidase; peroxidases de classe II, enzimas presentes em secreções de fungos; e peroxidases de classe III, peroxidases secretadas por plantas.

As peroxidases podem atuar, através de substratos, na regulação do crescimento vegetal, além de regular os níveis de H₂O₂ e espécies reativas de oxigênio (EROs), onde esses podem ativar vias de sinalização, gerar estresse oxidativo e ativar mecanismos de defesa vegetal (Fig. 4).

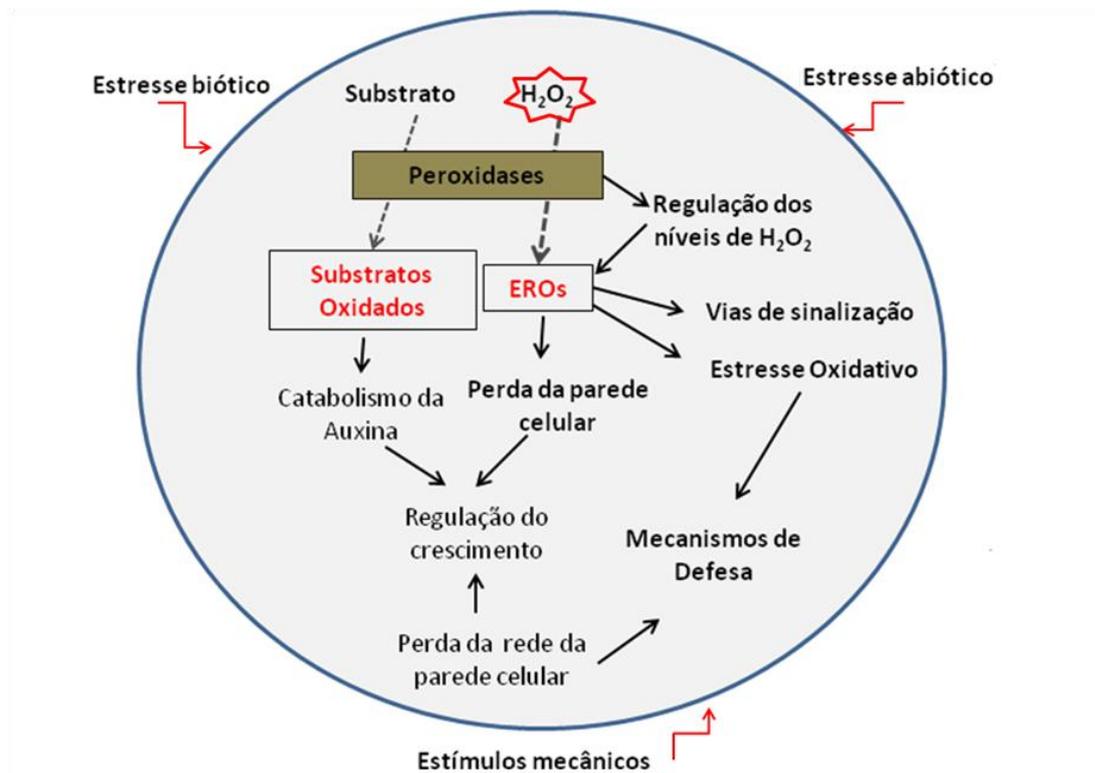


Fig. 4. Funções das peroxidases. Modificado de Cosio & Dunand (2009).

A seguir, é detalhada uma série de enzimas envolvidas no processo de defesa antioxidantes das plantas.

1. **Guaiacol Peroxidase (EC 1.11.1.7):** São encontradas no citoplasma e apoplasma e estão envolvidas tanto no crescimento quanto no desenvolvimento vegetal (Fig. 4), além de catalisar a oxidação de compostos orgânicos como fenóis, amins aromáticas, utilizando o peróxido de hidrogênio como oxidante (reação 1.1) (Tayefi-Nasrabadi *et al.*, 2010). De acordo com Karuppanapandian *et al.* (2011) a atividade da GPOx varia consideravelmente dependendo da espécie da planta e do tipo de estresse, e que a GPOx pode ser utilizada como marcador para avaliar a intensidade de estresse em plantas expostas a concentrações salinas não letais. Essa proteína possui ainda grande importância na biossíntese de lignina e na defesa contra estresses consumindo o peróxido de hidrogênio (Boguszewska & Zagdańska, 2012).



2. **Ascorbato Peroxidase (EC 1.11.1.11):** enzima localizada no cloroplasto, citoplasma, mitocôndrias, peróxissomos e apoplasto, sendo que cada localização possui uma isoforma diferente (Boguszewska & Zagdańska, 2012). Segundo Wellinder (1992), a ascorbato peroxidase (APx) é diferenciado da guaiacol peroxidase (GPOx) pela sequência de seus aminoácidos, funções e substrato utilizado como doador de elétrons, onde este é classificado no grupo das peroxidases classe III e aquele no grupo das peroxidases classe I. Catalisa a reação de óxido-redução entre o peróxido de hidrogênio e o substrato ascorbato (AA) como doador de elétrons, e participa do ciclo da glutaciona-ascorbato (Fig. 5), onde o ascorbato reage com o peróxido de hidrogênio formando duas moléculas de água e um dehidroascorbato redutase (DHA) (Halliwell & Foyer, 1976) [reação 2.1]. De acordo com Jones *et al.* (1998) a APx seria uma das peroxidases mais representativas, pois o substrato utilizado como doador de elétrons é uma pequena molécula orgânica muito abundante em várias plantas, e que por isso seria importante ter o conhecimento sobre as propriedades dessa enzima.

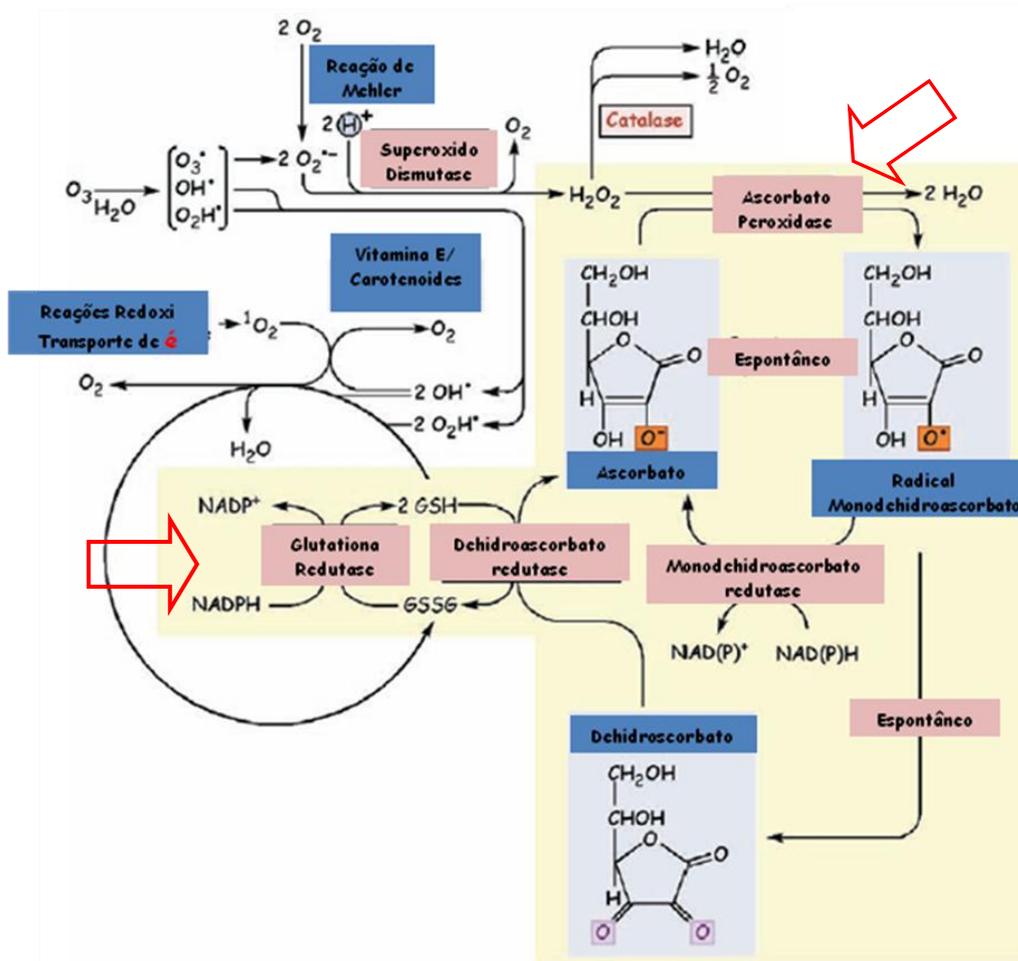
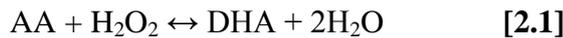
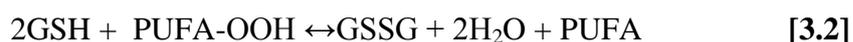
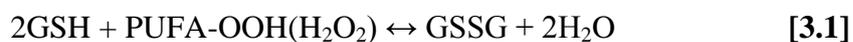


Fig. 5. Ciclo da glutaciona-ascorbato. Fonte: Correia *et al.* (2003).

3. **Glutationa peroxidase (EC 1.11.1.9):** é responsável pela redução de hidroperóxidos lipídeos em seus alcoóis e localiza-se no espaço intermembrânico mitocondrial e citoplasma de células. Em plantas é responsável pela proteção celular de danos causados pelo aumento da formação de hidroperóxidos gerados devidos a diferentes condições de estresse (Eshdat *et al.*, 1997). Essa enzima pode ser classificada em dependente e não dependentes de selênio. A glutaciona é utilizada como substrato para reduzir hidroperóxidos (PUFA) e o peróxido de hidrogênio, gerando glutaciona oxidada (GSSG) e duas moléculas de água [reação 3.1]. A glutaciona redutase (GR), a partir da GSSG, é capaz de regenerar a glutaciona reduzida (GSH) utilizando NADPH [reação 3.2 e 3.3] (Gill *et al.*, 2010).



4. **Catalase (EC 1.11.1.6):** A catalase é responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio formado durante a fotorespiração. Foram descritas três isoformas de catalase em plantas, onde mono e dicotiledôneas apresentam três isoformas: (i) CAT1, que é expressa em sementes e pólen; (ii) CAT2, encontrado em tecidos fotossintetizantes e raízes; (iii) CAT3, encontradas em tecidos vasculares e em folhas (Boguszewska & Zagdańska, 2012). O aumento da atividade da catalase pode ser relacionada à adaptação, auxiliando na redução dos níveis tóxicos do peróxido de hidrogênio (Karuppanapandian *et al.*, 2011). De acordo com Aebi (1984) a catalase exerce duas funções: (i) a de atividade catalítica decompondo peróxido de hidrogênio em água e oxigênio [reação 4.1] e (ii) a oxidação de compostos doadores de hidrogênio, como metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o consumo de um mol de peróxido.



5. **Superóxido Dismutase (EC 1.15.1.1):** É a primeira linha de defesa contra EROs e catalisa a formação de peróxido de hidrogênio a partir de radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$ [reação 5.1]. A SOD é considerada um importante antioxidante celular.



A SOD é dividida em três grupos: (i) a forma contendo cobre e zinco (CuZnSOD) localizada no citoplasma, cloroplasto, peroxissomos e apoplasto, (ii) a forma contendo manganês (MnSOD) localizada na mitocôndria e cloroplastos, e (iii) a forma contendo ferro (FeSOD) localizada no cloroplasto, podendo ser encontrada nos peróxissomos (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Badawi *et al.* (2004) relataram que o aumento da expressão da SOD em plantas transgênicas resultou em tolerância à seca e à altas concentrações de sal. Wang *et al.* (2004) relataram ainda que a alta concentração de sais e o estresse osmótico aumentaram a produção de radicais superóxido em folhas de *Suaeda salsa L.* (Caryophyllales: Amaranthaceae) e que a eliminação desses radicais é feita de forma diferencial, onde os superóxidos formados durante o estresse osmótico seriam eliminados principalmente pela MnSOD e pela FeSOD II e III; os superóxidos causados pelos estresse salino são eliminados pela FeSOD I. O produto da SOD, o peróxido de hidrogênio, precisa ser ainda de detoxificação, o que é realizado por outras enzimas, como a catalase, ou por antioxidantes não enzimáticos, que podem variar entre os compartimentos celulares.

6. **Lipoxigenases (EC 1.13.11.12):** Constituem uma família de enzimas amplamente distribuídas entre animais e plantas, e catalisam a adição de moléculas de oxigênio em ácidos graxos poliinsaturados contendo sistema *cis*, *cis*-1,4-pentadieno para produzir lipídios hidroperóxidos, que por sua vez podem sofrer ação de enzimas, sendo convertidos em outros compostos participantes de outras vias (Porta & Rocha-Sosa, 2002). Utilizam como substrato o ácido linoléico (LA) e o ácido linolênico (LeA). A oxigenação dos ácidos graxos poliinsaturados é considerada o ponto chave para a reação em cascata que resulta na produção de hormônios vegetais (traumatina e ácido jasmônico), além de compostos antibacterianos e antifúngicos como hidrocarbonetos e aldeídos (Rosahl, 1996) (Fig. 6). Além da produção do ácido jasmônico a LOX está envolvida na síntese de compostos com funções específicas no desenvolvimento vegetal, onde as lipoxigenases vegetativas (VLXs – *vegetative lipoxygenases*) estão relacionadas com o metabolismo do nitrogênio e o metabolismo de reserva durante o desenvolvimento vegetal (Porta & Rocha-Sosa, 2002).

Estudos relatam que, dentre 28 espécies de planta, a soja foi a que apresentou a maior atividade da LOX, e que dentre os estágios de desenvolvimento, as maiores atividades da LOX foram obtidas em folhas mais jovens (Hildebrand *et al.*, 1988; Sekiya *et al.*, 1983; Zhuang *et al.*, 1992).

De acordo com Feussner & Wasternack (1998) a LOX constitui uma família de isoenzimas que diferem entre si devido às suas características de expressão, substratos de preferência, parâmetros enzimáticos (como pH) e posicionamento de oxigenação do substrato. Atualmente, podem ser encontradas pelo menos dez isoenzimas de lipoxigenases de soja no *GenBank* (NCBI- National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov).

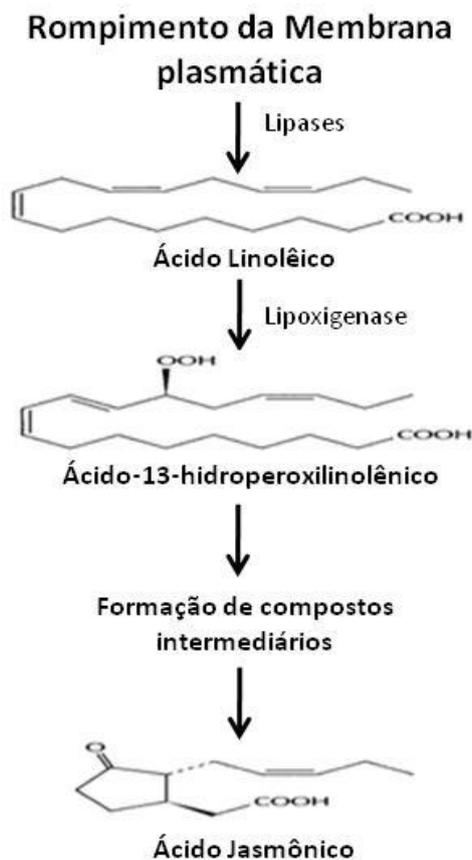


Fig.6. Formação do Ácido Jasmônico. Resumo da rota metabólica envolvida na formação do ácido jasmônico Fonte: Porta & Rocha-Sosa (2002).

2.5 Proteômica

Proteômica é o estudo da população de proteínas presentes num dado tecido ou células, numa dada etapa do desenvolvimento, numa dada condição ambiental, com o objetivo de avaliar fenotipicamente quantitativa e qualitativamente a expressão protéica (Westermeyer, 2002). Um dos métodos mais utilizados para o estudo proteômico é a eletroforese bidimensional (2-DE) associada à espectrometria de massas (MS)

juntamente com a disponibilidade de informações genômicas e/ou transcriptômicas (Westermeyer & Nave, 2002).

A 2-DE possibilita a separação de complexas misturas protéicas de acordo com o ponto isoelétrico (pI), massa molecular, solubilidade e abundância relativa, possibilitando a visualização de mapas protéicos, que refletem os níveis de expressão das proteínas, suas isoformas ou modificações pós-transcricionais (Görg *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006). A 2-DE é feita em duas etapas: (i) primeira dimensão ou focalização isoelétrica (pI) e (ii) segunda dimensão realizada em gel SDS-PAGE.

Durante a focalização isoelétrica as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico. Quando uma proteína é exposta a uma corrente elétrica, as proteínas migram para os pólos negativos e positivos de acordo com a carga elétrica dos aminoácidos que a constituem, e distribuem-se pela strip (gel contendo gradiente de pH imobilizado) até atingirem um pH onde sua carga total é nula. Após a focalização isoelétrica realiza-se a redução das pontes de dissulfeto que ocorre entre as cisteínas e a alquilação para prevenir a re-oxidação. Na segunda dimensão o gel da focalização isoelétrica é colocado horizontalmente sobre um gel desnaturante de poliacrilamida para que ocorra o fracionamento das proteínas de acordo com suas massas moleculares quando submetidas a uma diferença de potencial elétrico, processo denominado de eletroforese SDS-PAGE (Weiss & Görg, 2009).

De acordo com Weiss *et al.* (2009) “*as propriedades mais importantes de métodos de detecção de proteínas aplicada na análise do proteoma inclui alta sensibilidade (ou seja, baixo limite de detecção), ampla faixa linear dinâmica (intervalo de massas ou concentrações que permitem a construção de uma curva linear analítica, para maior precisão quantitativa), reprodutibilidade, custo-benefício, facilidade de utilização e compatibilidade com tecnologias de caracterização e identificação de proteínas, como a espectrometria de massas*”. Afirmam ainda que dentre os métodos de detecção de proteínas está o de coloração *Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250*, onde o corante se liga aos resíduos arginina e lisina das proteínas, que possui faixa de detecção de aproximadamente 100 ng, e tem como características intensa capacidade de coloração, elevada solubilidade em géis de poliacrilamida, compatibilidade com a espectrometria de massas, baixo custo e fácil manuseio.

As proteínas presentes nos géis, após serem coradas formam manchas (*spots*), o que possibilita a avaliação subtrativa entre grupos de tratamentos controle e experimental, onde a ausência ou o aparecimento de *spots* permite a obtenção de informações sobre proteínas tratamento-específico, e a intensidade dos *spots* permite a avaliação quantitativa do nível de expressão diferencial protéica, sendo que tais proteínas são analisadas por espectrometria de massas (Graves & Haystead, 2002).

Apesar da maior facilidade de identificação das proteínas da soja devido à elucidação do genoma, poucos estudos foram realizados com o intuito de se conhecer as rotas metabólicas envolvidas na defesa da soja ao sofrer injúria de herbivoria. O primeiro estudo proteômico sobre a resposta de defesa da soja à herbivoria da lagarta-do-algodoeiro (*Prodenia litura*, Lepidoptera: Noctuidae) foi realizado por Fan *et al.* (2012), onde foram observadas alterações nos níveis de expressão de 10 proteínas.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica capaz de medir a razão entre a massa e a carga (m/z) de íons, de compostos orgânicos e inorgânicos, o que permite a determinação da massa molecular de proteínas, carboidratos, lipídios dentre outras moléculas (Yates, 2011). Na década de 80 desenvolveram-se técnicas de ionização por eletrospray-ESI (ESI-MS) e de ionização e dessorção a laser assistida por matriz -MALDI (MALDI-MS) (Fenn *et al.*, 1989; Karas e Hillenkamp, 1988). De acordo com Chapman (1993), nas técnicas de ESI-MS e MALDI-MS, os íons são formados por protonação ou desprotonação de moléculas anteriormente neutras, ou pela simples adição de íons (Na^+ , K^+ , NH_4^+ ou Cl^-), formando íons adutos.

El-Aneed *et al.* (2009) relatam que a dessorção (conversão de fase sólida para gasosa) de íons é feita a partir de uma fase sólida, onde as amostras (como por exemplo, peptídeos obtidos a partir da digestão de com a enzima tripsina) são misturadas em uma matriz apropriada, como por exemplo o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -ciano), e aplicadas em uma placa de MALDI até secarem. Ao se aplicar um feixe de laser (laser azoto a 337 nm) a mistura de matriz e amostra sofre então a dessorção, o que gera a ionização dos analítos da amostra. Os peptídeos protonados, ao serem submetidos a um campo elétrico, são acelerados, onde a partir do seu tempo de vôo (TOF- do inglês *time of flight*) no vácuo é possível obter a relação massa/carga (m/z) da molécula. Os dados de massas obtidos são então representados na forma de picos em um espectro, que após serem analisados por ferramenta de bioinformática [como o Mascot

(<http://www.matrixscience.com>)], associada à pesquisa em banco de dados, possibilita a identificação das proteínas (Fig. 7), num método conhecido como *peptide mass fingerprinting* (PMF). Alternativamente existe a possibilidade da identificação protéica ser feita através do sequenciamento da cadeia de aminoácidos dos fragmentos peptídicos gerados no processo (Graves & Haystead, 2002).

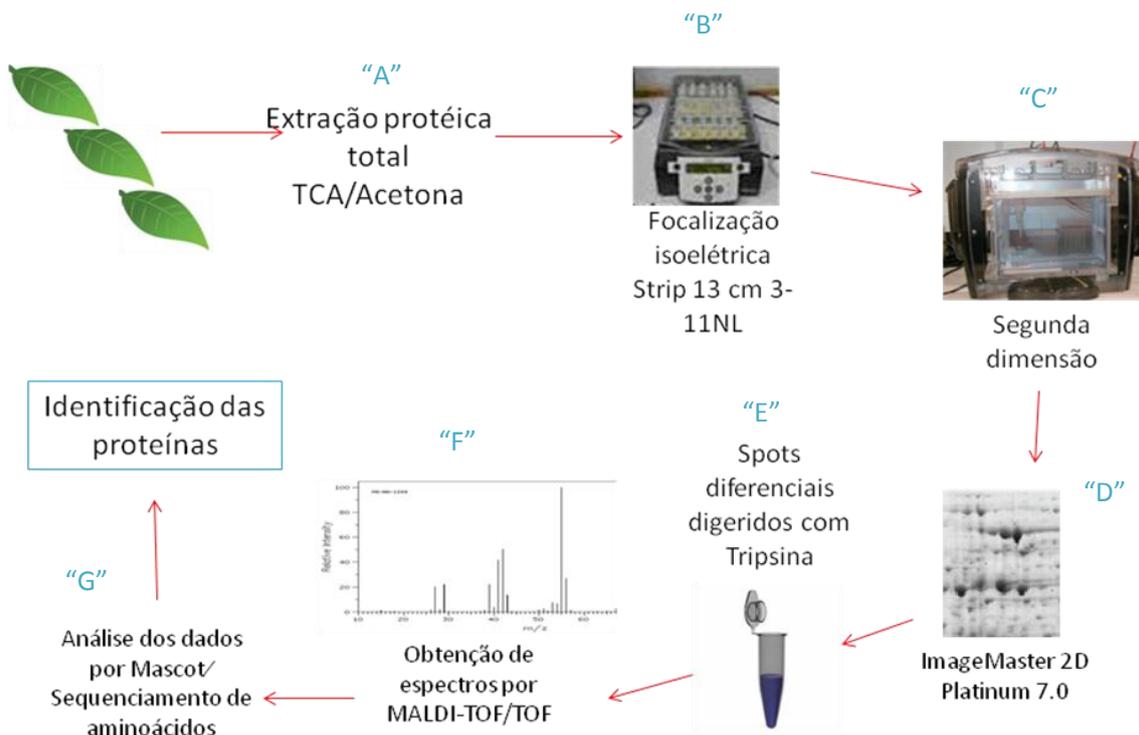


Fig. 7. Etapas da análise proteômica. A) Extração protéica total por TCA/Acetona; B) Separação pelo ponto isoeétrico na primeira dimensão; C) Separação pela massa molecular na segunda dimensão; D) Retirada dos *spots* de interesse; E) Digestão enzimática com tripsina e extração dos peptídeos; F) Obtenção de espectros por MALDI-TOF/TOF; G) Comparação em base de dados de sequências de proteínas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Como objetivo geral pretende-se avaliar a resposta ao estresse oxidativo relacionadas à defesa de soja ao dano de herbivoria do percevejo-marrom, bem como identificar as principais rotas metabólicas induzidas. Pretende-se ainda dar mais subsídios para o conhecimento da característica resistente da variedade IAC-100, em comparação com a Silvânia.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar, em variedades de soja susceptível e resistente, o padrão temporal de resposta ao estresse oxidativo gerado pela herbivoria do percevejo-marrom, através do estudo das enzimas lipoxigenase 3 (LOX 3), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPOx) e ascorbato peroxidase (APx) após 24, 48, 72 e 96 h de herbivoria;
- ✓ Estudo proteômico comparativo em variedades de soja susceptível e resistente ao dano de herbivoria pelo percevejo-marrom a fim de mapear as rotas metabólicas predominantes na defesa vegetal e comparar a resposta entre as variedades.

4. Material e Métodos

Os procedimentos experimentais foram executados nos laboratórios de Bioquímica e Biologia Molecular, Genômica e Proteômica e, de Espectrometria de Massas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e no laboratório de Radicais Livres do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília - UnB.

4.1 Cultivo da Soja

As variedades de soja estudadas foram a IAC-100 [resistente à herbivoria (McPherson & Buss, 2007)] e Silvânia [susceptível à herbivoria (Laumann *et al.*, 2008)], cujas sementes foram obtidas da Embrapa Cerrados (CPAC). Essas variedades foram escolhidas para o estudo, pois além de serem variedades comerciais, a literatura tem relatado suas características resistente e susceptível ao ataque de percevejos. As variedades foram semeadas periodicamente em papel de germinação de sementes com pH neutro, utilizando-se quatro folhas de germinação envolvendo cerca de 30 sementes de soja. Essas folhas foram colocadas na vertical para possibilitar a germinação e o crescimento da raiz. As folhas de germinação foram regadas diariamente até que houvesse a formação da raiz e separação dos cotilédones (aproximadamente sete dias). Após a completa germinação, as plântulas de desenvolvimento equivalente foram transplantadas para potes plásticos de 350 mL contendo 2/3 de solo fertilizado e 1/3 de substrato de cultivo (BIOPLANT), mantidas em câmaras de germinação a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 13 h. Fez-se a irrigação manual a cada dois dias.

Ao atingirem o terceiro estágio vegetativo (V3), as plantas foram utilizadas para os bioensaios de herbivoria. De acordo com Faria *et al.* (2007), uma planta está em estágio V3 quando a segunda folha trifoliolada estiver completamente desenvolvida, ou seja, quando os bordos dos folíolos da segunda folha trifoliolada deixarem de se tocar (Fig. 8).

O estudo foi realizado em estágio V3 devido à limitação de espaço dentro das câmaras de germinação que foram utilizadas para o crescimento e montagem dos bioensaios, o que possibilitou um melhor controle de troca gasosa, luminosidade e a presença de outras pragas. Outro ponto determinante para a escolha desse estágio foi o de ter sido observada a indução de produção de voláteis após a injúria de herbivoria

nesse estágio, a atração de inimigos naturais por esses voláteis e que quando em estágio reprodutivo a liberação de voláteis diminui, pois o metabolismo vegetal está direcionado para a reprodução. Com a indução da produção dos voláteis em soja é possível atrair predadores, como exemplo os parasitóides, antes do pico de infestação da praga (Michereff *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2009).

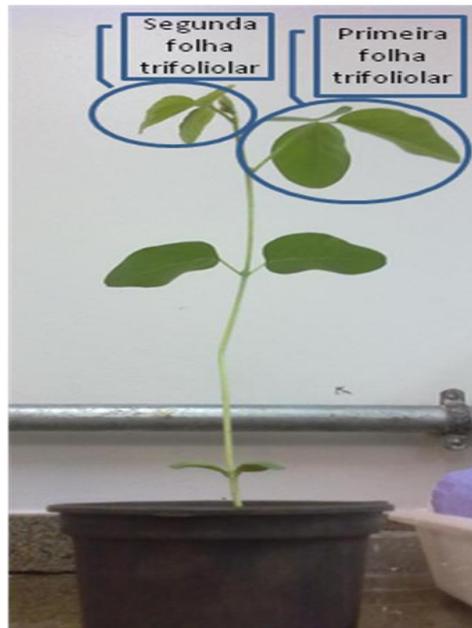


Fig. 8. Planta de soja em estágio V3. Planta apresentando total separação da segunda folha trifoliolada.

4.2 Criação do percevejo-marrom

Os insetos foram obtidos da colônia de criação já estabelecida na Plataforma de Criação de Insetos do Departamento de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, conforme descrito a seguir. Os percevejos foram criados em gaiolas plásticas (26 x 22 cm) contendo potes plásticos com algodão embebido em água e alimentados com sementes de amendoim (*Arachis hypogaea*), soja (*Glycine max*), girassol (*Helianthus annuus*) e vagens de feijão (*Phaseolus vulgaris*), mantidos a temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa (U.R.) do ar de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. O fornecimento de alimento foi renovado duas vezes por semana. Durante o desenvolvimento os percevejos passam pela fase de ovo que dura em média seis dias, pela fase de ninfa composta por cinco estágios e que tem duração média de 25 dias, e a fase adulta.

4.3 Bioensaio de herbivoria

Ao todo foram montados quatro tratamentos: variedades de soja IAC-100 e Silvânia, com e sem injúria de herbivoria pelo percevejo-marrom. Todos os bioensaios foram realizados em câmaras de germinação tipo BOD (modelo 347, marca FANEM), sendo uma para cada tratamento, para que a resposta de um tratamento não interfira nas plantas do outro tratamento.

As plantas dos tratamentos que sofreram injúria de herbivoria foram expostas por 96 h a três percevejo-marrom machos, adultos, pois fêmeas poderiam ovipositar nas plantas mesmo sem ter havido acasalamento, induzindo uma resposta diferente de defesa vegetal em relação à injúria de herbivoria e, portanto, erro experimental (Michereff *et al.*, 2011). Os percevejos foram privados de qualquer tipo de alimentação por um período de 24 h antes da condição do bioensaio. Para garantir a presença constante dos percevejos sobre as plantas do grupo com injúria de herbivoria, foram utilizados sacos plásticos com microfuros de aeração para encobrir as plantas (Fig. 9), os quais também foram colocados nas plantas do grupo sem injúria de herbivoria. As amostras analisadas foram obtidas nos meses de outubro e dezembro de 2011, sendo que as amostras utilizadas para a realização dos estudos enzimáticos e proteômica foram obtidas em um mesmo bioensaio.



Fig. 9. Plantas de sojas em estágio V3 mantidas em câmara de germinação. Envolvidas por plástico perfurado para assegurar a presença do percevejo durante todo tempo de exposição.

Em tempos regulares de 24 a até 96 h, as folhas de cada planta foram coletadas individualmente e transferidas para tubos falcon de 50 mL e imediatamente congeladas

em nitrogênio líquido, armazenadas a -80°C para análises proteômicas e de estresse oxidativo.

4.4 Estudo do estresse oxidativo relacionado à defesa contra herbivoria

4.4.1 Preparo do homogenato para ensaios de atividade enzimática

Ensaio enzimáticos foram realizados com o objetivo de determinar o perfil de respostas antioxidantes das enzimas catalase, guaiacol peroxidase, ascorbato peroxidase e da enzima oxigenase lipoxigenase 3 em soja nas variedades Silvânia e IAC-100 em estágio V3, quando exposta à herbivoria do percevejo-marrom em escala temporal de 96 h, com intervalos de coletas de 24 h. As folhas de uma única planta de soja foram consideradas como uma replicata (n=1) biológica, e para cada replicata biológica foram feitas leituras em “triplicata” (n=3) para cada enzima, sendo que para cada intervalo de tempo foram utilizadas “triplicatas” biológicas. Os dados obtidos foram analisados por ANOVA e teste de Tukey, considerando uma probabilidade de erro de 5%.

Em um almofariz previamente gelado contendo nitrogênio líquido, macerou-se o tecido foliar até a formação de um pó fino. Pesou-se 100 mg em um microtubo e reservou-se em nitrogênio líquido até o momento da homogeneização. Para cada 100 mg de macerado, adicionou-se 400 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 (KPi), contendo 10 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 10 mM de ácido etilenofiamino tetra-acético (EDTA), homogeneizou-se e centrifugou-se a 14.000xg por 15 min a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para um microtubo novo, e fez-se uma alíquota para quantificação protéica pelo método de Bradford (1976).

4.4.2 Ensaio de atividade enzimática

As reações (para as enzimas catalase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase) foram realizadas em cubeta de quartzo utilizando-se tampão KPi 0,05 M pH 7,0, e 1 a 20 µL de extrato protéico para um volume final de 1000 µL (incluindo o volume de

substrato). Para a reação da atividade da lipoxigenase 3 utilizou-se tampão KPi 0,05 M pH 6,5 e 1 a 20 μL de extrato protéico para um volume final de 3000 μL (incluindo o volume de substrato). A reação é iniciada após adição do substrato correspondente a cada enzima. Fez-se a leitura da taxa linear no comprimento de onda específico para aferir a atividade de cada enzima (Quadro 3) por 150 s em intervalos de 10 s. As atividades enzimáticas foram calculadas usando o coeficiente de extinção molar correspondente a cada enzima e o resultado expresso em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. As reações enzimáticas foram feitas em cubetas de quartzo de 10 mm x 10 mm com volumes de 1 mL e 3 mL, e lidas em espectrofotômetro SmartTMPlus (BioRad®).

Quadro 1. Ensaio da atividade enzimática foliar das variedades de soja Silvânia e IAC-100 em estágio V3 com e sem herbivoria do percevejo-marrom.

Enzima	Conc. Final do Substrato enzimático	Coefficiente de extinção molar ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Comprimento de onda (nm)	Referências
Catalase	10 mM H_2O_2	0,0394	240	Hermes-Lima <i>et al.</i> , 2012
Ascorbato peroxidase	10 mM H_2O_2 + 4 mM de ascorbato	14,5	265	Anderson <i>et al.</i> , 1992
Guaiacol peroxidase	10 mM H_2O_2 + guaiacol 2 mM	26,6	470	Chen <i>et al.</i> , 2009
Lipoxigenase 3	8×10^{-2} mM de linoleato de sódio	22	234	Axelrod <i>et al.</i> , 1981

Conc.: concentração.

A análise da catalase foi feita através do acompanhamento da taxa de decomposição do H_2O_2 a água, a 240 nm; a atividade da ascorbato peroxidase a partir da decomposição do H_2O_2 ao oxidar o ascorbato a 265 nm, o guaiacol a 470 nm a partir da formação do tetraguaiacol, a atividade da lipoxigenase é tida a partir da formação de ligações duplas no hidroperóxido formado a 234 nm.

4.5 Estudo do perfil protéico da soja com e sem herbivoria do percevejo-marrom

Para acessar a fisiologia do mecanismo de defesa em soja foram investigadas as proteínas/rotas metabólicas presentes durante o processo através de ferramentas de

proteômica. Dada à inviabilidade de realizar o estudo proteômico em toda a série temporal, realizou-se a comparação do número de bandas do perfil protéico bruto obtido em cada série temporal dos quatro tratamentos (duas variedades de soja, com e sem injúria de herbivoria) por eletroforese SDS-PAGE unidimensional. A contagem do número de bandas foi realizada através do programa TotalLab versão 2009 (Nonlinear Dynamics®) e a comparação estatística pela ANOVA em blocos casualizados, seguida pela comparação múltipla por Tukey (programa estatístico R, versão 2.15.0), considerando-se uma probabilidade de erro de 5%.

Para o estudo propriamente dito do perfil protéico da defesa das variedades de soja em estágio V3 foram retiradas folhas (um grama) após 24 h de herbivoria pelo percevejo-marrom em cada um dos quatro tratamentos (duas variedades com e sem injúria de herbivoria). As folhas foram maceradas (*pool* de folhas de três plantas por extração) para extração protéica total. As proteínas foram ressolubilizadas em solução de reidratação e, após a quantificação protéica por Bradford (1976), destinadas para a focalização isoeletrica e posterior fracionamento pela massa molecular. Os *spots* diferenciais (em termos qualitativo e quantitativo) foram selecionados, digeridos com tripsina e destinados para a identificação protéica por espectrometria de massas do tipo *Peptide Mass Fingerprinting* MALDI-TOF/TOF. Todas essas etapas estão detalhadas a seguir.

4.5.1 Eletroforese bidimensional e espectrometria de massas

4.5.1.1 Extração protéica total

Para selecionar o tipo de extração protéica que seria utilizada na análise de proteômica, foram feitas extrações pelos métodos de TCA/Acetona e Fenol de seis amostras de folhas de soja da variedade Silvânia em estágio V3 e comparou-se três parâmetros: o rendimento protéico total obtido, a presença indesejável de DNA genômico e a diversidade e abundância de bandas protéicas no perfil eletroforético em SDS-PAGE, sendo a contagem das bandas realizada através do programa TotalLab versão 2009 (Nonlinear Dynamics®).

O método de extração protéica total por fenol foi adaptado de Natajaran *et al.* (2005), no qual homogeneizou-se 1 g de amostra, previamente macerado em nitrogênio

líquido com o auxílio de almofariz e pistilo, em 5 mL de tampão de extração gelado (0,1M Tris-HCl pH 8,3; 2% (m/v) PEG6000; 0,02 M cloreto de magnésio; 0,4% (v/v) β -mercaptoetanol; 0,001 M fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF); 0,01 M EDTA; 0,7 M sacarose) e adicionou-se igual volume de fenol saturado equilibrado em Tris-HCl pH 8,0, misturou-se vigorosamente em vortex por 5 min. Centrifugou-se a 3.500xg por 15 min a 4°C. Coletou-se a fase fenólica e as proteínas foram precipitadas com quatro a cinco vezes o volume obtido com acetato de amônio 0,1 M em metanol 100% gelado. Incubou-se por 24 h a -20°C, seguiu-se centrifugação a 10.000xg por 20 min a 4°C. Lavou-se o *pellet* em tampão acetato de amônio 0,1 M em metanol 100% gelado. Incubou-se novamente por 20 min a -20°C. Centrifugou-se e lavou-se o *pellet* por mais duas vezes com tampão acetato de amônio 0,1 M em metanol 100% gelado. Após a última centrifugação lavou-se o *pellet* em acetona 80% (v/v) gelada e centrifugou-se a 10.000xg por 5 min a 4°C. Secou-se o *pellet* em centrífuga a vácuo (*speed vac*) por 30 min.

O método de extração por TCA/Acetona foi adaptado de Méchin *et al.* (2007) onde macerou-se as amostras em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo, e para um volume de 5 mL de folha macerada, adicionou-se 10 mL de solução de acetona gelada contendo 10% (m/v) ácido tricloroacético (TCA) e 0,07% (v/v) β -mercaptoetanol. Homogeneizou-se com vortex por 5 min e incubou-se por 24 h a -20°C. Centrifugou-se a 10.000xg por 20 min a 4°C. Lavou-se o *pellet* por duas ou três vezes em acetona gelada contendo 0,07% (v/v) β -mercaptoetanol e centrifugou-se a 10.000xg por 10 min a 4°C. Secou-se o *pellet* em *speed vac* por 30 min.

O rendimento protéico das extrações foram avaliados por quantificação protéica por Qubit (Invitrogen®), descrito em detalhes no item **3.5.1.3**, e avaliadas em minigel de SDS-PAGE 10% (8 x 8 cm com 1 mm de espessura), onde as amostras foram previamente normalizadas entre si para uma mesma concentração final de massa, ou seja, ao término dos dois métodos de extração protéica realizou-se a quantificação e as massas de proteínas de uma mesma planta, porém de métodos diferentes foram normalizadas para uma mesma concentração, para a análise em minigel, garantindo assim que qualquer diferença visualizada não fosse relacionada à diferença de concentrações de proteína aplicada no minigel. As normalizações foram feitas da seguinte maneira: plantas 1 e 3 com 2,25 μ g; planta 2 com 4,25 μ g; planta 4 com 2 μ g; planta 5 com 1,75 μ g e planta 6 com 1 μ g de massa. As amostras foram previamente

aquecidas por 5 min a 94 °C com 3,75 µL de tampão de amostra desnaturante 4x (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% (m/v) SDS; 5% β-mercaptoetanol) para um volume final de 15 µL. Para verificação da presença de DNA genômico preparou-se um gel de agarose 0,8% em tampão tris-borato EDTA (TBE: 10,8 g de Tris base; 5,5 g de ácido bórico; 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0), onde foram aplicados 12,5 µL de amostra e 2,5 µL de tampão de amostra 6x [0,25% (m/v) azul de bromofenol; 0,25% (m/v) xileno cianol FF e 30% (v/v) glicerol], corado em solução de brometo de etídio a 0,0005 mg/mL. A corrida das amostras foi realizada a 80 V até que as amostras penetrassem na malha do gel de agarose, então a voltagem foi aumentada para 120 V e assim permaneceu por 40 min. O gel foi visualizado em luz ultravioleta (302 nm) em aparelho ULTima 16si (Hoefer®).

A escolha do tempo de exposição ao percevejo-marrom que seria analisado por proteômica foi baseada na comparação do perfil proteico unidimensional, em termos de número de bandas, em eletroforese SDS-PAGE para cada série temporal de coleta foliar (24, 48, 72 e 96 h) das variedades Silvana e IAC-100 com e sem injúria de herbivoria.

Após a escolha do método de extração, foram realizadas extrações protéicas de um *pool* de folhas de três plantas de soja em estágio V3 para cada *strip* utilizada, sendo que para cada variedade (Silvânia e IAC-100) foram utilizadas três *strips* para cada tratamento (com e sem herbivoria).

4.5.1.2 Ressolubilização protéica

O *pellet* obtido na extração protéica total, nos métodos de TCA/Acetona e Fenol, foi pesado e para cada 12 mg de *pellet* adicionou-se 1000 µL de tampão de ressolubilização [8,5 M de uréia; 2,5M de tiuréia; 2% (m/v) de CHAPs; 1% (m/v) DTT; 1% (m/v) de Serdolit; 2% (v/v) de tampão IPG 3-11 não linear; 1,5 µL de *Coomassie Brilliant Blue G-250* 1% (m/v) em água deionizada] adaptado de Weiss & Görg (2007), deixando sob agitação a temperatura ambiente por 1 h. Centrifugou-se a 14.000xg por 1 h a 25°C. Após a centrifugação retirou-se o sobrenadante e fez-se uma alíquota de 50 µL para quantificação protéica e análise preliminar em minigel de SDS-PAGE. O sobrenadante obtido e a alíquota foram reservados até o momento do uso a -20°C.

4.5.1.3 Quantificação protéica

As quantificações protéicas foram realizadas de forma que para cada amostra biológica foram feitas três leituras técnicas (triplicatas) para cada um dos métodos de quantificação utilizado: fluorescência por Qubit (Invitrogen®) e Bradford (1976), ambos descritos a seguir. O primeiro apenas foi utilizado para avaliar o rendimento da extração de proteínas obtido pelos métodos por Fenol e TCA/Acetona, conforme manual do fabricante. Nos demais casos, as quantificações foram realizadas pelo método de Bradford.

Para a quantificação protéica pelo método fluorescente por Qubit, 1 μL de amostra foi adicionada a 199 μL de solução de uso (composta por 1 μL de reagente *Quant-iT* em 199 μL de *Buffer Quant-iT*) e incubadas por 15 min a temperatura ambiente, após serem vigorosamente agitadas em vortex. Para a montagem da curva de calibração, 10 μL de padrão foram adicionados a 190 μL de solução de uso.

Para quantificação pelo método de Bradford (1976) foram utilizados 2,5 μL de amostra, diluída 1:2, e 17,5 μL de tampão de ressolubilização para 1 mL de reagente de Bradford preparado no laboratório (1% (m/v) *Coomassie Brilliant Blue G-250*; 5% (v/v) etanol 95%; 10% (v/v) ácido fosfórico). A absorbância de cada amostra foi lida a 595 nm. O branco para as amostras foi feito com 20 μL do mesmo tampão de ressolubilização da amostra. Para a montagem da curva de calibração, 20 μL de cada padrão de albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 2; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 mg/mL foram pipetados em microtubos separados. Para o preparo do branco da curva de calibração, 20 μL de solução 0,9% de cloreto de sódio e 1 mM de azida sódica. Após a adição do reagente de Bradford, os microtubos foram agitados vigorosamente no vortex e incubados a temperatura ambiente por 5 min e a leitura feita a 595 nm em espectrofotômetro SamrtSpecTM Plus (Bio-Rad®).

4.5.1.4 Reidratação das *strips*

Strips são tiras formadas por um gel de poliacrilamida co-polimerizado com um gradiente de pH. O procedimento seguiu as instruções presentes no manual da *strip*, com pH de 3 a 11 não linear, utilizada (ImmobilineTM DryStrip pH 3-11NL, 13 cm, GE

Healthcare®). Foram aplicados 250 µL de tampão de amostra contendo 500 µg de amostra no cassete que acondiciona as *strips*. As *strips* foram então colocadas no suporte com o gel voltado para baixo e evitando-se a formação de bolhas, em seguida cobriu-se toda canaleta com glicerol para evitar o ressecamento ou a contaminação das *strips*. A reidratação ocorreu por 16 h à temperatura ambiente. Ao término da reidratação realizou-se a focalização isoeletrica.

4.5.1.5 Focalização isoeletrica

A focalização isoeletrica foi feita no Sistema Multiphor II Electrophoresis (Pharmacia®) acoplado a um sistema de refrigeração por banho ultratermostatizado (Marconi®) ajustado para permanecer a 20°C, onde as condições de corrida seguiram o manual Immobiline™ DryStrip pH 3-11NL, 13 cm, envolvendo as seguintes etapas detalhadas no quadro 2, com a utilização da fonte Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL (GE Healthcare®). As *strips* não destinadas imediatamente para a eletroforese por SDS-PAGE foram armazenadas individualmente em tubos plásticos a -20°C.

Quadro 2: Etapas da focalização isoeletrica a 20°C.

Etapa	Amperagem (mA)	Voltagem (V)	Potência (W)	Tempo (h:min)	kWh
1	2	300	5	1 min	
2	2	3500	5	1:30	2,9
3	2	3500	5	3:10-4:00	11,1-14,1
Total	-	-	-	4:40-5:30	14,0-17,0

4.5.1.6 Redução e alquilação das *strips*

Após a focalização isoeletrica realizou-se a redução e alquilação, onde em recipiente próprio foram adicionados 8 mL de tampão SDS de equilíbrio [0,05 M Tris-HCl pH 8,8; 6 M uréia; 30% (v/v) de glicerol; 2 % (m/v) de SDS; 20 µL de azul de bromofenol 1% (m/v)] contendo 1% (m/v) de DTT e incubou-se sob leve agitação por 15 min. Trocou-se o tampão por mais 8 mL de tampão SDS de equilíbrio contendo 2,5% (m/v) de iodoacetamida e incubou-se sob leve agitação por 15 min. Após a última

agitação, procedeu-se a eletroforese em SDS-PAGE de acordo com o manual da cuba múltipla Ettan DALTsix (GE Healthcare®), o qual será detalhado a seguir.

4.5.1.7 Eletroforese bidimensional

A eletroforese em SDS-PAGE foi realizada no aparato Ettan DALTsix (GE Healthcare®), acoplado ao sistema de refrigeração TE-2005 (marca Tecnal) ajustado para permanecer a 25°C, em duas etapas descritas no Quadro 3. Os géis foram preparados a 12,5% com 1,5 mm de espessura, corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250* (0,08% (m/v), 20% (v/v) etanol, 1,6% (v/v) ácido fosfórico, 8% (m/v) sulfato de amônio por 3 dias, e descorados com água destilada, renovada por cinco vezes.

Quadro 3: Etapas da eletroforese SDS-PAGE 12,5% a 25°C.

Etapa	Amperagem/gel (mA)	Voltagem (V)	Potência/gel (W)	Tempo (h:m)
1	10	80	1	1:00
2	40	500	13	4:30-6:00

As imagens dos géis foram obtidas através do ImageScanner III (GE Healthcare®) e analisadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare®), e após análise subtrativa diferencial, onde foi analisada a razão dos *spots* entre os tratamentos, fez-se análise estatística dos dados por ANOVA ($p < 0,05$). A razão dos *spots* é obtida através de um calculo realizado pelo programa onde é dado um valor numérico aos *spots* (obtidos através da análise dos pixels e área do *spot*), e esse valor é então dividido pela média dos respectivos *spots* presentes nos três géis de cada tratamento, de cada variedade.

4.5.1.8 Digestão em gel com tripsina

A digestão em gel foi realizada com enzima tripsina de fabricantes diferentes para cada variedade.

Para avaliação do procedimento de digestão com a tripsina, realizou-se em paralelo a digestão de um *spot* referencial, que foi supostamente tido como sendo uma

subunidade ou isoforma da proteína rubisco, como controle positivo, pois é um *spot* normalmente presente em géis de mapa protéico foliares.

1-Digestão dos *spots* diferenciais para a variedade de soja Silvânia:

O preparo da solução tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin*, Promega®) foi realizado de acordo com recomendação do fabricante. A tripsina foi ressolubilizada em 0,05 M de ácido acético de modo a ficar com 1 µg/µL (a proporção de protease/proteína deve ficar entre 1:100 a 1:20).

Microtubos de 1,5 mL foram lavados em metanol e enxaguados em água deionizada e secos em câmara de fluxo laminar. Os *spots* de interesse foram retirados com o auxílio de ponteiros amarelos, previamente lavados em metanol, e colocados em microtubos identificados. Os fragmentos de gel foram descorados através de sucessivas lavagens em etanol 30 %, descartando-se o sobrenadante. Os *spots* foram incubados em solução acetonitrila 50 % contendo 0,025 M de bicarbonato de amônio, sob agitação por 15 min e descartando-se o sobrenadante ao final. Os *spots* foram desidratados com acetonitrila 100 % em volume suficiente para cobri-los, por 10 min sob agitação, e repetiu-se o processo até que os géis/*spots* ficassem opacos. Retirou-se o sobrenadante e secou-se os *spots* em *speed vac* por 20 min. Reidratou-se com 50 µL, para cada *spot*, em solução de digestão 0,05 M Tris-HCl pH 7,6 contendo 1 mM de cloreto de cálcio e 0,5 µL de tripsina a 1 µg/µL previamente aquecida a 30 °C por 15 min e adicionou-se 50 µL de 0,05 M de bicarbonato de amônio. As amostras foram incubadas a 37 °C por 14 a 18 h. Ao final, agitou-se vigorosamente os microtubos por 1 min e procedeu-se uma rápida centrifugação (*spin*). Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C até a realização de espectrometria de massas.

2- Digestão dos *spots* diferenciais para a variedade de soja IAC-100:

O preparo das soluções de uso do kit de digestão “Trypsin Profile IGD Kit” (Sigma®) seguiu as instruções do fabricante.

Os *spots* diferenciais foram retirados dos géis e colocados em microtubos previamente lavados com 100 µL de solução de extração peptídica. Para descorar os

spots, adicionou-se 200 μL de solução descorante e incubou-se a 37 °C por 30 min. Após a incubação, os sobrenadantes foram descartados e repetiu-se o processo. Secou-se os *spots* em centrifuga a vácuo por 20 min e adicionou-se 20 μL (cerca de 0,4 μg de tripsina) de solução de tripsina e 50 μL de tampão de reação de tripsina. Incubou-se a reação por 16 h a 37 °C, após a incubação os microtubos foram armazenados a -20 °C até a realização da espectrometria de massas.

4.5.1.9 Espectrometria de massas

Após a digestão das amostras com tripsina, essas foram preparadas em placa de MALDI AnchorChip 384/600 na proporção de 2 μL de amostra para 2 μL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e analisadas no equipamento Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics®). Os parâmetros utilizados para a obtenção dos espectros de MS foram: faixa de massa de 600 a 3500 Da; programa FlexControl 3.3.108.0; RP_PEPI MIX; com 200 disparos automáticos, numa frequência de 200 Hz; laser entre 20-45 %; deflecção de massa de 600 Da; modo refletivo positivo e calibração externa por *Peptide Calibration Standard 1*. O método de obtenção de MS/MS foi o LIFT, com 2000 disparos, sendo 400 para o precursor e 1600 para os fragmentos; laser entre 22 a 55 %; os demais parâmetros iguais aos citados anteriormente. Os espectros de MS foram então analisados (sequenciados) pelo programa Mascot e a busca de similaridade no banco de dados foi realizada através do BLASTp. Os parâmetros utilizados no programa Mascot para o método de MS/MS foram: (i) NCBIInr como banco de dados; (ii) viridiplantae, como taxonomia; (iii) modificações fixas: carbomidometilação das cisteínas; (iv) modificação variável: oxidação da metionina; (v) foram consideradas os valores de massas monoisotópicos dos espectros; (vi) tolerância de massas dos peptídeos e dos fragmentos de 150 partes por milhão (ppm); (vii) tolerância dos fragmentos de $\pm 0,05$ Da. Tais tolerâncias consideram a perda de um sítio de clivagem devido a hidrolese por tripsina.

5. Resultados

5.1 Resultados das atividades enzimáticas

5.1.1 Variedade Silvânia

Durante a coleta das folhas foram observados sinais de alimentação em todas as plantas do bioensaio. Para a enzima catalase foi observado que a atividade do grupo com injúria foi menor do que a atividade do grupo sem injúria de herbivoria. A atividade no tempo de 24 h não apresentou diferença entre os grupos com e sem injúria, apresentando diferença significativa entre os tratamentos a partir de 48 h (Fig. 10). Quando houve exposição ao percevejo-marrom não houve diferença significativa entre a atividade da catalase em função do tempo de herbivoria. Quando não houve injúria, a atividade foi maior no tempo de 48 h que nos de 24 e 96 h, mas não diferiu do de 72 h. Quando comparamos a atividade em função da injúria em cada tempo individualmente, apenas nos tempos de 48 e 72 h houve diferença na atividade da catalase, mas não nas primeiras e últimas 24 h de herbivoria.

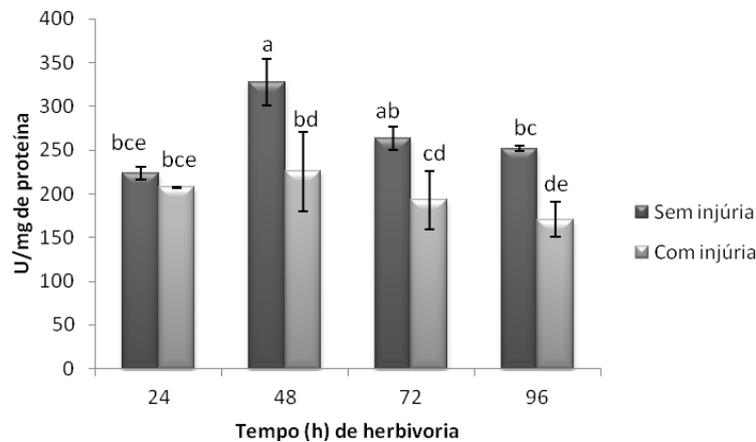


Fig. 10. Atividade temporal da enzima catalase em folhas de soja Silvânia em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom. Cada grupo possui n=3. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para a guaiacol peroxidase, observou-se uma maior atividade enzimática em todos os tempos do grupo com injúria de herbivoria. A atividade da enzima apresentou resposta logo nas 24 h iniciais da injúria (Fig. 11). Quando houve exposição ao percevejo-marrom a atividade da guaiacol foi maior após 96 h de herbivoria, do que com 24 e 72 h, mas não diferiu a 48h. Quando não houve injúria, a atividade apenas foi

diferente entre os tempos de 24 e 96 h. A atividade da guaiacol é aumentada pela herbivoria do percevejo-marrom.

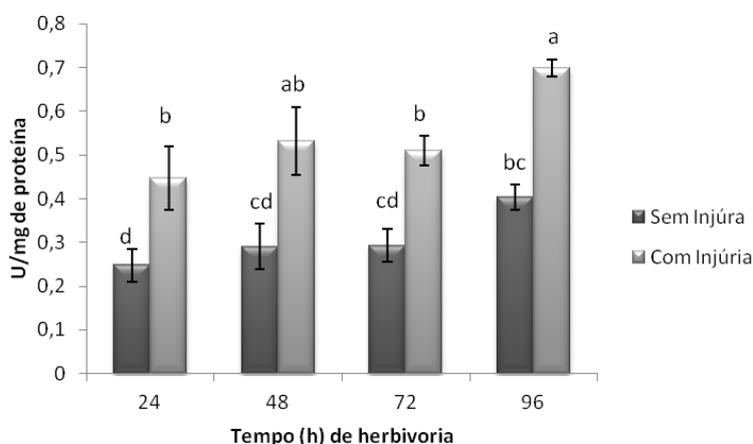


Fig. 11. Atividade temporal da enzima guaiacol peroxidase em folhas de soja Silvânia em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom. Cada grupo possui n=3. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade enzimática da ascorbato peroxidase não variou em função do tempo de exposição à herbivoria, bem como em função de haver injúria de herbivoria pelo percevejo-marrom (Fig. 12).

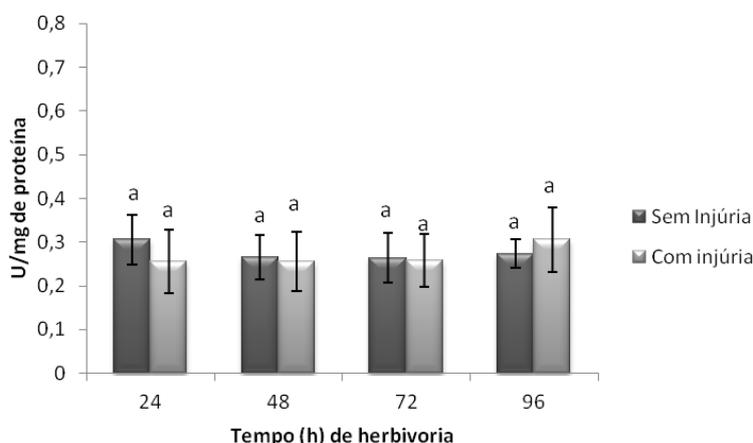


Fig. 12. Atividade temporal da enzima ascorbato peroxidase em folhas de soja Silvânia em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom. Cada grupo possui n=3. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A enzima lipoxigenase 3 não apresentou diferença entre os tratamentos e os tempos de 24 h e 48 h, seguida de um pico da atividade após 72 h de injúria pela herbivoria do percevejo-marrom, e de uma queda na atividade após 96 h de injúria, porém mantendo-se maior que o grupo sem injúria de herbivoria (Fig. 13). Quando não

houve injúria, a atividade da LOX 3 manteve-se inalterada. A atividade aumenta após 48 h de herbivoria pelo percevejo-marrom.

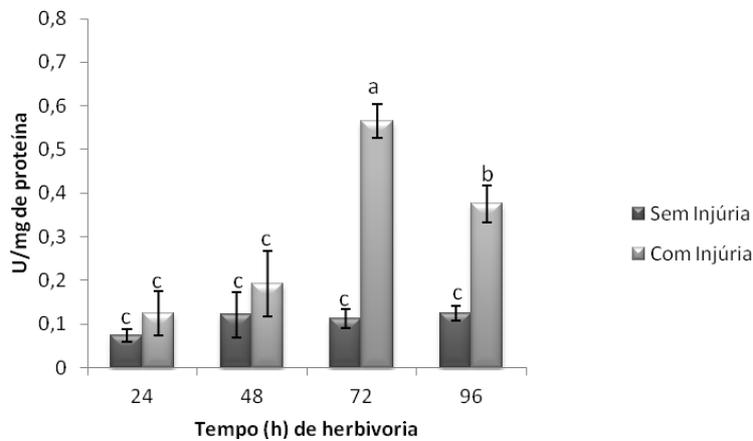


Fig. 13. Atividade temporal da enzima lipoxigenase 3 em folhas de soja Silvânia em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom. Cada grupo possui n=3. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

5.1.2 Variedade IAC-100

As atividades enzimáticas das enzimas CAT, GPOx, APX e LOX 3 não variaram em função do tempo de exposição a herbivoria, bem como em função de haver injúria de herbivoria pelo percevejo-marrom (Figs. 14 a 17, respectivamente).

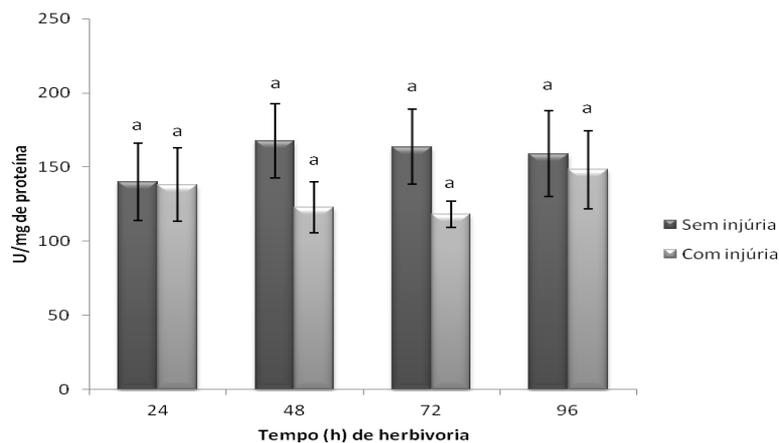


Fig. 14. Atividade temporal da enzima catalase em folhas de soja IAC-100 em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom. Cada grupo possui n=3. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

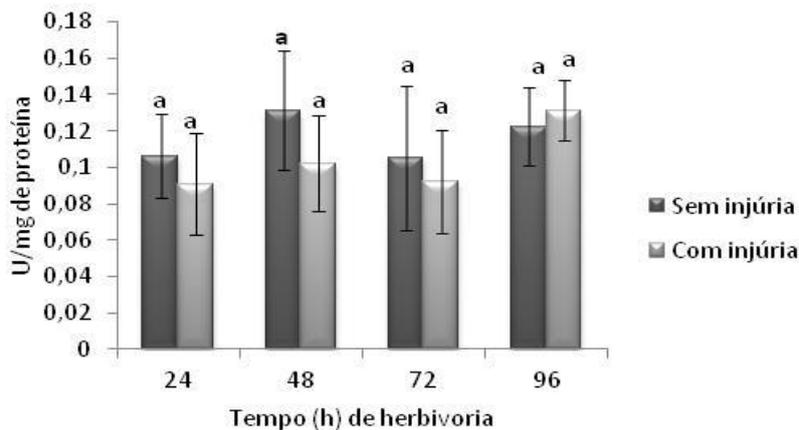


Fig. 15. Atividade temporal da enzima guaiacol peroxidase em folhas de soja IAC-100 em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom. Cada grupo possui n=3. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

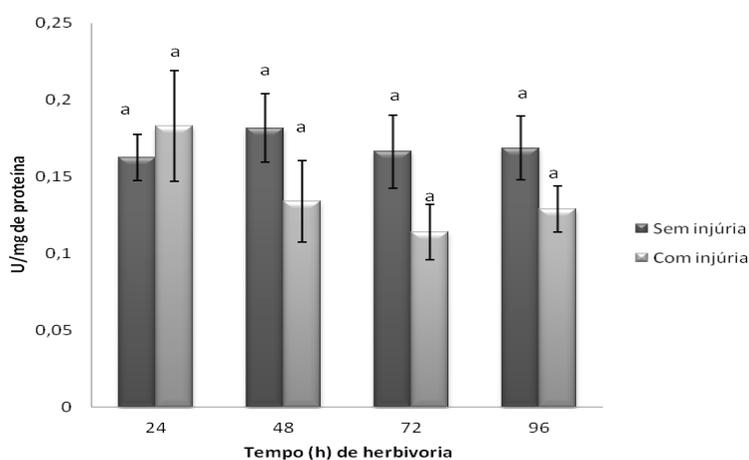


Fig. 16. Atividade temporal da enzima ascorbato peroxidase em folhas de soja IAC-100 em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom. Cada grupo possui n=3. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

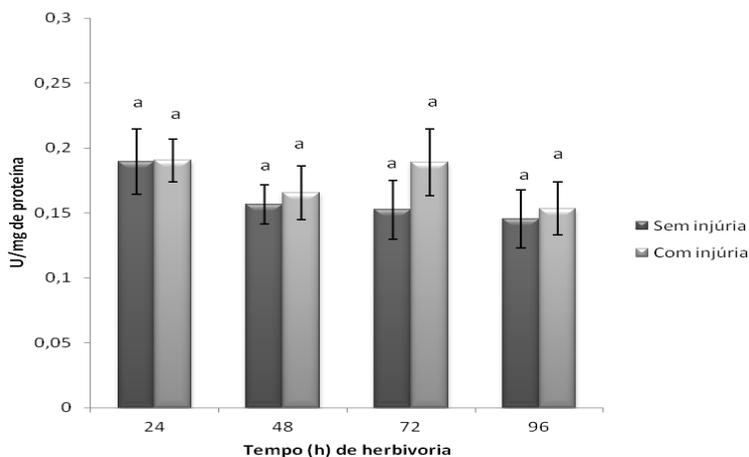


Fig. 17. Atividade temporal da enzima lipoxigenase 3 em folhas de soja IAC-100 em estágio V3 com e sem injúria de herbivoria do percevejo-marrom. Cada grupo possui n=3. Médias de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Comparando as atividades das enzimas do grupo controle das variedades IAC-100 e Silvânia, considerando cada tempo como n=1 e tirando-se a média desses valores (Tabela 1), pôde-se observar que a variedade Silvânia (susceptível) possui uma maior atividade das enzimas por mg de proteína do que a variedade IAC-100. Porém para a enzima LOX 3, a variedade Silvânia apresentou uma menor atividade do que a variedade IAC-100.

Tabela 1. Comparação entre as atividades enzimáticas do grupo sem injúria das sojas variedades Silvânia e IAC-100, considerando cada tempo como uma unidade experimental (ANOVA $p < 0,05$).

Enzimas	Silvânia	IAC-100	Valor- <i>p</i>
	U/mg de proteína	U/mg de proteína	
Catalase	266 ± 43	157 ± 25	$p=0,03$
Guaiacol Peroxidase	0,30 ± 0,06	0,11 ± 0,02	$p < 0,001$
Ascorbato Peroxidase	0,27 ± 0,02	0,17 ± 0,02	$p < 0,002$
Lipoxigenase 3	0,11 ± 0,02	0,16 ± 0,03	$p=0,02$

De maneira geral pode-se afirmar que: a) a variedade Silvânia em estágio V3 ao sofrer herbivoria pelo percevejo-marrom aumenta a resposta antioxidante, ou seja, a injúria altera sua fisiologia no sentido de minimizar alterações oxidativas provocadas pelo estresse biótico; b) a variedade IAC-100 no mesmo estágio fenológico, por outro lado, não apresentou resposta das enzimas após herbivoria do percevejo-marrom, sendo menos sensível à sua injúria. Além disso, apresentou menor atividade constitutiva (em geral) que a variedade Silvânia.

5.2 Proteômica

5.2.1 Comparação entre as extrações protéicas

O método de extração protéica escolhido para as análises de proteômica foi o de TCA/Acetona devido ao maior rendimento proteico (Tabela 2), a eliminação do DNA genômico das amostras (Fig. 18) e por apresentar uma menor concentração de proteínas de massa molecular de aproximadamente 50 kDa (Fig. 19), massa aproximada da proteína rubisco. Mesquita *et al.* (2012) relatam que a extração protéica total de folhas de soja pelo método Fenol apresentou maior número de subunidades da proteína rubisco do que o método de TCA/Acetona e, de acordo com Ahsan *et al.* (2007) e Lee

et al. (2007) a presença da proteína rubisco por possuir uma maior concentração que as outras proteínas, pode interferir na análise das proteínas de menor concentração. Não houve diferença estatística significativa (ANOVA, $p > 0,5$) quanto à diversidade e abundância de bandas obtidas a partir dos métodos de extração TCA/Acetona ($21,5 \pm 5,9$) e Fenol ($22,2 \pm 5,3$) (Fig. 19 e Tabela 2), porém é possível observar ainda que na extração pelo método de TCA/Acetona proteínas de menor massa molecular apresentaram maior concentração.

Tabela 2. Massa, concentração protéica total e número de bandas obtidas pelos métodos de extração TCA/acetona e fenol em folhas de soja da variedade Silvania em V3.

Réplicas	TCA/Acetona			Fenol		
	Massa de Folha (mg)	Conc. (mg)	Número de bandas	Massa de Folha (mg)	Conc. (mg)	Número de bandas
Planta 1	18	0,11	25	18	0,07	26
Planta 2	10	0,15	28	10	0,10	27
Planta 3	16	0,05	24	16	0,05	20
Planta 4	16	0,12	21	16	0,05	27
Planta 5	19	0,10	20	19	0,04	18
Planta 6	12	0,06	11	12	0,02	15

Concen: concentração protéica total.

1a 1b 2a 2b 3a 3b 4a 4b 5a 5b 6a 6b

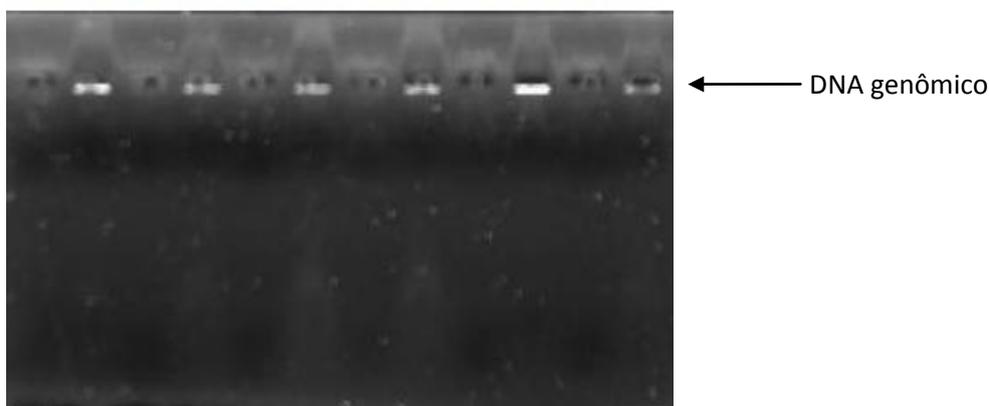


Fig. 18. Comparação quanto a eficiência de eliminação de DNA genômico da extração protéica total pelos métodos de TCA/acetona e por fenol (Gel de Agarose 0,8% corado em brometo de etídeo 0,0005 mg/mL). Números iguais: mesma planta; letra **a**: extração por TCA/acetona; letra **b**: extração por fenol.

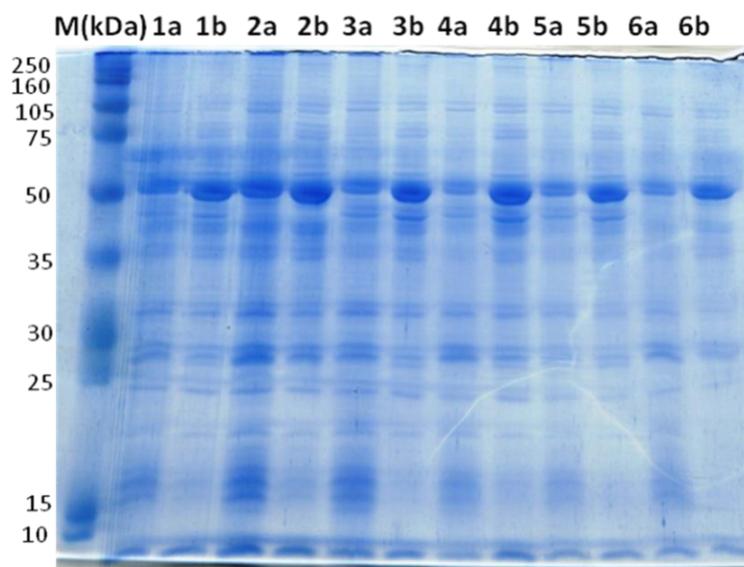


Fig. 19. Comparação quanto ao número de bandas entre os métodos de extração protéica total por TCA/acetona e por fenol (SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*). Marcador *Full Range Rainbow RPN800* (Amersham); Trilhas 1 e 3 com 2,25 µg de proteína; trilhas 2 com 4,25 µg; trilhas 4 com 2 µg; trilhas 5 com 1,75 µg e trilhas 6 com 1 µg. Números iguais: mesma planta; **a: extração por TCA/acetona; **b**: extração por fenol.**

5.2.2 Comparação entre os tempos de herbivoria

O tempo de exposição das variedades de soja a herbivoria do percevejo-marrom escolhido para as análises de proteômica foram o de 24 e 96 h (Fig. 13), porém devido a problemas técnicos não foi possível realizar a análise das amostras de 96 h. Foram observadas diferenças significativas no perfil protéico, em termos do número médio de bandas, na variedade IAC-100 no tempo de 96 h sem injúria quando comparado aos outros sem e com injúria (ANOVA, valor- $p < 0,001$); e na variedade Silvânia no tempo de 72 h do grupo com injúria quando comparado aos outros tempos sem e com injúria (ANOVA, $p < 0,001$) (Tabela 4).

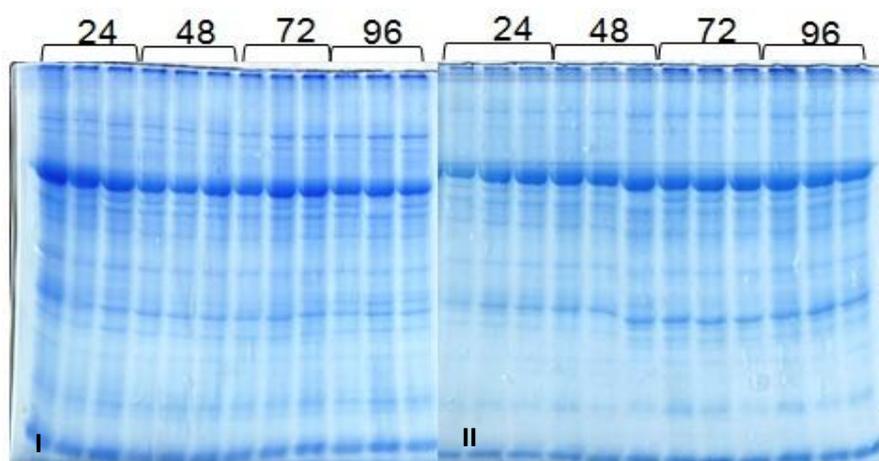


Fig. 20. Perfil proteico foliar da variedade de soja Silvânia, em intervalos de 24 a 96 h, sem e com injúria de herbivoria pelo percevejo-marrom (SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*). “Triplicata” das extrações protéicas (I) do grupo com injúria e (II) sem injúria. Trilhas com 5 µg de proteína.

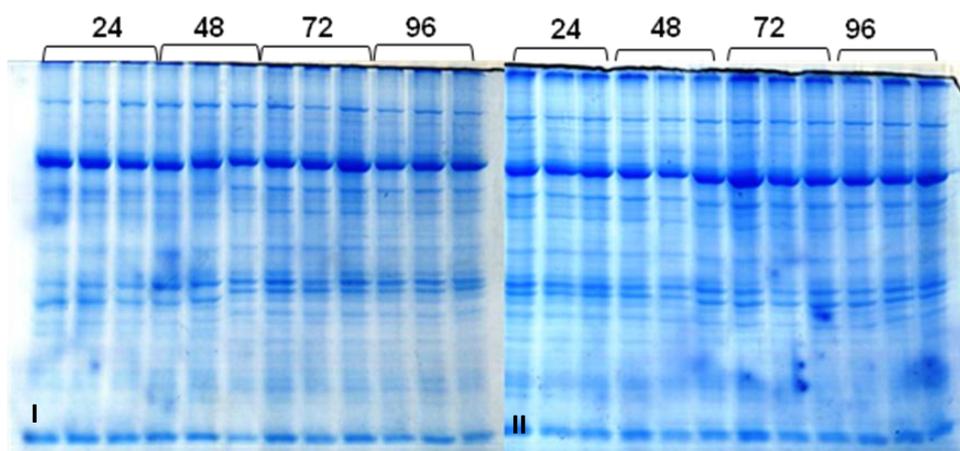


Fig. 21. Perfil proteico foliar da variedade de soja IAC-100, em intervalos de 24 a 96 h, sem e com injúria de herbivoria pelo percevejo-marrom (SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*). Triplicata das extrações protéicas (I) do grupo com injúria e (II) sem injúria. Trilhas com 2 µg de proteína.

Tabela 4. Número médio de bandas observadas em gel de SDS-PAGE 12 % das variedades IAC-100 e Silvânia em estágio V3, sem e com injúria de herbivoria por 24, 48, 72 e 96 h. Médias de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (ANOVA e teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tempo de Herbivoria (h)	Número médio de bandas relacionadas a injúria			
	IAC-100		Silvânia	
	Sem herbivoria	Com herbivoria	Sem herbivoria	Com herbivoria
24	15,33 ± 0,6 a	14,33 ± 0,6 a	15 ± 1 a	12,66 ± 1,2 a
48	14 ± 1 a	15,33 ± 1,5 a	14,33 ± 0,6 a	13,33 ± 0,6 a
72	14,33 ± 1,5 a	16,66 ± 0,6 a	15 ± 0 a	12 ± 1 b
96	11 ± 1 b	16 ± 1 a	14,66 ± 0,6 a	13 ± 0 a

-: grupo sem injúria; +: grupo com injúria do percevejo-marrom.

5.2.3 Eletroforese bidimensional

Após selecionarmos o tempo de exposição da soja ao percevejo-marrom, realizamos nova extração protéica foliar no tempo de 24 h dos grupos sem e com injúria de herbivoria, pelo método TCA/Acetona para análise em gel bidimensional.

5.2.3.1 Análise da soja variedade Silvânia

Ao término das extrações as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford, normalizadas para 16,35 μg e avaliadas em um minigel SDS-PAGE 10% (Fig. 14) para confirmação da homogeneidade da quantidade de proteína total entre as amostras.

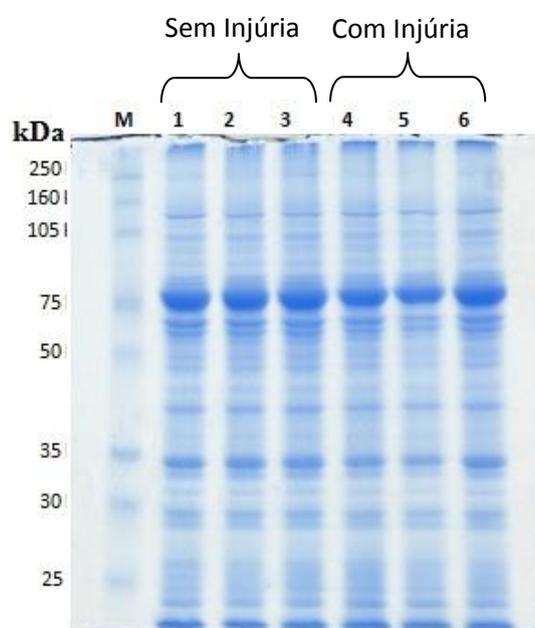


Fig. 22. Normalização da extração protéica total foliar de soja V3 da variedade Silvânia (SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*). **M:** Marcador pré-corado *Full Range Rainbow RPN800* (Amersham®). Grupo sem injúria trilhas: 1 a 3; Grupo com injúria: trilhas 4 a 6.

Após normalização baseada na quantificação protéica e no minigel, foram então aplicados 250 μL de extrato protéico bruto contendo 500 μg de proteína em cada uma das seis *strips* de 13 cm pH 3-11 NL para a focalização isoeletrica e eletroforese por SDS-PAGE. Três *strips* foram utilizadas para o grupo sem injúria e três para grupo com injúria de herbivoria, gerando um total de seis géis, sendo apresentada apenas uma das réplicas dos géis do grupo sem (Fig. 23 I) e do grupo com injúria (Fig. 23 II). Os três géis de cada grupo podem ser visualizados no Anexo 1.

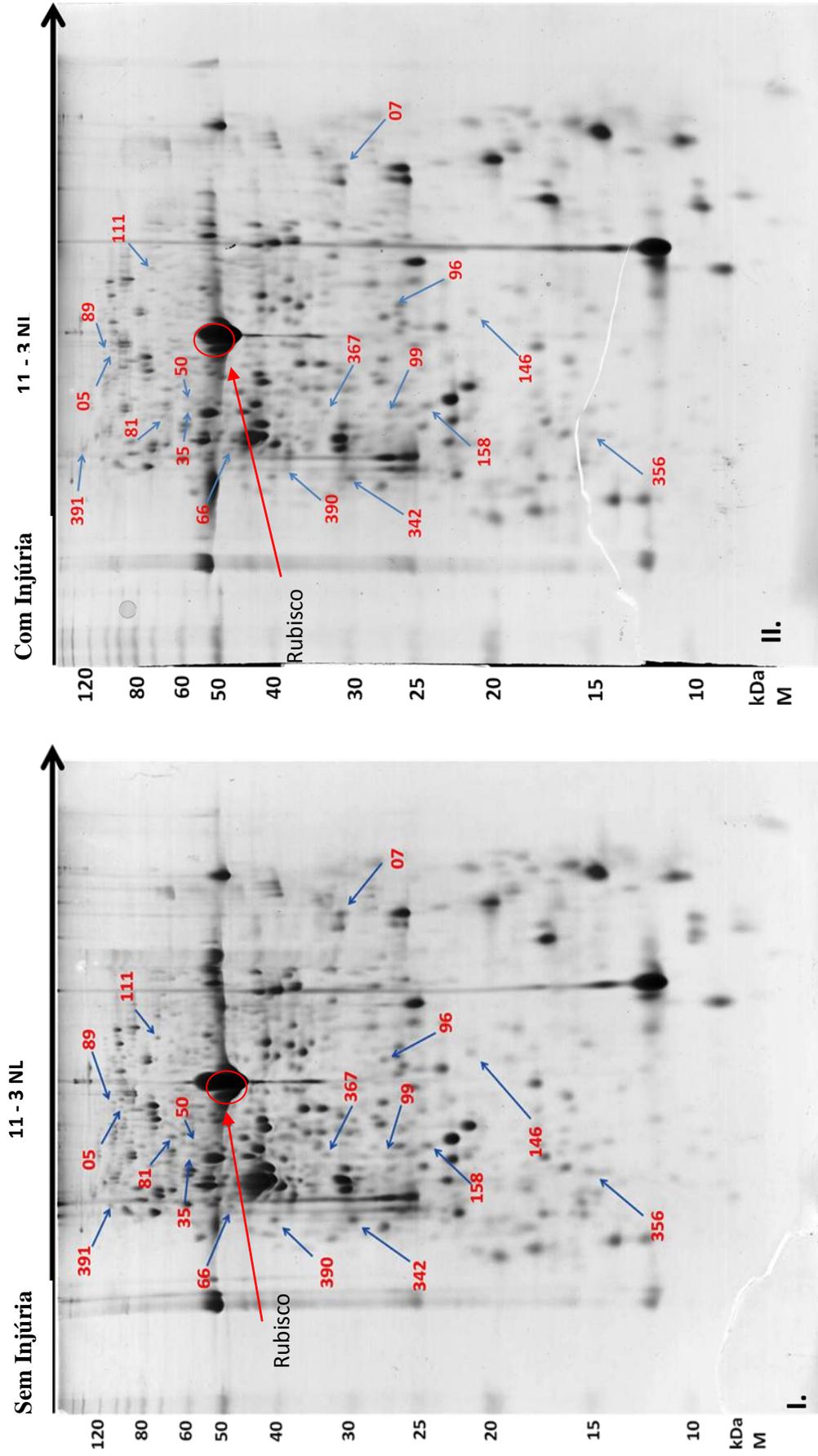


Fig. 23. Gel Bidimensional do perfil proteico foliar da variedade de soja Silvânia em estágio V3. I. Sem herbivoria do percevejo-marrom; II. com injúria de herbivoria. SDS-PAGE 12,5% corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Cada gel contém 500 µg de proteína. Os spots diferenciais estão indicados por setas e os números indicam a identificação. M: Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen®).

Foram identificadas 17 proteínas expressas em níveis diferenciais (Fig. 23) entre os grupos sem e com injúria de herbivoria para a variedade Silvânia, sendo que oito apresentaram aumento e nove diminuição em sua expressão (Tabela 5 e Fig. 24). Não foram identificadas proteínas exclusivamente expressas devido a herbivoria.

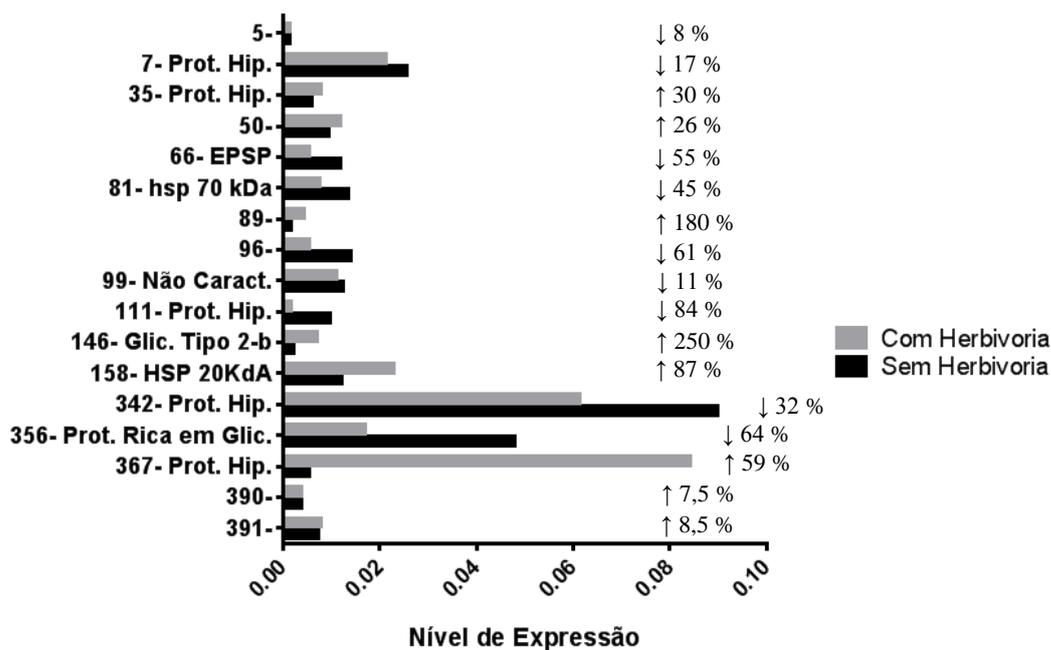


Fig. 24. Proteínas com níveis diferenciais expressas em folhas da variedade de soja Silvânia em estágio V3 sob injúria do percevejo-marrom. Os números correspondem à identificação dos *spots* no mapa protéico, e os que não apresentam descrição não foram identificadas as famílias protéicas a que pertencem. Os valores em porcentagem indicam em quanto a expressão da proteína foi alterada no grupo com injúria comparando ao sem injúria. Expressão em unidades arbitrárias.

Tabela 5. Identificação das proteínas com níveis diferenciais de expressão devido à herbivoria do percevejo-marrom em folhas de soja variedade Silvânia em estágio V3, após fracionamento por eletroforese bidimensional, obtenção de espectros por MALDI-TOF, e identificação utilizando-se os programas Mascot e o BLASTp, por MS/MS ($p < 0,05$). **pI:** ponto isoelétrico.

Identificação dos spots	Proteína /Taxonomia	pI	Score	Acesso no GenBank	Sequencia dos peptídeos
Controle +	Subunidade grande da Rubisco / (<i>Arenaria drummondii</i>)	6,13	184	gi 131911	ELGVPIVMHDYITGGFT ANTSLAHYCR
07	Proteína hipotética (Região identificada: GAT_1- “Type 1 glutamine aminotransferase – like)/ (<i>Glycine max</i>)	5,43	117	gi 255639997	LSDFFEILATSEDR
35	Proteína hipotética / (<i>Oryza sativa Japonica Group</i>)	5,58	30	gi 40538952	GFIMKGATNATVDSMV
66	CP4EPSPS/ (<i>Glycine max</i>)	5,13	57	gi 18266432	SAVLLAGLNTPGITTVIE PIMTR
81	Proteína mitocondrial de choque térmico de 70 kDa/ (<i>Glycine max</i>)	-	65	ref XP_003545743. 1	AVITVPA YFNDAQR
99	Proteína não caracterizada LOC100500579 (Região identificada: STI “Inibidor de tripsina de soja, da família de inibidores de protease”)/ (<i>Glycine max</i>)	-	37	gi 351724211	GFPITISSPAR
111	Proteína hipotética SORBIDRAFT_03g031895 / (<i>Sorghum bicolor</i>)	-	136	gi 242054087	LSGIIPVHIGKLTK
146	Proteína rica em glicina tipo 2b/ (<i>Glycine max</i>)	6,29	130	gi 356538622	SLAEGESVEFAIESESDG R

158	Chaperona tipo cloroplástica de 20 kDa/(<i>Glycine max</i>)	-	146	gi 356556406	DKPSIGTVIAVGPGHLDEEG NR
342	Proteína hipotética VITISV_038929/(<i>Glycine max</i>)	5,43	90	gi 147800453	SLLYVETADRPGLLVDLVK
356	Proteína rica em glicina ligante de RNA/(<i>Glycine max</i>)	6,58	77	gi 351725469	AFSQYGEIVETK
367	Proteína hipotética (Região identificada: SGNH_plant_lipase_like, pertencentes à família das hidrolases) /(<i>Glycine max</i>)	5,83	85	gi 255646252	AFFVFGDSLVDNGNNNFLA TTAR

Continuação da Tabela 4.

5.2.3.2 Análise da soja variedade IAC-100

Assim como para a variedade Silvânia, ao término das extrações as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford, normalizadas para 18,6 µg e avaliadas em um minigel SDS-PAGE 10% (Fig. 25) para confirmação da homogeneidade da quantidade de proteína total entre as amostras.

Após normalização baseada na quantificação protéica e no minigel, foram então aplicados 250 µL de extrato protéico bruto contendo 500 µg de proteína em cada uma das seis strips de 13 cm pH 3-11 NL para a focalização isoeétrica e eletroforese por SDS-PAGE. Três strips foram utilizadas para o grupo sem injúria (Fig. 26 I) e três para grupo com injúria de herbivoria (Fig. 26 II). Os três géis de cada grupo podem ser visualizados no anexo 2.

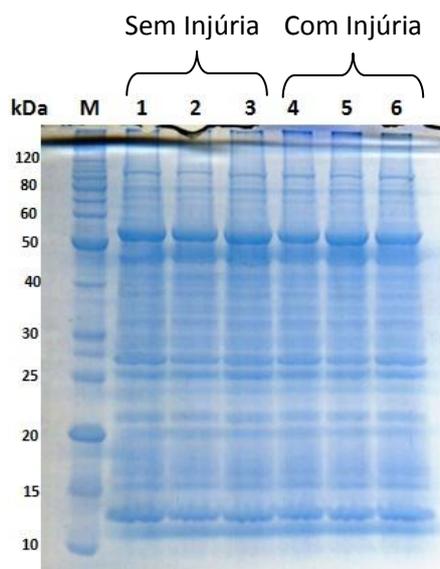


Fig. 25. Normalização da extração protéica total foliar da variedade IAC-100 (SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*). **M:** Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen®). Grupo sem injúria trilhas 1 a 3; Com injúria trilhas 4 a 6. Cada trilha possui 18,6 µg de proteína.

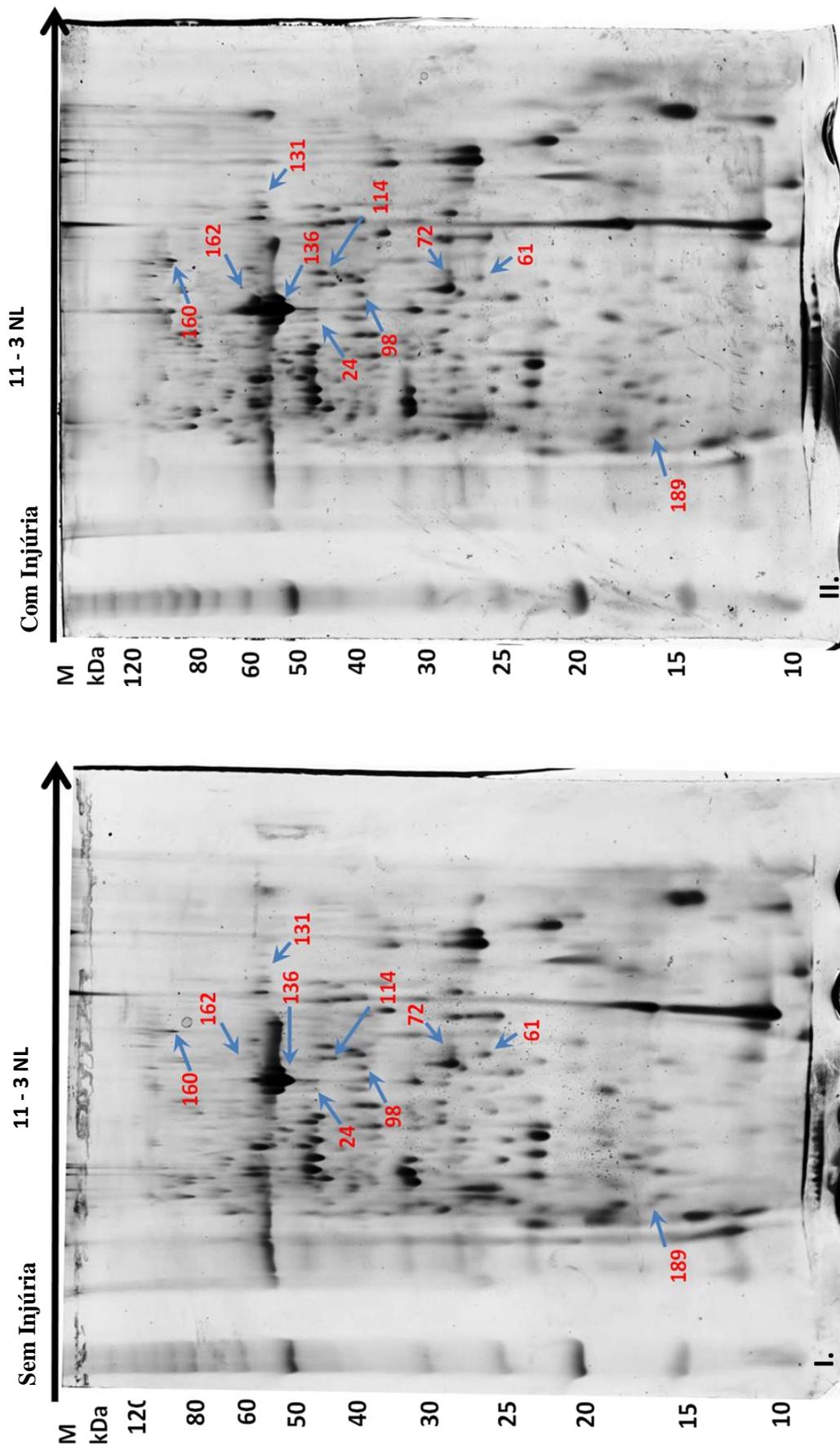


Fig. 26. Gel Bidimensional do perfil protéico foliar da variedade de soja variedade IAC-100 em estágio V3. I. Sem herbivoria do percevejo-marrom; II. com injúria de herbivoria. Gel SDS 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue G-250. Cada gel contém 500 µg de proteína. Os spots diferenciais estão indicados por setas e os números indicam a identificação. M: Marcador BenchMark Protein Ladder (Invitrogen®)

Foram identificadas 10 proteínas expressas em níveis diferenciais entre os grupos sem e com injúria de herbivoria para a variedade IAC-100, sendo que quatro apresentaram um aumento na sua expressão, enquanto que seis, redução (Tabela 6 e Fig. 26 e 27), sendo que dessas apenas foi possível identificar a função de duas (Tabela 5). Novamente não foram identificadas proteínas exclusivamente expressas sob estresse de herbivoria.

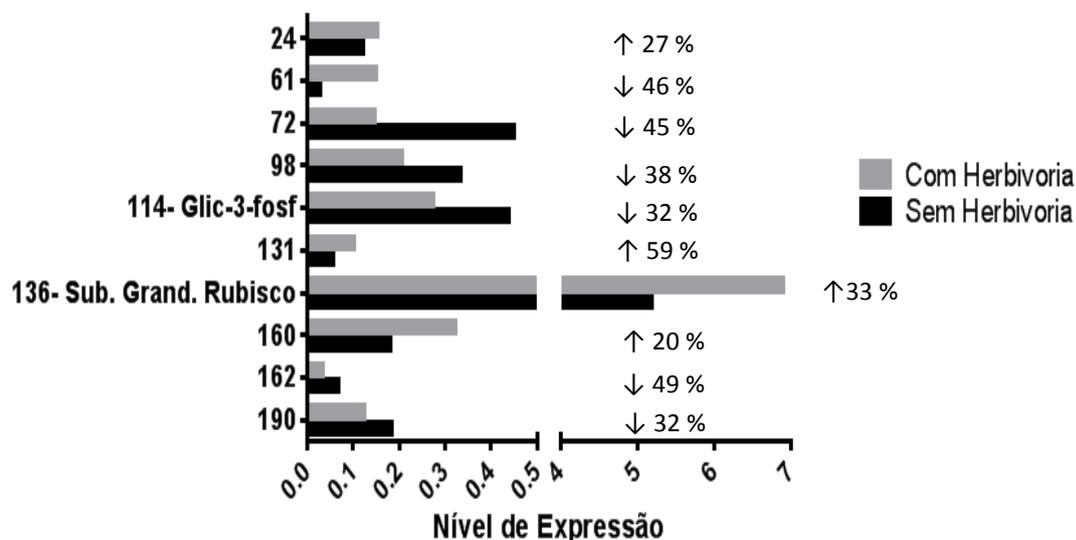


Fig. 27. Proteínas diferencialmente expressas em folhas da variedade de soja variedade IAC-100 em estágio V3 sob injúria do percevejo-marrom. Os números correspondem à identificação dos *spots* no mapa protéico, e os que não apresentam descrição não foram identificadas as famílias protéicas a que pertencem. Os valores em porcentagem indicam em quanto à expressão da proteína foi alterada no grupo com injúria comparado ao sem injúria. Expressão em unidades arbitrárias.

Tabela 5. Identificação das proteínas com níveis diferenciais de expressão devido à herbivoria do percevejo-marrom em folhas de soja da variedade IAC-100 em estágio V3, após fracionamento por eletroforese bidimensional, obtenção de espectros por MALDI-TOF e identificação, utilizando-se os programas Mascot e BLASTp, por MS/MS ($p < 0,05$). **pI:** ponto isoelétrico

Identificação dos spots	Proteína /Taxonomia	pI	Score	GenBank	Sequencia dos peptídeos
114	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase NADP/ (<i>Spinacia oleracea</i>)	6,66	64	gi 66026	VIAWYDNEWGYSQR
136	Subunidade grande da Rubisco/ (<i>Bursera inaguensis</i>)	6,09	67	gi 131921	FLFCAEAIK

6. Discussão

6.1 Atividades enzimáticas

Neste estudo a variedade de soja Silvânia não apresentou diferença significativa na atividade da catalase em função do tempo de herbivoria, porém atividade da enzima apresentou um pico no tempo de 48 h no grupo sem injúria seguida de uma queda nos tempos de 72 e 96 h. Quando avaliado a injúria em cada tempo individualmente, observa-se que a atividade no grupo com injúria é menor do que no grupo sem injúria a partir de 48 h de herbivoria. Assim é possível inferir que a enzima catalase diminuiu devido à herbivoria e demora 48 h para responder a esse estresse.

Infere-se ainda que a herbivoria do percevejo-marrom induziu algum tipo de resposta e que essa resposta interferiu na atividade da enzima catalase, que apresentou atividade diminuída (Fig. 10) para que haja o acúmulo do H_2O_2 no meio celular, já que esse composto pode agir como sinalizador em determinados tipos de estresse. Em conjunto com outras espécies reativas de oxigênio, o H_2O_2 ativa genes de resposta de hipersensibilidade, da biossíntese de fitoalexinas, lignina, enzimas hidrolíticas, dentre outras (Taiz & Zeiger, 2006; Kessler & Baldwin 2002), que poderiam atuar na tentativa da soja de minimizar os efeitos da herbivoria.

Ni *et al.* (2001) relataram que em estudo realizado com as espécies de pulgão *Diuraphis noxia* e *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae), não observaram modificações na atividade da enzima foliar catalase em nenhum dos tempos de herbivoria estudados (três, seis e nove dias após a infestação), em variedades de cereais resistentes e susceptíveis. Gomez *et al.* (2004) em estudo realizado com pulgão-do-algodoeiro (*Aphis gossypii*) e algodão, observaram que a atividade da enzima foliar catalase também não apresentou alteração após seis e nove dias de infestação. Tschardtke *et al.* (2001) relataram que a atividade foliar da enzima catalase em árvores de amieiro (*Alnus glutinosa*) não apresentou diferença entre folhas intactas e folhas que sofreram herbivoria de larva do besouro de folha *Agelastica alni* (Coleoptera: Chrysomelida).

Bi & Felton (1995) relataram que a atividade da catalase diminuiu após a herbivoria de larva *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de soja em

estágio V4 por um período de 96 h. Chen *et al.* (2009) não detectaram diferença entre a atividade enzimática da catalase em folhas de nozes pecã, após sofrer herbivoria do pulgão *Melanocallis caryaefoliae* (Hemiptera: Aphididae), a atividade da enzima lipoxigenase 1 (LOX 1) apesar de variável não foi afetada significativamente, porém as atividades das enzimas peroxidase e lipoxigenase 3 (LOX 3) foram significativamente afetadas, sugerindo que essas enzimas estariam relacionadas a uma maior resistência dessa cultura contra a herbivoria do pulgão..

Tscharntke *et al.* (2001) relataram que a enzima guaiacol peroxidase, assim como a lipoxigenase, apresentaram aumento significativo em suas atividades após as 72 h de herbivoria de *A. alni* em folhas do amieiro. Bi & Felton (1995) relataram que a atividade dessas enzimas aumentou em folhas de soja que sofreram herbivoria da larva *H. zea*, e que a LOX (medidas em pH 7 e 8,5) apresentou uma maior atividade no tempo de 72 h, resultado que corrobora com os resultados observados neste estudo da soja variedade Silvânia. Relataram ainda que a enzima ascorbato peroxidase apresentou aumento da atividade no decorrer do tempo, sendo que sua atividade máxima foi observada no tempo de 96 h.

Silva *et al.* (2004) em estudo realizado sobre *pool* de lipoxigenases em folhas de soja IAC-100 após a herbivoria de mosca-branca (*Bermisia argentifolli*) relataram que a atividade da lipoxigenase diminuiu após 72 h. Genes de expressão da LOX são regulados por diferentes fatores, dentre eles a herbivoria (Porta *et al.*, 1999).

Em estudo realizado em folhas de tabaco esmagadas, Lagrimini & Rothstein (1987) observaram que a enzima guaiacol peroxidase estava com atividade máxima após 72 h da injúria física, vindo a cair após esse período. Tal resultado é contrário ao observado na folha da variedade Silvânia, onde a atividade enzimática continuou aumentando mesmo passado as 72 h da injúria do percevejo-marrom (Fig.11).

Estudos relataram que a guaiacol peroxidase tende a aumentar após ataques de insetos e que esta enzima está relacionada à produção de compostos como o etileno, um hormônio vegetal produzido como resposta a injúrias, infecções por patógenos dentre outros (Grossfopf *et al.*, 1991; Thaler *et al.*, 1996). O'Donnell *et al.* (1996) relatam que o etileno juntamente com o jasmonato são intermediários na regulação da expressão de genes de defesa. Neste sentido, a ativação da GPOx observada no presente estudo

poderia induzir uma resposta similar na soja, numa tentativa de minimizar o estresse da herbivoria.

Moran *et al.* (2002), relatam que em estudo da interação entre *Arabidopsis thaliana* e pulgão, a expressão de genes de enzimas antioxidantes foram regulados tanto positiva quanto negativamente, onde a expressão dos genes de glutathiona-S-transferase (GST) e da Cu/Zn-SOD aumentaram enquanto que a expressão de Fe-SOD e o glutathiona peroxidase diminuíram. Ni *et al.* (2001) relatam o aumento da atividade das peroxidases guaiacol, catalase e polifenol oxidase, em folhas de trigo após herbivoria do pulgão (*Diuraphis noxia*). Relatam ainda que a atividade da peroxidase em folhas de cevada foi significativamente maior em plantas susceptíveis do que em plantas resistentes, após a herbivoria do pulgão (*Diuraphis noxia*). Leszcnski (1985) observou que a atividade da polifenol oxidase em folhas de trigo foi significativamente maior em plantas susceptíveis do que em plantas resistentes, após a herbivoria do pulgão (*Rhopalosiphum padi L.*). Desta forma, o estudo de enzimas como a SOD, a glutathiona peroxidase e a GST pode ser valioso para aumentar o entendimento da resposta bioquímica, da variedade Silvânia, à herbivoria.

A herbivoria do percevejo-marrom não interferiu na atividade das enzimas estudadas na variedade IAC-100, mesmo por um período de 96 h (Fig. 14 a 17), sugerindo que a herbivoria do percevejo-marrom não afetou os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio. Já a variedade Silvânia apresentou alterações na atividade das enzimas CAT, GPOx e LOX 3. De maneira geral a variedade Silvânia apresenta uma atividade antioxidante constitutiva maior do que a variedade IAC-100, porém quando comparada a atividade constitutiva da lipoxigenase, a variedade IAC-100 possui atividade superior à Silvânia. Tal resultado pode ter relação direta com a classificação de variedade resistente, pois de acordo com Farmer *et al.* (1992) a produção de ácido jasmônico a partir do ácido linoleico, uma das funções da lipoxigenase, age como estímulo para a expressão de genes com função de sinalização para de genes de defesa. De acordo com Devi *et al.* (2000) a elevada atividade da lipoxigenase pode ser constitutiva em plantas resistentes e que podem vir a aumentar após o dano. A relevância da LOX no processo de herbivoria se verifica ainda pelo aumento de sua atividade na variedade Silvânia (Fig. 13).

A lipoxigenase está relacionada á formação de oxilipinas através da oxigenação de ácidos graxos. As oxilipinas são um grupo de moléculas sinalizadoras como o jasmonato, metil-jasmonato dentre outras, compostos conhecidos por possuírem papéis na defesa vegetal (Kazan & Manners, 2008). Outros estudos relataram ainda que outros derivados da lipoxigenase participam da defesa vegetal através da regulação da expressão de genes, da morte celular ou ainda produtos antimicrobianos (Kishimoto *et al.*, 2008; Montillet *et al.*, 2005; Prost *et al.*, 2005).

Para uma melhor avaliação do estado redox gerado pela herbivoria durante toda a escala temporal, faz-se necessária a realização de medidas de peroxidação lipídica, de glutatona oxidada (GSSG) ou proteínas carboniladas, que são indicadores clássicos de estresse oxidativo (Hermes-Lima *et al.*, 2012). Essas análises são necessárias de serem realizadas (em uma etapa posterior do trabalho), pois grande parte dos estudos citados que avaliaram a resistência de plantas a determinados herbívoros, relacionaram a maior atividade enzimática à resistência, situação contrária a observada no estudo das variedades Silvânia e a IAC-100.

As variedades Silvânia e IAC-100 estudadas não apresentaram modificações na atividade da enzima ascorbato peroxidase (Fig. 12 e 16). Estudos relataram que algumas espécies de plantas, após sofrerem algum tipo de lesão, apresentam uma queda na concentração de ácido ascórbico (Badejo *et al.*, 2009 ;Reyes *et al.*, 2007; Suza *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2007). O ácido ascórbico participa de reações de detoxificação, de forma enzimática e não enzimática de espécies reativas de oxigênio geradas pelo metabolismo celular aeróbico e por estresses bióticos e abióticos (Smirnoff *et al.*, 2001). De acordo com Pérez *et al.* (2002), estudos da atividade da ascorbato peroxidase podem diferir entre os resultados, pois esses dependem do tecido e do método utilizado para medir a atividade. Relatam ainda que a concentração do ácido ascórbico, que muitas vezes está presente em elevados valores em plantas, não influencia no nível de atividade da ascorbato peroxidase. Assim como no caso da atividade da catalase da variedade Silvânia, a ascorbato peroxidase pode ter se mantido inalterada para que houvesse o aumento dos níveis de H₂O₂ no tecido, para que esse possa agir como indutor de respostas de defesa vegetal. Esses resultados sugerem susceptibilidade da variedade Silvânia à praga quando comparada à variedade IAC-100. A seguir o Quadro 4 contendo o resumo dos estudos aqui citados.

Quadro 4. Resumo das enzimas estudadas nos artigos aqui citados.

Planta	Estresse	Tecido	Enzima/alterações	Autor
Algodoeiro (<i>A. gossypii</i>)	Herbivoria (perfurador)	Folha	Catalase • Ascorbato peroxidase • Peroxidase • Glutationa redutase ↑	Gomes, 2004
Amiero (<i>A. glutinosa</i>)	Herbivoria (mastigador)	Folha	Catalase • Guaiacol peroxidase ↑ Lipoxigenase ↑	Tscharntke <i>et al.</i> , 2001
Cereal Susceptível e Resistente (<i>Diuraphis noxia</i>)	Herbivoria (perfurador)	Folha	Catalase • Polifenol oxidase • Peroxidase (S↑, R↑)	Ni <i>et al.</i> , 2001
Nozes pecã Susceptível, Moderada e Resistente (<i>Carya illinoensis</i>)	Herbivoria (perfurador)	Folha	Catalase • Guaiacol peroxidase (S↓, R•, M•) Lipoxigenase (R↑, M↑)	Chen <i>et al.</i> , 2009
Soja (<i>G. max</i>)	Herbivoria (mastigador)	Folha	Catalase ↓ Guaiacol peroxidase ↑ Lipoxigenase ↑	Bi & Felton, 1995
Soja (<i>G. max</i>)	Herbivoria (perfurador)	Folha	<i>Pool</i> de lipoxigenase ↑ até 72h seguida de ↓	Silva <i>et al.</i> , 2004
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Esmagamento	Folha	Guaiacol peroxidase ↑ até 72h seguida de ↓	Lagrimini & Rothstein , 1987

•: não apresentou diferença entre os grupos com e sem injúria; ↑: apresentou aumento da atividade no grupo com injúria; ↓: apresentou queda da atividade no grupo com injúria; S: variedade susceptível; R: variedade resistente; M: variedade resistência moderada.

6.2 Perfil proteômico em função da herbivoria

Pode-se observar que, para a variedade Silvânia, a herbivoria do percevejo-marrom induz o aumento da produção de oito das 17 proteínas identificadas como diferenciais, e diminuição de nove. Nem todas as proteínas com expressão aumentada ou diminuída puderam ser identificadas, mesmo com os dados genômicos da soja. Possivelmente devido à baixa concentração protéica em seus *spots*. Entre as proteínas identificadas que apresentaram redução da expressão estão a enzima CP4EPSPS (*spot* 66); a proteína de choque térmico 70 kDa (*spot* 81) das classes das chaperonina; as

proteínas com função hipotética de glutamina aminotransferase (*spot* 07); inibidor de protease (*spot* 99); a proteína rica em glicina ligantes de RNA (*spot* 356); e as proteínas hipotéticas SORBIDRAFT (*spot* 111) e VITISV_038929 (*spot* 342). Dentre as proteínas que apresentaram aumento na sua expressão, temos a chaperona de 20 kDa das classes das chaperoninas (*spot* 158); a proteína rica em glicina tipo 2b (*spot* 146); e a proteína com função hipotética de hidrolase (*spot* 367).

A enzima CP4EPSPS (enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintase) (EC 2.5.1.19) é responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Segundo Maeda & Dudareva (2012) tais aminoácidos podem atuar como precursores de uma vasta gama de produtos que possuem funções como crescimento, desenvolvimento, reprodução e resposta ambiental, sendo obtidos como produto final da rota do ácido chiquímico. O triptofano é um precursor de compostos alcalóides, fitoalexinas ou o hormônio vegetal auxina (Kutcha, 1995 *in* Maeda & Dudareva, 2012) e a fenilalanina é um precursor comum de compostos fenólicos como flavonoides e a lignina (Vogt, 2010 *in* Maeda & Dudareva 2012).

A herbivoria do percevejo-marrom ao reprimir a expressão da EPSP (*spot* 66), afeta diretamente a rota de síntese dos aminoácidos fenilalanina e, conseqüentemente, a produção de compostos fenólicos, bem como a síntese de triptofano. Na rota do triptofano há a produção de compostos como alcalóides e fitoalexinas, e de um composto intermediário, o gliceraldeído-3-fosfato (Barends, *et al.*, 2008 *in* Maeda & Dudareva, 2012). Wink *et al.* (1998) relataram que os alcalóides não possuem função primária em plantas, porém são altamente tóxicos a vertebrados e artrópodes. Relataram ainda que os alcalóides podem agir em diversos sistemas metabólicos, como por exemplo, interferindo na síntese e reparação de DNA ou ainda afetando o sistema nervoso. De acordo com Smith (1996) as fitoalexinas são compostos antimicrobianos, sintetizadas nas plantas após estresses bióticos ou abióticos capazes de reduzir ou impedir a atividade de agentes patogênicos. Além disso, o gliceraldeído-3-fosfato pode ser utilizado pela rota do metileritritol fosfato para a produção de terpenos, conhecidos como compostos repelentes contra herbívoros (Taiz & Zeiger, 2006).

As proteínas de choque térmico (HSPs: do inglês *heat shock protein*) são classicamente conhecidas por auxiliar as células a suportar estresses térmicos, funcionando como chaperonas moleculares que auxiliam no dobramento correto das

proteínas e, evitando assim, a agregação dessas proteínas, o mau funcionamento celular, além de protegerem as células contra lesões (Morimoto & Santoro, 1998). São classificadas de acordo com sua massa molecular, variando de 15 a 104 kDa, onde as proteínas pertencentes ao grupo de 60 a 100 kDa são ATP-dependente e responsáveis pela estabilização do dobramento de proteínas e a união de proteínas oligoméricas. Proteínas HSPs estão presentes nos três grandes domínios (archaea, bactéria e eukarya) e não estão relacionadas exclusivamente ao estresse térmico, onde algumas são induzidas por estresses como lesão, déficit hídrico, salinidade, dentre outros (Lindquist & Craig, 1988). Até o momento não se sabe a função das HSPs de baixo peso molecular (Taiz & Zeiger, 2006). De acordo com Hamilton *et al.* (1996), existem 13 tipos de HSP de 20 kDa e 8 tipos de HSP de 70 kDa. Em estudo com HSP 20 em archaea *Sulfolobus solfataricus* Li *et al.* (2012) observaram que a HSP 20 promove a termotolerância, além de atuar como chaperonas em resposta a estresses. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a HSP de 70 kDa (*spot* 81) apresentou expressão reduzida (em 45 %) e que a HSP 20 kDa apresentou expressão aumentada em 87 % devido à herbivoria do percevejo-marrom.

De acordo com Burd & Dreyfuss (1994) a proteína rica em glicina ligante de RNA (GRP) (*spot* 81) que aqui apresentou redução de 64 % em sua expressão, é responsável pela regulação, direta ou indireta, de processos celulares de regulação gênica pós-transcricional, como a tradução. De acordo com Kim *et al.* (2008) a regulação da expressão do gene no nível pós-transcricional, bem como a nível transcricional é de importância crucial para o desenvolvimento, crescimento e reações de estresse em eucariotos. Sachetto-Martins *et al.* (2000) relataram que a expressão de GRP é regulada por uma série de estímulos externos, incluindo o estresse por água fria, alta salinidade, ferimentos e infecção viral. A redução da expressão proteína GRP, assim como da HSP70, pode estar relacionada com a baixa tolerância à herbivoria por parte da variedade Silvânia, afetando o funcionamento de outras enzimas e proteínas da folha de soja. Por outro lado, é importante mencionar que houve aumento na expressão de 250% de outro tipo de proteína rica em glicina, a do tipo 2b (*spot* 146).

A regulação a nível pós-transcricional pode envolver diferentes etapas do processamento e transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma, sendo que na tradução, são realizadas por proteínas de ligação ao RNA ou RBPs do inglês “*RNA binding proteins*”. Essas proteínas contêm sítios que reconhecem o RNA, em sua região

N-terminal e, sítios auxiliares na região C-terminal, como o domínio rico em glicina (Kenan *et al.*, 1991). De acordo com Showalter (1993), determinadas condições como o desenvolvimento, infecção viral, estresse hídrico, ferimentos e outros, induzem a expressão de proteínas como as ricas em glicinas, pois essas apresentam função pós-transcricional na regulação da expressão gênica em plantas sob diferentes condições de estresse.

A proteína com função hipotética de hidrolase (*spot 367*), que apresentou um aumento em sua expressão (59 %), tem sua função relacionada à defesa vegetal contra infecções por fungos, pois têm como função a degradação da parede celular fúngica que possui em sua composição resíduos de *N*-acetilglicosamina (Taiz & Zeiger, 2006). É possível que a injúria causada pela herbivoria do percevejo tenha gerado a formação de algum indutor responsável pela ativação da resposta de defesa contra infecções.

A proteína com função hipotética de inibidor de protease apresentou uma diminuição na sua expressão de aproximadamente 11 %, o que permite supor que isso pode estar relacionada à forma de alimentação, pois em herbívoros mastigadores a concentração de inibidores de protease tende a aumentar (Tamayo *et al.*, 2000).

Analisando os resultados de uma forma geral observamos que a herbivoria do percevejo-marrom após 24 h alterou a expressão de proteínas na soja variedade Silvânia, sendo que as proteínas reprimidas (dentre elas, a HSP70, a proteína com função hipotética de inibidor de protease, e a EPSP) podem estar relacionadas à susceptibilidade da variedade Silvânia à herbivoria do percevejo, pois estão relacionadas à resposta de defesa vegetal contra a herbivoria. Outro fato importante a ser observado é o aumento da expressão da proteína com função hipotética de hidrolase (*spot 367*), que são enzimas normalmente produzidas em resposta à infecção por fungos. Isso sugere que a herbivoria do percevejo, além de gerar o estresse relacionado à herbivoria, sujeitaria a soja a outros estresses como a infecção por fungos ou por bactérias ao lesionar o tecido vegetal e romper a barreira física protetora.

De acordo com Ahsan & Komatsu (2009) após estudarem o proteoma de folhas e flores em diferentes estágios de desenvolvimento de plantas de soja, cada tipo de tecido foi associado a um grupo de proteínas específicas e que por sua vez estaria associado ao estágio de desenvolvimento do tecido. Relatam ainda que quando

comparado o proteoma de folhas unifolares, trifolioladas maduras e trifolioladas jovens, foram identificadas 26 proteínas diferenciais, das quais 16 estavam mais expressas nas folhas trifolioladas jovens, quatro na folha trifoliolada maduras e três tanto nas unifolares e quanto nas trifolioladas maduras. Tais observações podem justificar o menor número (11) de bandas observadas no gel unidimensional (Fig. 21 II e Tabela 3) após 96 h sem injúria na variedade IAC-100, possivelmente devido ao estágio de desenvolvimento das folhas coletadas apesar de a planta estar em estágio V3, as folhas no tempo de 96 h estavam mais desenvolvidas do que nos tempos anteriores.

A variedade IAC-100, apresentou 10 proteínas identificadas como diferenciais face a resposta vegetal a herbivoria do percevejo. Quatro proteínas apresentaram aumento de expressão, enquanto seis apresentaram redução, porém dentre essas apenas duas puderam ser identificadas. As proteínas restantes não foram identificadas possivelmente devido a sua baixa concentração nos *spots*. As proteínas identificadas foram a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*spot* 114), que apresentou sua expressão reduzida em 32%, e a proteína rubisco ou ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (*spot* 136), que apresentou sua expressão aumentada em 33%. As proteínas identificadas estão relacionadas com a fotossíntese, que é a conversão do dióxido de carbono (CO₂) em biomassa utilizando energia derivada de luz (Brynat & Frigaard, 2006). Tal processo necessita de elétrons e de ATP, fornecidos por NADPH e ferredoxina reduzida.

Em estudo proteômico em folhas de soja envolvendo a resistência à salinidade, Ma *et al.* (2001) observaram que a exposição da soja à salinidade afeta a fotossíntese da planta. Relataram ainda que as proteínas rubisco e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, envolvidas no ciclo de Calvin, apresentaram baixa expressão na soja susceptível à salinidade quando comparadas à soja resistente ou à soja controle (não exposta à salinidade), evidenciando que o ciclo de Calvin foi afetado. Tal resultado foi observado na variedade IAC-100, porém apenas a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase apresentou queda na expressão e a rubisco um aumento.

A rubisco, ou ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase catalisa a reação de uma molécula de CO₂ com uma molécula de ribulose-1,5-bifosfato formando o intermediário 3-fosfoglicerato (3-PGA), que por sua vez sofre a ação da enzima fosfoglicerato quinase para formar 1,3-difosfoglicerato. Este composto, após sofrer a

ação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase gera gliceraldeído-3-fosfato (Fig. 28) (Taiz & Zeiger, 2006).

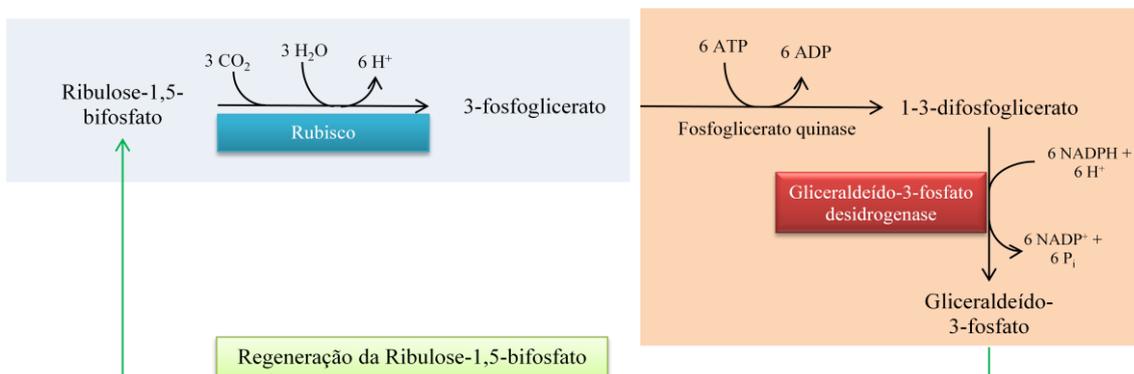


Fig. 28. Resumo das três fases do Ciclo de Calvin. Fase 1, em azul: carboxilação do aceptor de CO_2 ; Fase 2, em vermelho: redução do 3-fosfoglicerato a gliceraldeído-3-fosfato; fase 3, em verde: regeneração do aceptor ribulose-1,5-bifosfato a partir do gliceraldeído-3-fosfato (modificado de Taiz & Zeiger, 2006).

Com a expressão da proteína rubisco aumentada e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase diminuída na variedade IAC-100, o ciclo de Calvin apresenta-se comprometido (menos ativo). Nessa situação a produção do intermediário 3-fosfoglicerato esteja aumentada, e tal intermediário, além de ser precursor de aminoácidos como a serina, glicina e a cisteína pode ser utilizado na glicólise para a formação do intermediário fosfoenolpiruvato e que por sua vez pode ser utilizado na via do ácido chiquímico que, junto com a via do ácido malônico, são responsáveis pela biossíntese de compostos fenólicos. Além disso, a partir da rota do ácido chiquímico também ocorre a formação de aminoácidos aromáticos e subsequentemente a formação de produtos secundários nitrogenados (Fig. 29) (Taiz & Zeiger, 2006).

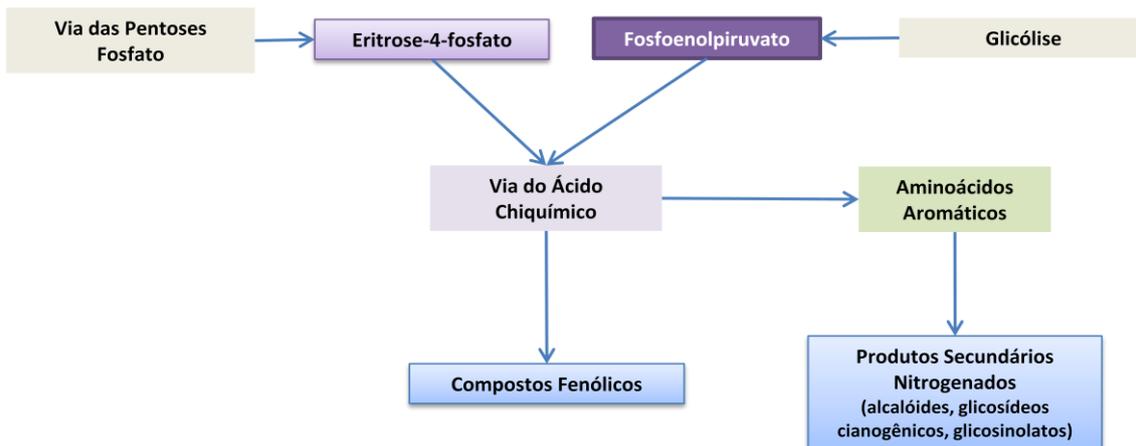


Fig. 29. Resumo da biossíntese de compostos fenólicos. O ácido fosfoenolpirúvico (resultante da glicólise) pode ser utilizado na via do ácido chiquímico para biossíntese de compostos fenólicos e/ou aminoácidos aromáticos (modificado de Taiz & Zeiger, 2006).

Produtos secundários nitrogenados são conhecidos por possuírem funções de proteção para as plantas, como por exemplo, compostos alcalóides, que possuem efeito deterrentes (atividade inibidora de alimentação) em predadores, principalmente mamíferos, e outros compostos como os glicosídeos cianogênicos e os glicosinolatos, que se tornam tóxicos após se decomporem (formando o ácido cianídrico) devido às lesões sofridas pelas plantas (Taiz & Zeiger, 2006). O glicosinolato é estocado em células adjacentes aos feixes de floema, e têm um papel importante na interação de insetos especialistas e generalistas. De acordo Andréasson *et al.* (2001) insetos especialistas se alimentam de uma única espécie ou família de plantas, e insetos generalistas têm mais vasta gama de plantas hospedeiras. Os mesmos pesquisadores observaram ainda que durante a degradação do glicosinolato há a formação de compostos que repelem e são tóxicos para insetos generalistas, porém são atrativos aos insetos especialistas.

Cerdeira *et al.* (1994) e Kogan & Pérez (2003) relataram que a rota do ácido chiquímico chega a utilizar cerca de 20% de todo o carbono fixado pela planta, para a formação de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, tiroxina, triptofano, assim como outros subprodutos como ligninas, alcalóides, fitoalexinas, além de compostos fenólicos.

Este presente trabalho possibilitou propor que para se defender da injúria causada pela herbivoria do percevejo-marrom a variedade IAC-100 desvia o metabolismo do ciclo de Calvin para a via do ácido chiquímico. Ou seja, o metabolismo

seria redirecionado da fotossíntese para o metabolismo relacionado à defesa vegetal. Esta resposta adaptativa estaria assim relacionada com a resistência da variedade IAC-100 à herbivoria.

Em estudo realizado por Collins *et al.* (2010), foram avaliadas as diferenças proteômicas em variedades de planta herbácea susceptível e resistente de *Arabidopsis thaliana* à herbivoria da lagarta *Plutela xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Foi observado o aumento da expressão de várias proteínas na variedade resistente, como por exemplo, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, GSTs e malato desidrogenase. Para a variedade susceptível, foi observada o aumento da expressão de proteínas relacionadas à fotossíntese (proteínas do complexo envolvendo oxigênio - OEC), mais precisamente, relacionadas à oxidação de H₂O. De acordo com os autores, as alterações na expressão dessas proteínas têm relação com os altos níveis de degradação do complexo OEC devido à elevada taxa de produção de EROs.

De maneira geral a variedade IAC-100 se mostrou mais eficiente que a variedade Silvânia quanto à defesa da soja face à herbivoria do percevejo por, possivelmente, direcionar sua expressão para a produção de compostos secundários de defesa, bem como por alterar menos, em termos globais, a expressão de outras proteínas. Além disso, a não alteração das atividades das enzimas envolvidas em processos redox sugere que deve sofrer menos estresse oxidativo face a injúria biótica provocada pela praga. Esses resultados corroboram estudos anteriores, de outras áreas do conhecimento (McPherson & Buss, 2007; Michereff *et al.*, 2011), que apontaram que aquela variedade possui de fato maior resistência a herbivoria do percevejo.

7. Conclusão

Conclui-se que a herbivoria do percevejo-marrom é capaz de induzir respostas bioquímicas diferentes entre as variedades de soja estudadas. A variedade Silvânia apresentou alterações na atividade das enzimas antioxidantes, provavelmente por possuir menos eficiente resposta de defesa direta contra o percevejo-marrom, e consequentemente necessitando de alternativas para minimizar as alterações bioquímicas causadas pela injúria da herbivoria. A variedade IAC-100 apresenta resposta de defesa direta mais eficiente contra o percevejo, devido a maior atividade constitutiva da lipoxigenase e através da produção de compostos fenólicos a partir de compostos formados na glicólise, pôde responder de forma mais eficaz contra o herbívoro limitando assim os danos que poderiam ser causados pela punctura, o que é justificado pela ausência de resposta das enzimas relacionadas ao estado redox. A variedade IAC-100 pode assim ser considerada uma variedade mais resistente à herbivoria do percevejo-marrom do que a variedade Silvânia.

Além das análises enzimáticas é necessário o estudo de indicadores de estresse oxidativo, como a razão GSSG:GSH (que dá informações sobre o estado redox do tecido; Hermes-Lima *et al.* 2012) e os níveis de proteínas carboniladas e peroxidação lipídica (que são marcadores clássicos de dano oxidativo). Tais análises irão auxiliar na maior compreensão da susceptibilidade da variedade Silvânia, que deve apresentar um aumento desses indicadores de estresse oxidativo, contrariamente à variedade IAC-100, que não deverá apresentar alterações.

Para uma análise proteômica complementar, tempos superiores a 24 h de herbivoria poderiam ser avaliados, assim como outros estágios do desenvolvimento da soja, para relacionar a resposta dependente do tempo e acompanhar essa resposta durante a fase vegetativa e reprodutiva do vegetal.

Referências bibliográficas:

- Aebi, H. (1984) **Catalase in vitro**. B. Chance, Act Chem. Scand. 1: 121-126.
- Ahsan, N.; Donnart, T.; Nouri, M-Z.; Komatsu, S. (2010) **Tissue-Specific Defense and Thermo-Adaptive Mechanisms of Soybean Seedling under heat Stress Revealed by Proteômica Approach**. Journal of Proteome Research, 9:4289-4204.
- Ahsan, N. & Komatsu S. (2009) **Comparative analyses of the proteomes of leaves and flowers at various stages of development reveal organ-specific functional differentiation of proteins in soybean**. Proteomics. 9:4889-4907.
- Ahsan, N.; Lee, D. G.; Lee, S. H.; Kang, K. Y.; Bahk, J. D.; Choi, M. S.; Lee, I. J.; Renault, J.; Lee, B. H. (2007) **A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress**. Physiol. Plant. 131: 555-570.
- Alborn, H. T.; Turling, T. C. J.; Jones, T. H.; Stenhagen, G.; Loughrin, J. H.; Tumlinson, J. H. (1997) **An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretions**. Science 276:945-949.
- Anderson, J. V.; Chevone, B. I.; Hess, J. L. (1992) **Seasonal Variation in the Antioxidant System of Eastern White Pine Needles**. Plan Physiol. 98:501-508.
- Andreasson, E.; Wretblad, S.; Granér, G.; Wu, X.; Zhang, J.; Dixelius, C.; Rask, L.; Meijer, J. (2001) **The myrosinase-glucosinolate system in the interaction between Leptosphaeria maculans and Brassica napus**. Mol Plant Pathol. 2:281-286. doi: 10.1046/j.1464-6722.2001.00076.x.
- Angelova, M. B.; Pashova, S. B.; Slokoska, L. S. (2000) **Molecular responses to reactive oxygen species: multifaceted changes in gene expression**. In: Kok, L. J. & Stulen, I. (1998) (Ed) **Responses of Plant metabolism to air pollution and global change**. Leiden: Backhuys Publishers, p. 233-240.
- Argandoña, V. H. (1994) **Effect of aphid infestation on enzyme activities in barley and wheat**. Phytochemistry. 35:313-315.
- Axelrod, B. T.; Cheesbrough, T. M.; Laakso, S. (1981) **Lipoxygenase from soybeans**. Methods Enzymol. 71:441-451.
- Badawi, G. H.; Yamauchi, Y.; Kawano, N.; Tanaka, K.; Tanaka, K. (2004) **Enhanced tolerance to water deficit and high salt stress by overexpressing superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts**. Plant And Cell Physiology, 45:

Badejo, A. A.; Fujikawa, Y.; Esaka, M. (2009) **Gene expression of ascorbic acid biosynthesis related enzymes of the Smirnoff-Wheeler pathway in acerola (*Malpighia glabra*)**. J. Plant Physiol. 166:652-660.

Baldwin, I. T.; Halitschke, R.; Kessler, A.; Schittko, U. (2001) **Merging molecular and ecological approaches in plant insect interactions**. Plant Biology. 4:351-358.

Barends, T. R M; Dunn, M. F.; Schlichting, I. (2008) **Tryptophan, an allosteric molecular factory**. Curr. Opin. 12: 593-600.

Bi, L. & Felton, G. W. (1995) **Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance**. J. Chem. Ecol. 21:1511-1530.

Bi, L.; Felton, G. W.; Mueller, A. J. (1994) **Induced resistance in soybean to *Helicoverpa zea*: Role of plant protein quality**. J. Chem. Ecol. 20:183-198.

Bi, J. L.; Murphy, J. B.; Felton, G. W. (1997) **Antinutritive and oxidative components as mechanisms of induced resistance in cotton to *Helicoverpa zea***. J. Chem. Ecol. 23:97-117.

Borém, A. (2005) **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. 2ª ed. Viçosa. Ed. UFV. p.969.

Bradford, M. M. (1976) **A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dy-binding**. Anal. Biochem. 72:248-254.

Breusegem, F. V. & Dat, J. F. (2006) **Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death**. Plant Physiology. 141: 384-390.

Brynat, D. A. & Friggard, N. U. (2006) **Porkaryotic prohtosynthesis and phototrophy illuminate**. Trends Microbiol. 14:488-496.

Boguszewska, D. & Zagdańska (2012) **ROS as Signaling Molecules and Enzymes of Plant Response to Unfavorable Environmental Conditions**. *In: Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects*. (Ed) Lushchak, V. & Semchyschyn, H. Intech. 341:362.

Burd, C. G. & Dreyfuss, G. (1994) **Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins**. Science.265:615-21.

Campos, M. de C. (2010) **Expansão da soja no território nacional: o papel da demanda internacional e da demanda interna**. Revista Geogrades. vol. 8.

Cerdeira, A. L.; Cole, A. W.; Luthe, D. S. (1994) **Free amino acid and protein modification in southernpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) with glifosate**. *Ciência e Cultura*, São Paulo. 46:172-174.

Chapman, J. R. (1993) **Practical organic mass spectrometry: a guide for chemical and biochemical analysis**. NY, EUA. 2ed. New York, John Wiley, p. 330.

Chen, Y.; Ni, X.; Cottrell, E.; Wood, B. W.; Buntin, G. D. (2009) **Changes of Oxidase and Hydrolase Activities in Pecan Leaves Elicited by Black Pecan Aphid (Hemiptera: Aphididae) Feeding**. *Journal of Economic Entomology*, 102(3): 1262-126.

Collins, R. M.; Muhammed A.; Ward, D. A.; Prescott, M. C.; Sait, S. M.; Rees, H. H.; Tomsett, A. B. (2010) **Differential proteômica analysis of *Arabidopsis thaliana* genotypes exhibiting resistance or susceptibility to the insect herbivore, *Plutella xylostella***. *Plos One*. 5(4); e 10103.

Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) (2011/2012) **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos – terceiro levantamento - Dezembro de 2011**

Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) (2012) http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos. Acesso em 05 de Maio de 2012

Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) (2013) **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos – sexto levantamento - Março de 2013**

Correia, J.; Azevedo, H.; Tavares, R. M.; Lino-Neto, T. (2003) **Identification of a cDNA encoding ascorbate peroxidase from *Pinus pinasteri* ait**. Pôster apresentado no X Congresso Nacional de Bioecnologia “Biotec 2003”, Lisboa, Portugal. URL: <http://hdl.handle.net/1822/2837>.

Corrêa-Ferreira, B. S. & Panizzi, A. R. (1999) **Percevejos da soja e seu manejo**. Londrina: Embrapa - CNPSo, circular técnica, 24.

Cosio, A. & Dunand, C. (2009) **Specific functions of individual class III peroxidase genes**. *Journal of Experimental Botany*. 60(2):391-408.

Courtois, E. A.; Paine, C. E. T.; Blandinieres, P-A.; Stien, D.; Bessiere, J-M.; Houel, E.; Baraloto, C.; Chave, J. (2009) **Diversity of volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: a survey in French Guiana**. *J. Chem. Ecol.* 35:1349-1362.

Cunha, G. R.; Barni, N. A.; Haas J. C.; Maluf, J. R. T.; Matzenauer, R.; Pasinato, A.; Pimentel, B. M.; Pires, J. L. F. (2001) **Zoneamento agrícola e época de**

semeadura para soja no Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Agrometeorologia, Passo Fundo (Nº Especial: Zoneamento Agrícola), v.9, n.3, p.446-459.

Degrande, P. E. & Vivian, L. M. (2008/2009) **Tecnologia e Produção: Soja e Milho.** In: <http://www.fundacaoms.org.br/page.php?88>. Acesso em 10 de maio de 2012.

Devi, P. U. M.; Reddy, P. S.; Rani, N. R. U.; reddy, K. J.; Reddy, M. N. (2000) **Lipoxygenase metabolites of alpha –linoleic acid in the development of resistance in pigeon pea, *Cajanus cajan* (L.) Millsp, seedlings against *Fusarium udum* infection.** European Journ. Plant Pathol. 106:857-865.

Dicke, M. & Hilker, M. (2003) **Induced plants defence: from molecular biology to evolutionary ecology.** Basic Appl. Ecol. 4:3-14.

Doss, R. P.; Oliver, J. E.; Proebsting, W. M.; Potter S. W.; Kuy S. R.; Clement, S. L.; Williamson, R. T.; Carney, J. R.; DeVilbiss, E. D. (2000) **Bruchins: Insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6218-23.

El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J. (2009) **Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers.** Applied Spectroscopy Reviews, 44:3, p. 210-230. In: <http://dx.doi.org/10.1080/05704920902717872>.

Eshdat, Y.; Holland, D.; Faltin, Z.; Ben-Hayyim, G.(1997) **Plant glutathione peroxidases.** Physiol Plant 100:234–240

Embrapa Soja. (2004) **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil.** Sistema de Produção, No 1. <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/index.htm>. Acesso em 05 de Maio de 2012.

Fan, R.; Wang, H.; Wang, Y.; Yu, D. (2012) **Proteômica analysis of soybean defense response induced by cotton worm (*Prodenia litura*, fabricius) feeding.** *Proteome Science*, p. 10:16.

Farmer, E. F.; Johnson, R. R.; Ryan, C. A. (1992) **Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by mehyk jasmonate and jasmonic acid.** Plant Physiol. 98:995-1002.

Felton, G. W.; Summers, C. B.; Mueller, A. J. (1994) **Oxidative responses in soybean foliage to herbivory by bean leaf beetle and three-cornered alfalfa leafhopper.** J. Chem. Ecol. 20: 639Ð650.

Felton, G. W.; Bi, J. L.; Summers, C. B.; Mueller, A. J.; Duffey, S. S. (1994b) **Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory.** J. Chem. Ecol. 20; 651-666.

Felton, G. W.; Eichenseer, H. (1999) **Herbivore saliva and its effect on plant defense against herbivores and pathogens**. In: Agrawal, A. A. S.; *et al.* Ed. American Phytopathology Society Press. 19-36.

Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whithouse, C. M. (1989) **Electrospray ionization - principles and practice**. Mass Spectrometry Reviews. v. 9, n. 1, p. 37-70.

Fernandes, A. P. (2000) **Análise comparativa da espermogênese normal e diapáusica em percevejos fitófagos (Hemíptera, Pentatomidae) – Revisão**. Universitas. Biociências (UNICEUB), Brasília-Brasil, v. 1, n.1: 87-95.

Feussner, I. & Wasternack, C. (1998) **Lipoxygenase catalysed oxygenation of lipids**. Fett/Lipid 100: 146-152.

Funk, C. J. (2001) **Alkaline phosphatase activity in whitefly salivary glands and saliva**. Arch. Insect Biochem. 46:165-74.

Gill, R. S.; Gupta, A. K.; Taggar, G. K.; Taggae, M. S. (2010) **Role of oxidative enzymes in plant defenses against insect herbivory**. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. 45 (2): 277-290.

Gomes, P. **A soja**. (1990) 5^a ed. São Paulo. Nobel 149p.

Gomez, S. K.; Oosterhuis, D. M.; Rajguru, S. N.; Johnson, D. R. (2004) **Foliar antioxidante enzyme responses in cotton after aphid herbivory**. The Journal of Cotton Scie. 8:99-104.

Görg, A.; Weiss, W.; Dunn, M. J. (2004) **Current two-dimensional electrophoresis technology for proteômicas**. Proteômicas 4:3665-2685.

Graves, P. & Haystead, R. T. A. J. (2002) **Molecular Biologist's Guide to Proteômicas**. Microbiol. Mol. Biol. Reviews, 1:39-66.

Grossfopf, D. G.; Feliz, G.; Boller, T. A. (1991) **A yeast-derived glycopeptides elicitor and chitosan or digitonin differentially induce ethylene biosynthesis, phenylalanine ammonia-lyase and callose formation in suspension cultures tomato cells**. Journal of Plant Physiology. 138:741-746.

Grover, P.B.J. (1995) **Hypersensitive response of wheat to Hessian fly**. Entomol. /exp. Appl. 74:283-294.

Halliwel, B. & Foyer, C. H. (1976) **Ascorbic Acid, metal ions and the superoxide radical**. Biochem. J. 155:697-700.

Hermes-Lima (2004) **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals in Functional metabolism: Regulation and Adaptation** (2005) Edited by Kenneth B. Storey. 594p.

Hermes-Lima, M.; Carreiro, C.; Moreira, D. C.; Polcheira, C.; Machado, D. P.; Campos, E. G.(2012) **Glutathione status and antioxidant enzymes in a crocodilian species from the swamps of the Brazilian Pantanal**. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 163:189-198.

Hildebrand, D. F.; Hamilton-Kemp, T. R.; Legg, C. S.; Bookjans, G. (1988) **Plant lipoxygenase: occurrence, properties and possible functions**. Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology. 7:201-219.

Hilder, V.A.; Gatehouse. A. M. R.; Sheerman, S. E.; Barker, R. F.; Boulter, D. (1987) **A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco**. Nature, 300:160-163.

Hoffmann-Campo, C. B.; Gazzoni, D. L.; Toledo, J. F. F. (1996) **Comparação de métodos para avaliação de linhagens de soja (Glycine Max Merrill) resistentes a percevejos (Hemiptera: Pentatomidae)** Pesq. Agropec. Brás. Brasília, 31:305-316.

Hoffman-Campo, C. B.; Moscardi, F.; Côrrea-Ferreira, B.; Oliveira, J. L.; Sosa-Gómez, D. R.; Panizzi, A. R.; Corso, I. C.; Gazzoni, D. L.; de Oliveira, E. B. (2000) **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Embrapa Soja. Circular Técnica nº 30.

Howe, G. A. & Jander, G. (2008) **Plant Immunity to Insect Herbivores**. Annu. Rev. Plant Biol. 59:41-66.

Jacobs, D. I.; Heijden van der, R.; Verpoorte, R. (2000) **Proteômicas in plant Biotechnology and Secondary Metabolism Research**. Phytochem. Anal. 11: 277-287.

Jones, D. K.; Dalton, D. A.; Rosell, F. I.; Raven, E.; L. (1998) **Class I heme peroxidases: characterization of soybean ascorbate peroxidase**. Archive of biochemistry and biophysics. 360:173-178.

Kaloshian, I. & Walling, L. (2005) **Hemipterans as Plant Pathogens**. Annu. Review of Phytopathology. 43:491-521.

Kazan, K. & Manners, J. M. (2008) **Jasmonate Signaling: toward an integrated view**. Plant Phys. 146:1459-1468.

Karas, M. I. & Hillenkamp, F. (1988) **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons**. Analytical Chemistry, v. 60, n. 29, p. 2299-2301.

Karuppanapandian, T.; Moon, J.; Kim, C.; Manoharan, K.; Kim, W. (2011) **Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms.** Australian Journal of Crop Science, 5(6):709-725.

Kenan, D. J.; Query, C. C.; Keene, J. D. (1991) **RNA recognition: towards identifying determinants of specificity.** Trends Biochem Sci. 16:214-220.

Kessler, A. & Baldwin, I. T. (2002) **Plant responses to insect herbivory: The emerging Molecular Analysis.** Annu. Rev. Plant Biol. 53: 299-328.

Kim, J. S.; Jung, H. J.; Lee, H. J.; Kim, K. A.; Goh, C. H.; Woo, Y.; Oh, S. H.; Han, Y. S.; Kang, H. (2008) **Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*.** Plant J. 55:455-66. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03518.x. Epub 2008 Apr 12.

Kishimoto, K.; Matsui, K.; Ozawa, R.; Takabayashi, J. (2008) **Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in *Arabidopsis* against *Botrytis cinerea*.** Phytochemistry. 69:2127-2132.

Kogan, M. A. & Pérez, J. A. (2003) **Interactions of Synthetic Herbicides with Plant Disease and Microbial Herbicides in Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímico del modo de acción.** Edição Universidade Católica de Chile Santiago, 2003-2333p.

Koji, Y.; Shiro M.; Michio, K.; Mitsukata, T.; Hiroshi, M. (2009) **Antioxidant capacity and damages caused by salinity stress in apical and basal regions of rice leaf.** Plant Prod. Sci. 12:319-326.

Kutchan, T. M. (1995) **Alkaloid biosynthesis: the basis for metabolic engineering of medicinal plants.** Plant Cell. 7:1059-1070.

Laumann, R.A.; Farias Neto, A. L.; Blassioli-Moraes, M. C.; Silva, A. P.; Vieira, C. R.; Moraes, S. V. P.; Hoffmann-Campo, C. B.; Borges, M. (2008) **Dinâmica populacional de percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) em diferentes genótipos de soja.** In: IX Simpósio Nacional Cerado; II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Brasília, DF. Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais: anais. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, [HTTP://www.cpac.embrapa.br/download/747t](http://www.cpac.embrapa.br/download/747t).

Lagrimini, L.M. & Rothstein, S. (1987) **Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection.** Plant Physiol. 84:438-442.

Lee, D. G.; Ahsan, N.; Lee, S. H.; Kang, K. Y.; Bahk, J. D.; Lee, I. J.; Lee, B; H. (2007) **A proteomic approach in analyzing heat responsive proteins in rice leaves.** *Proteomics*. 7:3369-3383.

Leszczynski B. (1985) **Chagens in phenols content and metabolism in leaves of susceptible and resistant wheat cultivars infested by *Rhopalosiphum padi* L. (Hom. Aphididae).** *Z. Ang. Entomol.* 100:343-348.

Li, D-C.; Yang, F.; Lu, B.; Chen, D-F.; Yang, W-J. (2012) **Thermotolerance and molecular chaperone function of the small heat shock protein HSP20 from hyperthermophilic aschaeon, *Sulfolobus solfataricus* P2.** *Cell Stress and Chaperones*. 17:103-108.

Lindquist, S. & Craig, E. A. (1988) **The heat-shock proteins.** *Annu. Rev. Genet.* 22:631-677.

Ma, H.; Song, L.; Shu, Y.; Wang, S.; Niu, J.; *et al.* (2012) **Comparative proteômica analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes.** *Journal of Proteômicas*. 75:1529-1546.

Maeda, H. & Dudareva, N. (2012) **The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants.** *Annu Rev Plant Biol.* 63:73-105. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105439.

Mallick, N. & Mohn, F. H. (2000) **Reactive oxygen species: respond of algal cells.** *Journal of Plant Physiology*. 157: 183-193.

Mattiacci, L.; Dicke, M.; Posthumus, M. A. (1995) **beta-Glucidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic.** *Proc.Natl. Acad. Sci. S.A.* 14:2036-2040.

McPherson, R. M. & Buss, G. R. (2007) **Evaluation lepidopteran defoliation resistance in soybean breeding lines containing the stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) resistance IAC-100 cultivar in their pedigrees.** *J. Econ. Entomol.* 100:962-968.

Méchin, V.; Damerval, C.; Zivy, M. (2007) **“Total protein extraction with TCA/Acetona”** *In:* Thiellement, H.; Zivy, M.; Damerval, C.; Méchin, V. **Plant Proteômicas Methods and Protocols.** Totowa, New Jersey, John M. Walker, 1-8.

Medina, P. F.; Razera, L. F.; Filho, J. M.; Bortoletto, N. (1997) **Produção de sementes de cultivares precoces de soja em duas épocas e dois locais paulistas: I. Características agrônômicas e produtividde.** *Bragantina, Campinas*, v. 56, n.2. *Avaialabre* from <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0006-87051997000200009&Ing=en&nrm=iso>>. Acesso em 14 de março de 2013. Doi: [HTTP://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051997000200009](http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051997000200009).

Mesquita, R. O.; de Almeida Soares, E.; de Barros, E. G.; Loureiro, M. E. (2012) **Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf: Improvements in identification of new and low-abundance proteins.** Genet. Mol. Biol. 35:353-361.

Michereff, M. F. F.; Laumann, R. A.; Borges, M.; Michereff-Filho, M.; Diniz, I. R.; Neto, A. L. F. N.; Moraes, M. C. B. (2011) **Volatiles Mediating a Plant-Herbivore-Natural Enemy Interaction in Resistant and Susceptible Soybean Cultivars.** J Chem Ecol. 37:273–285.

Montillet, J. L.; Chamnongpol, S.; Rustérucchi, C.; Dat, J.; van de Cotte, B.; Angel, J. P.; Battesti, C.; Inzé, D.; Van, F. B.; Triantaphylidès, C. (2005) **Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves.** Plant Physiol. 138:1516-1526.

Moraes, M. C. B.; Laumann, L.; Sujii, E. R.; Pires, C.; Borges, M.(2005) **Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical Brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*.** Entomologia Experimentalis at Applicata. 115: 227-237.

Moran, P. J.; Chegn, Y.; Cassell, J. L.; Thompson, G. A. (2002) **Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions.** Archives of insect biochemistry and physiology. 51:182-203.

Morimoto, R.I. & Santoro, M. G. (1998) **Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection.** Nat Biotechnol. 16:833-838.

Natarajan, S.; Xu, C.; Caperna, T. J.; Garrett, W. M. (2005) **Comparison of proteins solubilization methods suitable for proteômica analysis of soybean seed proteins.** Anal. Bioch. 342:214–220.

Navrot, N.; Collin, V.; Gualberto, J.; Gelhaye, E.; Hirasawa, M.; Rey, P.; Knaff, D. B.; Issakidis, E.; Jacquo, J. P.; Rouhier, N. (2006) **Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stress.** Plant Physiol. 142:1364-1379.

Nerio, L. S.; Olivero-Verbel, J.; Staschenko, E. (2010) **Repellent activity of essential oils: a review.** Bioresour Technol. 101: 372-378.

NCBI, GeneBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Acesso em 23 de Janeiro de 20

Ni, X.; Quisenberry, S. S.; Heng-Moss, T.; Markwell, J.; Sarath, G; Klucas, R.; Baxendale, F. (2001) **Oxidative responses of resistant and susceptible cereal leaves to symptomatic and nonsymptomatic cereal aphid (Hemiptera: Aphididae)**

feeding. Faculty Publications: Department of Entomology. Paper 113.
<http://digitalcommons.unl.edu/entomologyfacpub/113>

Nürnbergger, T. (1999) **Signal perception in plant pathogen defense.** CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 55:167–182.

O'Donnell, P. J.; Calvert, C.; Atzorn, R.; Wasternack, C.; Leyser, H. M. O.; Bowles, D. J. (1996) **Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants.** Science. 274:1914-1917.

Orozco-Cardenas, M.; Narváes-Vasquez, J.; Ryan, C. A. (2001) **Hydrogen peroxide acts as a second Messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate.** Plant Cell. 13:179-191

Pandey, G. K. (2008) **Emergence of a novel calcium signaling pathway in plants: CBL-CIPK signaling network.** Physiol. Mol. Biol. Plants. 14: 51-68.

Papadakis, A. K.; Siminis, C. I.; Roubelakis-Angelakis, K. A. (2001) **Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts.** Plant Physiol. 126: 434-441. *In:* Pérez, F. J.; Villegas, D.; Mejia, N. (2002) **Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reactions as a detoxifying system of H₂O₂ in grapevine leaves.** Phytochemistry. 60: 573-580.

Pérez, F. J.; Villegas, D.; Mejia, N. (2002) **Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reactions as a detoxifying system of H₂O₂ in grapevine leaves.** Phytochemistry. 60: 573-580.

Porta, H. & Rocha-Sosa, M. (2002) **Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features.** Plant Physiology. 130:15-21.

Porta, H.; Rueda-Benítez, P.; Campos, F.; Colmenero-Flores, J. M.; Colorado, J. M.; Carmona, M. J.; Covarrubias, A. A.; Rocha-Sosa, M. (1999) **Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions.** Plant Cell Physiol. 40:850-858.

Prost, I.; Dhondt, S.; Rothe, G.; Vicente, J.; Rodriguez, M. J.; Kift, N.; Carbonne, F.; Griffiths, G.; Esquerré-Tugayé, M-T.; Rosahl, S.; Castresana, C.; Hamberg, M.; Fournier, J. (2005) **Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins supports their involvement in defense pathogens.** Plant Phys. 139:1902-1913.

Reyes, L. F.; Villareal, J. E.; Cisneros-Zevallos, L. (2007) **The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue.** Food Chem. 101:1254-1262.

Rice-Evans, c. A.; Diplock, A. T.; Symons, M. C. R. (1991) **Techniques in free radical research**. In: Burdon, R. H.; van Knippenberg, R. H. (Ed) **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology**. Amsteram: Elsevier. 22: 291

Rosahl, S. (1996) **Lipoxygenases in plants – their role in development and stress response**. Z Naturforsch C. 51(3-4): 123-138.

Rossetto, C. J.; Gallo, P. B.; Razera, L. F.; Bortoletto, N.; Igue, T.; Medina, P. F.; Tisselli Filho, O.; Aquilera, V.; Veiga, R. F. A.; Pinheiro, J. B. (1995) **Mechanisms of resistance to stink bug complex in the soybean cultivar ‘IAC-100’**. An. Soc. Entomol. Bras. 24:517-522.

Sachetto-Martins, G.; Franco, L. O.; de Oliveira, D. E. (2000) **Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif?** Biochim Biophys Acta. 1492:1-14.

Sauge, M. H.; Kervella, J.; Pascal, T. (1998) **Settling behavior and repdoructive potential of the green peach aphid *Myzus persicae* on peach variaties and a related wild *Prunus***. Entomol. Exp. Appl. 89:233-242.

Sekiya, J.; Kajiwara, T.; Munechika, K.; Hatanaka, A. (1983) **The differential expression of wound- inducible lipoxygenase genes in soybean leaves**. Plant Physiol. 110:287-299.

Showalter, A. M. (1993) **Structure and function of plant cell wall proteins**. Plant Cell. 5:9-23.

Silva, F. B.; Oliveira, M. G. A.; Brumano, M. H. N. *et al.* (2004) **Função bioquímica da via das lipoxigenases em plantas de soja submetidas ao ataque de mosca-branca (*Bemisia argentifolii*)**. Ciênc. Agrotec. 28:406-413.

Silva Neto, S. P. & da SILVA, S. A.(2010) **Plantio da soja na época certa**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados,. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/254/>. Acesso em: 05 maio de 2012.

Simms, E. L. (2000) **Defining tolerance as a norm of reaction**. Evol. Ecol. 14:563-570.

Smirnoff, N.; Conklin, P. L.; Loewus, F. A. (2001) **Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance**. Annu rev plant physiol plant mol boil. 52:437-467.

Smith, C.J. (1996) **Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system**. The New Phytologist, v.132, n.1, p.1-45.

Soares, A. J. C.; Santos, M. F.; J. Chung, J.; David, C. M. N.; Domont, G.B. (2007) **Proteômica e seps. Novas perspectivas para o diagnóstico.** Ver. Bras. Ter. intensiva. 19(1):14-22.

Soares, A. M. dos S. & Machado, O. L.T. (2007) **Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio.** Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas. v.1, n.1, p.9-19.

Sofo, A.; Dichio, B.; Xiloyannis, C.; Masia, A. (2005) **Antioxidant defenses in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes.** Functional Plant Biology 32: 45-53.

Souza, P. I. M.; Moreira, C. T.; Farias Neto, A. L.; Abud, S.; Nunes Júnior, J.; Monteiro, P. M. F. O.; Dias, W. P.; Almeida, L. A.; Toledo, J. F.F.; Assunção, M. S.; Di Stefano, J. G.; Arantes, N. E.; Toledo, R. M. C. P. (2006) **Cultivares de soja transgênia da Embrapa indicadas para o sistema de produção da Região Cerrado.** Embrapa Soja, 26.

Stowe, K. A.; Marquis, R. J.; Hochwender, C. G.; Simms, E. L. (2000) **The evolutionary ecology of tolerance to consumer damage.** Annu. Rev. Ecol. Syst. 31:565-595.

Suza, W.P.; Avila, C.A.; Carruthers, K.; Kulkarni, S; Goggin, F. L.; Lorence, A. (2010) **Exploring the impact of wounding and jasmonates on ascorbate metabolism.** Plant Phys. And Biochem. 48:337-350.

Swamy, G. S.; (2000) **Defense Signaling in Plants. Plants Cry for Help.** Resonance, vol. 5, 8:43-53.

Tamayo, M.C.; Rufat, M.; Bravo, J. M.; San Segundo, B. (2000) **Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of Spodoptera littoralis larvae.** Planta. 211:62-71.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2006) **Fisiologia Vegetal.** Trad. Santarén, E. R.; *et al.* Editora Porto Alegre.

Tayefi-Nasrabadi, H.; Dehghan, G.; Daeihassani, B. Movafegi, A.; Samadi, A. (2010) **Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.cv) cultivars.** African Journal of Biochemistry. 10(5):751-763.

Thaler, J. S.; Stout, M. J.; Karban, R.; Duffey, S.S. (1996) **Exogenous jasmonate simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field.** Journal Chem. Ecol. 22:1767-1781.

Todd, J. W. & Herzog, D. C. (1980) **Sampling phytophagous Pentatomidae on soybean**. In; Kogan, M.; Herzog, D. C. (Ed) Sampling.

Tscharntke, T.; Thiessen, S.; Dolch, R.; Boland, W. (2001) **Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus Glutinosa***. Bichemical Systematics and Ecology. 29:1025-1047.

Vogt, T. (2010) **Phenylpropanoid biosynthesis**. Mol. Plant. 3:2-20.

Wang, B.; Lüttge, U.; Ratajczak, R. (2004) **Specific regulation os SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C₃ halophyte *Suaeda salsa L.*** Journal Plant Physiology 161:285-293.

Watanabe, M.; Itho, Y.; Jo, Y.; Yasuda, K.; Kamachi, K.; Watanabe, Y. (2007) **Redox and translational regulation of glutamate dehydrogenase α subunits in *Brassica napus* under wounding stress**. Plant Sci. 172: 1182-1192.

Weiss, W. & Gorg, A. (2007) **Two-Dimensional Electrophoresis for Plant Proteômicas**. Methods Mol. Biol. 355:1421-143.

Weiss W. & Gorg A. (2009) **High-resolution two-dimensional electrophoresis**. Methods Mol. Biol, 564:13-32.

Weiss, W.; Weiland, F.; & Görg, A. (2009) **Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis**. Methods In Molecular Biology Clifton Nj, 564, 59-82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19544017>

Westermeier, R. & Naven, T. (2002) **Proteômicas in Practice: A laboratory Manual of proteome analysis**. (Ed) Wiley-VCH Veriag, Germany.

Wellinder, K. G. (1992) **“Plant peroxidase: structure, functions, relationships”**. In: Pennel, C.; Gaspar, T.C Greppin, H. (Eds) **Plant Peroxidases (1980-1990)** Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical and Physiological Aspects. Geneva, Switzerland, pp.1-24.

Wink, M.; Schmeller, T.; Latz-Bruning, B.; (1998) **Modes of action of allelochemical alkaloids: interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets**. J. Chem. Ecol. 24:1881–1937

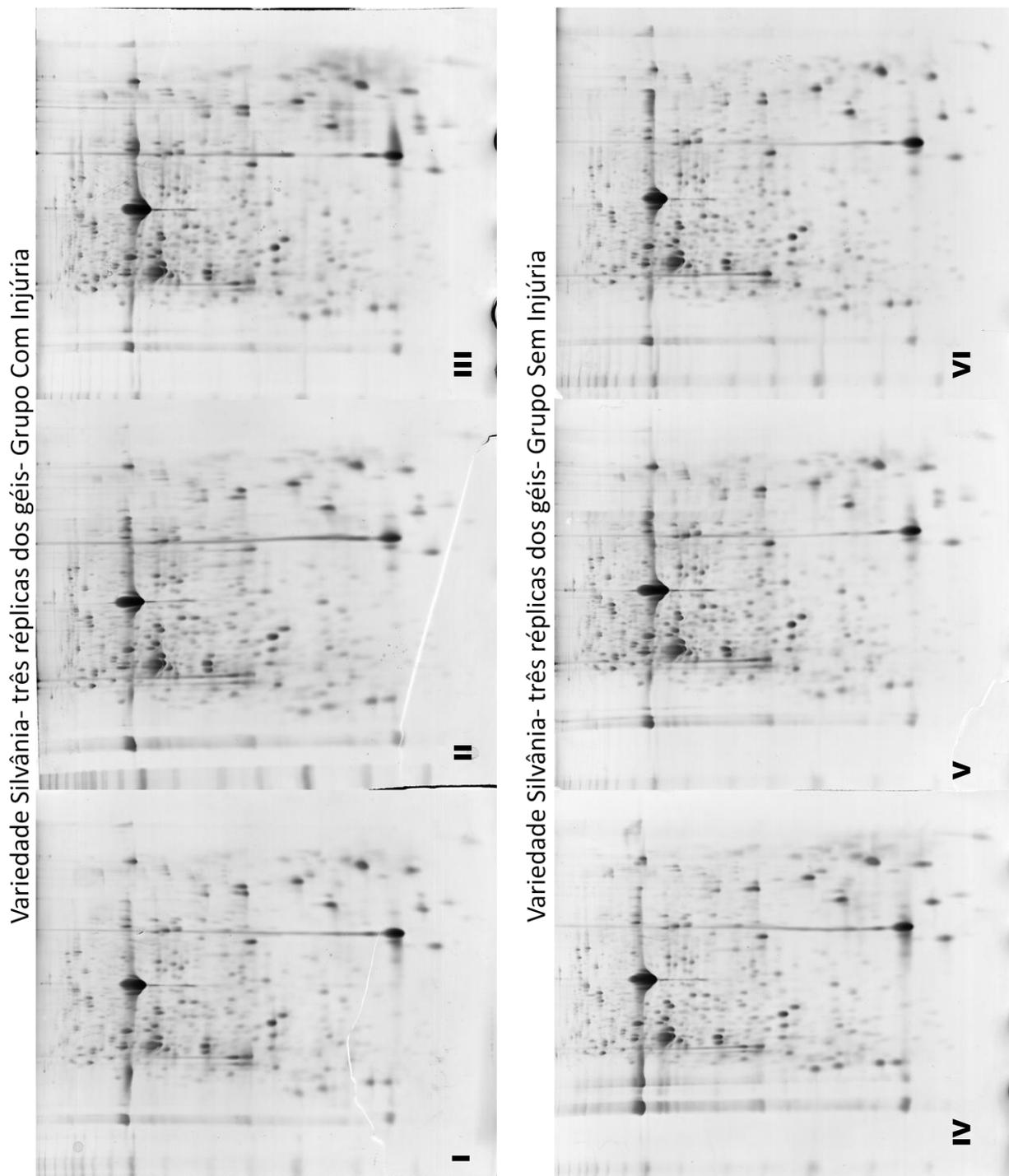
Xu, C.; Garrett, W. M.; Sullivan, J.; Caperna, T. J.; Natarajan, S. (2006) **Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry**. Phytochemistry 67:2431-2440.

Yates, J. R. (2011) **A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes**. Nature Methods | vol.8 n.8, p. 633-637.

Zhuang, H.; Hamilton-Kemp, T. R.; Andersen, R. A.; Hildebrand, D. F. (1992)
Development change in C6-aldehyde formation by soybean leaves. *Plant Physiol.*
100:80-87.

Anexo 1

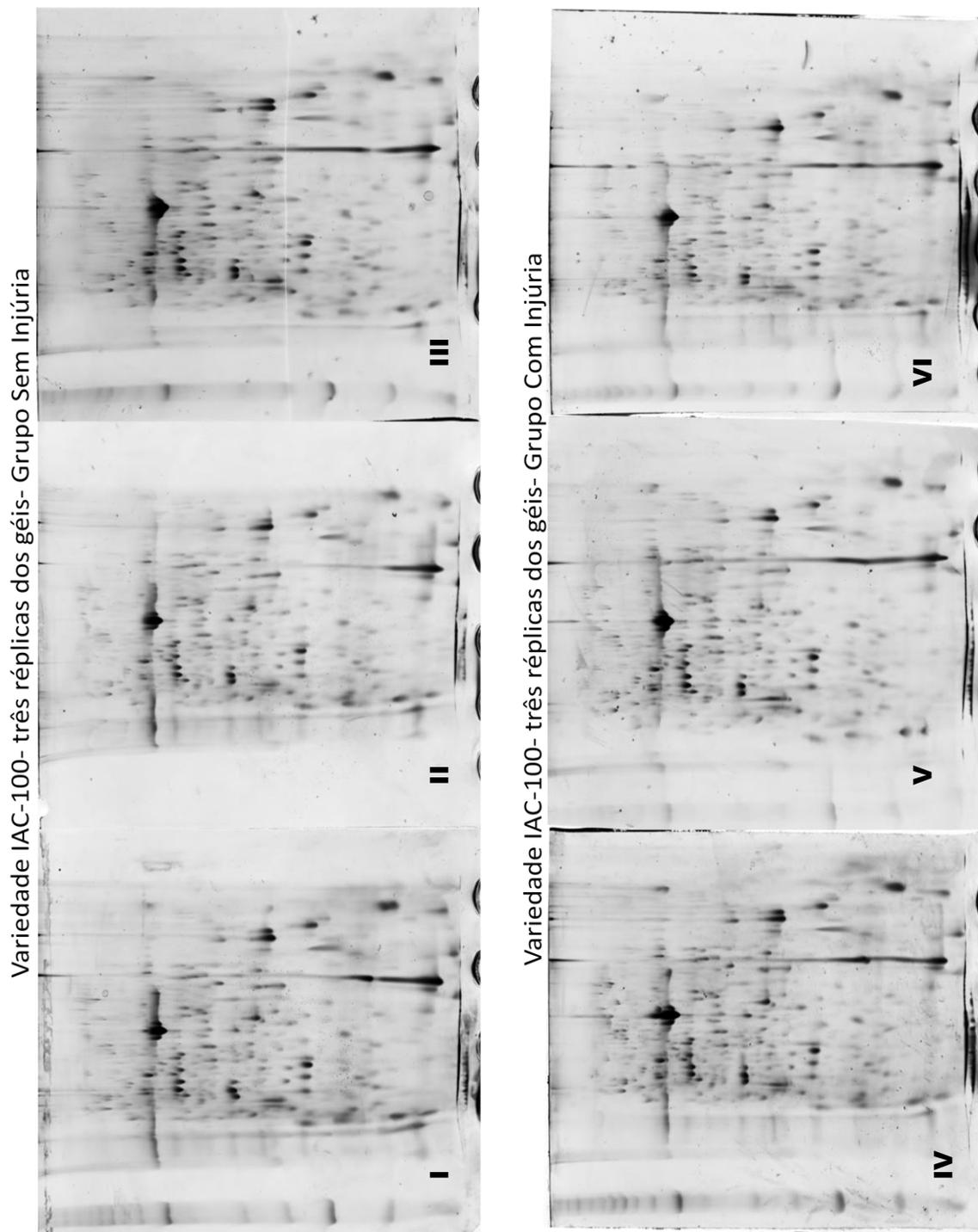
Imagem dos três géis bidimensionais de folha de soja variedade Silvânia em estágio V3, em faixa de pH de 3 a 11 NL.



As figuras I e V foram apresentadas na página 46.

Anexo 2

Imagem dos três géis bidimensionais de folha de soja variedade IAC-100 em estágio V3, em faixa de pH de 3 a 11 NL.



As figuras I e IV foram apresentadas na página 51.