

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

INVESTIGAÇÃO DA INDUÇÃO DE METABÓLITOS EM
SOJA [*Glycine max* (L.) Merr.] FRENTE À HERBIVORIA
POR *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:
Noctuidae)

Josicleia Oliveira Costa*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters
Coorientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
(Bolsista CAPES) *

SÃO CARLOS- SP

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Josicléia Oliveira Costa, realizada em 04/04/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters (UFSCar)

Profa. Dra. Gisele André Baptista Canuto (UFBA)

Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira (BMS)

Profa. Dra. Sarah Caroline Ribeiro de Souza (UFSCar)

Prof. Dr. Marcos Rafael Gusmão (EMBRAPA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

O Senhor é minha rocha, minha fortaleza e meu libertador; meu DEUS é meu rochedo, em quem encontro proteção. Clamei ao SENHOR que é digno de louvor.

(Salmos 18)

DEDICATÓRIA

A Deus, pela Sua bondade e misericórdia.

Aos meus pais, Antônio e Maria da Guia, por todo seu amor, carinho, dedicação e apoio.

Aos meus irmãos, pelo apoio, conselhos e encorajamento para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar, primeiramente, minha imensa gratidão a Deus, por me proteger, guiar e ajudar ao longo desta caminhada, permitindo-me alcançar esta importante conquista em minha vida.

Aos meus queridos e amados pais, Maria da Guia Oliveira Costa e Antônio dos Santos Costa, por serem meu alicerce fundamental, por me apoiarem incondicionalmente em toda a minha formação e por serem exemplos de trabalho e honestidade.

Aos meus queridos irmãos, Saionara, Josiene, Josuel, Josélia, Josualdo e Isabel, por todo amor, carinho e apoio.

Aos meus sobrinhos amados, Arthur, Lara e Melissa, por compartilharem momentos especiais.

Aos meus cunhados, Neto e Dalciane, pelo carinho e atenção.

A toda minha família, minha eterna gratidão!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters, pelos ensinamentos, confiança, paciência e amizade ao longo deste processo.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, pela confiança e pelo suporte imprescindível para a realização dos experimentos deste projeto.

Ao Prof. Dr. André Rangel Nascimento, pelos valiosos ensinamentos e pela parceria.

À técnica do Laboratório de Produtos Naturais, Doraí Periotto Zandonai, pela amizade, apoio, cuidado e carinho constantes.

À minha amiga e companheira de laboratório, Victoria Peña, por sua força, conselhos, palavras de encorajamento e pela inestimável ajuda na realização dos experimentos deste trabalho.

Aos meus amigos Clara, Danilo, Gabriel, Amanda, Jesus, Yeison, Luís e Amanda, pelo apoio, carinho, atenção, trocas de experiências e pelos momentos de qualidade vividos juntos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química, pelos ensinamentos, suporte e colaboração indispensáveis.

À Universidade Federal de São Carlos, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela estrutura oferecida e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, sem a qual esta pesquisa não teria sido possível.

É com coração cheio de gratidão que lhes digo: **MUITO OBRIGADA!**

Ebenézer!

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. 1 - Descrição dos Estágios de desenvolvimento da soja.	4
TABELA 1. 2 - Descrição dos estágios reprodutivos da soja.....	5
TABELA 2. 1 - Programa de eluição no modo isocrático e gradiente da fase móvel, usado na separação dos analitos por UHPLC-Q-TOF-MS/MS (ESI +).	34
TABELA 2. 2 - Resultados de PERMANOVA dos tratamentos controle e indução dos estágios VC, V2 e V5.....	41
TABELA 2. 3 - Resultados de PERMANOVA dos tratamentos entre as folhas jovem e velha no estágio VC.....	50
TABELA 2. 4 - Resultados de PERMANOVA dos tratamentos entre as folhas jovem e velha no estágio V2.	63
TABELA 2. 5 - Resultados de PERMANOVA dos tratamentos entre as folhas jovem e velha no estágio V5.	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1 - Escala fenológica da soja.	5
FIGURA 2. 1 - Esquema de obtenção das plantas nos estágios VC, V2 e V5.	29
FIGURA 2. 2 - Indução por <i>Spodoptera frugiperda</i> em folhas de soja. Os círculos azul e vermelho indicam a indução nas folhas jovem e velha, respectivamente.	31
FIGURA 2. 3 - Esquema simplificado da extração das amostras de folhas de soja.....	33
FIGURA 2. 4 - Fluxo de trabalho da análise de metabolômica.	38
FIGURA 2. 5 - Gráfico de PCA comparando o agrupamento do QC com os grupos das folhas jovem e velha dos estágios VC, V2 e V5.....	40
FIGURA 2. 6 - Gráfico de PCA comparando os tratamentos em folhas de soja nos estágios VC (azul), V2 (verde) e V5 (vermelho); (a) amostras de controle (b) amostras de indução.	41
FIGURA 2. 7 - Gráficos de <i>loadings</i> para a primeira e segunda componentes das amostras de folhas de soja nos estágios VC, V2 e V5; (a) amostras de controle (b) amostras de indução.....	42
FIGURA 2. 8 - Mapa de calor da abundância média dos 60 metabólitos significativos em linhas (ID), e as amostras dos diferentes estágios em colunas. Os metabólitos regulados para cima e para baixo são indicados por diferentes tons de vermelho e azul, respectivamente. Abundância foi significativa pela ANOVA $p \leq 0,05$	44
FIGURA 2. 9 - Comparação da abundância relativa de 20 compostos responsáveis pela diferenciação dos grupos entre os estágios VC, V2 e V5 da soja. O (*) significa que a abundância foi significativa pela ANOVA $p \leq 0,05$	45

FIGURA 2. 10 - Classificação dos 318 metabólitos significativos em folhas jovem e velha nos estágios de desenvolvimentos da soja (VC, V2 e V5), considerando os tratamentos controle e indução.....	47
FIGURA 2. 11 - Gráfico de PCA comparando o metaboloma das folhas jovem e velha (controle e indução) no estágio VC.	50
FIGURA 2. 12 – Análises discriminantes por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). (a) VIP <i>scores</i> destacando a variação dos 25 metabólitos anotados de relevância significativa entre os tratamentos das folhas jovem e velha no estágio VC da soja; (b) Capacidade preditiva do modelo PLS-DA com base no valor de Q^2 validados cruzadamente em 10 vezes e a precisão de R^2 e Q^2 superiores a 0,8. O asterisco em vermelho em (b) representa o melhor modelo classificador.	52
FIGURA 2. 13 - Gráfico de <i>volcano</i> comparando os metabólitos diferenciais nos tratamentos controle e indução de folhas de soja no estágio VC. (a) metabólitos regulados na folha velha; (b) metabólitos regulados na folha jovem. Os pontos vermelhos e azuis denotam metabólitos significativamente regulados positivamente e negativamente, respectivamente. Valor $p \leq 0,05$; mudança relativa (FC)= 2,0; taxa de descoberta falsa (FDR)<0,5.....	53
FIGURA 2. 14 - Diagrama de Venn representando os IDs exclusivos e comuns dos metabólitos significativos pelo <i>volcano</i> nas folhas jovem e velha do VC. As setas vermelha e azul, referem-se às moléculas reguladas positivamente e negativamente, respectivamente.....	55
FIGURA 2. 15 - Etapas na rota de conversão do ácido linolênico em ácido jasmônico (a) e rota de sinalização para ativação das respostas induzidas em tomateiro (b).	57
FIGURA 2. 16 - Representação esquemática das funções ecológicas dos voláteis induzidos por insetos herbívoros.	59

FIGURA 2. 17 - Estruturas químicas de moléculas induzidas em folhas jovem e velha de VC. As setas em vermelho indicam que o metabólito aumentou em relação ao controle.....	61
FIGURA 2. 18 - Gráfico de PCA comparando o metaboloma das folhas jovem e velha (controle e indução) no estágio V2.....	63
FIGURA 2. 19 - Análises discriminantes por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). (a) VIP <i>scores</i> destacando a variação dos 25 metabólitos anotados de relevância significativa entre os tratamentos das folhas jovem e velha no estágio V2 da soja; (b) Capacidade preditiva do modelo PLS-DA com base no valor de Q^2 validados cruzadamente em 10 vezes e a precisão de R^2 e Q^2 superiores a 0,6. O asterisco em vermelho em (b) representa o melhor modelo classificador.	65
FIGURA 2. 20 - Gráfico de <i>volcano</i> comparando os metabólitos diferenciais nos tratamentos controle e indução de folhas de soja no estágio V2. (a) metabólitos regulados na folha velha; (b) metabólitos regulados na folha jovem. Os pontos vermelhos e azuis denotam metabólitos significativamente regulados positivamente e negativamente, respectivamente. Valor $p \leq 0,05$; mudança relativa (FC)= 2,0; taxa de descoberta falsa (FDR)<0,5.....	67
FIGURA 2. 21 - Diagrama de Venn representando os IDs exclusivos e comuns dos metabólitos significativos pelo <i>volcano</i> nas folhas jovem e velha do V2. As setas vermelha e azul, referem-se às moléculas reguladas positivamente e negativamente, respectivamente.....	68
FIGURA 2. 22 - Estruturas químicas de moléculas induzida em folhas jovem e velha de V2. As setas em vermelho indicam que o metabólito aumentou em relação ao controle.....	70
FIGURA 2. 23 - Gráfico de PCA comparando o metaboloma das folhas jovem e velha (controle e indução) no estágio V5.....	73

- FIGURA 2. 24 - Análises discriminantes por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). (a) VIP *scores* destacando a variação dos 25 metabólitos anotados de relevância significativa entre os tratamentos das folhas jovem e velha no estágio V5 da soja; (b) Capacidade preditiva do modelo PLS-DA com base no valor de Q^2 validados cruzadamente em 10 vezes e a precisão de R^2 e Q^2 superiores a 0,7. O asterisco em vermelho em (b) representa o melhor modelo classificador. 75
- FIGURA 2. 25 - Gráfico de *volcano* comparando os metabólitos diferenciais nos tratamentos controle e indução de folhas de soja no estágio V5. (a) metabólitos regulados na folha velha; (b) metabólitos regulados na folha jovem. Os pontos vermelhos e azuis denotam metabólitos significativamente regulados positivamente e negativamente, respectivamente. Valor $p \leq 0,05$; mudança relativa (FC)=2,0; taxa de descoberta falsa (FDR)<0,5..... 77
- FIGURA 2. 26 - Estruturas químicas dos compostos induzidos na folha jovem de V5. As setas vermelha e azul indicam, respectivamente, o aumento e a diminuição do metabólito em relação ao controle. 78
- FIGURA 2. 27 - Diagrama de Venn representando a quantidade de IDs exclusivos e comuns dos metabólitos significativos induzidos (aumentados e reduzidos em relação ao controle), conforme identificado pela análise de *volcano* nas folhas jovem e velha dos estágios VC, V2 e V5..... 79
- FIGURA 3. 1 - Obtenção das plantas nos estágios VC, V2 e V5 para o teste de indução prévia por *S. frugiperda*..... 88
- FIGURA 3. 2 - Experimento de indução prévia em plantas de soja nos estágios VC, V2 e V5 por herbivoria de *S. frugiperda*..... 90
- FIGURA 3. 3 - Peso ganho das lagartas no sexto dia de alimentação com folhas de soja previamente induzidas dos estágios VC, V2 e V5 (a).

Área foliar consumida das lagartas alimentadas com folhas de soja previamente induzidas dos estágios VC, V2 e V5 **(b)**. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre e dentro dos tratamentos.....95

FIGURA 3. 4 - Peso das pupas de lagartas alimentadas com folhas de soja previamente induzidas dos estágios VC, V2 e V5 **(a)**. Biomassa dos adultos de lagartas alimentadas com folhas de soja previamente induzidas dos estágios VC, V2 e V5 **(b)**. Letra diferente indica diferença significativa entre e dentro dos tratamentos.....98

RESUMO

INVESTIGAÇÃO DA INDUÇÃO DE METABÓLITOS EM SOJA [*Glycine max* (L.) Merr.] FRENTE A HERBIVORIA POR *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma cultura de grande relevância econômica e nutricional, amplamente cultivada no Brasil e no mundo. Contudo, seu cultivo enfrenta desafios significativos, sendo o ataque de pragas uma das principais ameaças à produtividade. Entre essas pragas, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), destaca-se pela alta capacidade de adaptação e resistência aos métodos tradicionais de controle, como o uso de inseticidas. Esse inseto é capaz de atacar as plantas desde os estágios iniciais de desenvolvimento até as fases reprodutivas, comprometendo tanto o rendimento quanto a qualidade das lavouras. O uso intensivo de inseticidas tem gerado impactos negativos no agroecossistema, o que motiva a busca por estratégias mais sustentáveis, como o estudo da resistência natural das plantas e dos metabólitos envolvidos nessa interação. Neste trabalho, investigou-se a indução de metabólitos em folhas jovens e velhas de soja em diferentes estágios vegetativos (VC, V2 e V5) da soja submetidas à herbivoria por *S. frugiperda*. Por meio da análise metabolômica não direcionada, realizada por UHPLC-Q-TOF-MS/MS, foi possível identificar e anotar uma diversidade de metabólitos primários e secundários, com destaque para ácidos graxos, ácidos fenólicos e terpenoides. Os resultados demonstraram que os estágios VC e V2 foram os mais responsivos ao estresse causado pela herbivoria, apresentando maiores alterações metabólicas. Em contrapartida, o estágio V5 exibiu menor indução metabólica, com compostos exclusivamente relacionados ao metabolismo primário. Paralelamente, avaliou-se o efeito da resistência induzida nos diferentes estágios vegetativos no desenvolvimento biológico de *S. frugiperda*. Para isso, as plantas foram submetidas a experimentos de herbivoria prévia, e, em bioensaios, as lagartas foram alimentadas com folhas previamente induzidas. Os parâmetros analisados incluíram peso larval, pupal e adulto e o consumo foliar. Os resultados revelaram que os estágios VC e V2 tiveram um impacto significativo no desenvolvimento de *S. frugiperda*. No estágio VC, houve uma redução expressiva nos pesos de pupas e dos adultos, enquanto no estágio V2 observou-se uma diminuição significativa na massa larval e do adulto. Por outro lado, o estágio V5 mostrou-se mais suscetível, permitindo um desenvolvimento mais favorável das lagartas, sem alterações significativas nos parâmetros biológicos avaliados. Esses achados reforçam que a idade da folha e o estágio de desenvolvimento da planta influenciam diretamente tanto a magnitude da resposta de indução metabólica quanto o desenvolvimento de *S. frugiperda*, evidenciando a importância de considerar essas variáveis no manejo sustentável de pragas agrícolas.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF METABOLITE INDUCTION IN SOYA [*Glycine max* (L.) Merr.] IN RESPONSE TO HERBIVORY BY *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is a crop of great economic and nutritional importance, widely cultivated in Brazil and around the world. However, its cultivation faces significant challenges, with pest attacks being one of the main threats to productivity. Among these pests, the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), stands out due to its high adaptability and resistance to traditional control methods, such as the use of insecticides. This insect is capable of attacking plants from the early developmental stages to the reproductive phases, compromising both yield and crop quality. The intensive use of insecticides has had negative impacts on the agroecosystem, which drives the search for more sustainable strategies, such as studying the natural resistance of plants and the metabolites involved in this interaction. In this study, the induction of metabolites in young and old soybean leaves at different vegetative stages (VC, V2, and V5) subjected to herbivory by *S. frugiperda* was investigated. Through untargeted metabolomic analysis, performed by UHPLC-Q-TOF-MS/MS, it was possible to identify and annotate a variety of primary and secondary metabolites, with a focus on fatty acids, phenolic acids, and terpenoids. The results showed that the VC and V2 stages were the most responsive to stress caused by herbivory, exhibiting greater metabolic changes. In contrast, the V5 stage showed less metabolic induction, with compounds exclusively related to primary metabolism. At the same time, the effect of induced resistance in the different vegetative stages on the biological development of *S. frugiperda* was assessed. For this, the plants were subjected to previous herbivory experiments, and in bioassays, the caterpillars were fed with previously induced leaves. The parameters analyzed included larval, pupal, and adult weights, as well as leaf consumption. The results revealed that the VC and V2 stages had a significant impact on the development of *S. frugiperda*. At the VC stage, there was a substantial reduction in pupal and adult weights, while at the V2 stage, there was a significant decrease in larval and adult mass. On the other hand, the V5 stage was more susceptible, allowing more favorable caterpillar development, without significant changes in the biological parameters evaluated. These findings reinforce that leaf age and plant development stage directly influence both the magnitude of the metabolic induction response and the development of *S. frugiperda*, highlighting the importance of considering these variables in the sustainable management of agricultural pests.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Considerações Gerais.....	1
1. 1 - INTRODUÇÃO	1
1. 2 – REVISÃO DE LITERATURA	3
1. 2. 1 - Características da Soja	3
1. 2. 2 - Cultivar de Soja BRS 284.....	6
1. 2. 3 - Pragas que Atacam as Folhas da Soja.....	8
1. 2. 4 - Importância e Biologia da <i>Spodoptera frugiperda</i>	9
1. 2. 5 - Estratégias de Defesas de Plantas contra Herbívoros	12
1. 2. 6 - Respostas de Defesas Químicas da Soja.....	15
1. 2. 7 - Metabolômica no Estudo de Resistência da Soja	17
CAPÍTULO 2: Análise Metabolômica da Soja: Variações Temporais e Espaciais em Resposta à Herbivoria por <i>Spodoptera frugiperda</i>	20
RESUMO	20
ABSTRACT.....	22
2. 1 - INTRODUÇÃO	23
2. 2 - OBJETIVOS	27
2. 3 - MATERIAL E MÉTODOS	28
2. 3. 1 - Obtenção das Plantas e Insetos	28
2. 3. 2 - Indução em folhas de soja por <i>Spodoptera frugiperda</i>	29
2. 3. 3 - Coleta e Extração de Material Vegetal	31
2. 3. 4 - Análise Metabolômica por LC-QqTOF-MS/MS.....	33
2. 3. 5 - Processamento dos Dados.....	36
2. 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39

2. 4. 1 – Análise Metabolômica entre os Diferentes Estágios de Desenvolvimento da Soja sob Herbivoria por <i>Spodoptera frugiperda</i>	39
2. 4. 2 - Análise Metabolômica Geral entre os Estágios VC, V2 e V5.....	40
2. 4. 3 - Análise Metabolômica em Folhas de Soja após Herbivoria: comparação entre idades nos estágios VC, V2 e V5.....	48
2. 4. 4 - Metabolômica Comparativa das Folhas de Soja no Estágio VC..	49
2. 4. 5 - Metabolômica Comparativa das Folhas de Soja no Estágio V2....	62
2. 4. 6 - Metabolômica Comparativa das Folhas de Soja no Estágio V5....	72
2. 5 - CONCLUSÕES	80
CAPÍTULO 3: Estudo do Desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> em Diferentes Estágios da Soja.....	82
RESUMO	82
ABSTRACT	83
3. 1 - INTRODUÇÃO	84
3. 2 – OBJETIVOS.....	86
3. 3 - MATERIAL E MÉTODOS	87
3. 3. 1 - Bioensaio de Desenvolvimento com <i>Spodoptera frugiperda</i>	87
3. 3. 2 - Obtenção das Plantas e Insetos	87
3. 3. 3 - Indução Prévia em Folhas de Soja.....	89
3. 3. 4 - Bioensaio de Alimentação de <i>Spodoptera frugiperda</i> com Folhas de Soja Previamente Induzidas	90
3. 3. 5 - Análises Estatísticas.....	92
3. 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	94

3. 4. 1 – Biologia das Lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> e Consumo Foliar	94
3. 5 - CONCLUSÕES	104
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIA	106
APÊNDICE	126

CAPÍTULO 1: Considerações Gerais.

1.1 - INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é uma das mais importantes culturas de oleaginosas do comércio agrícola mundial. Esse grão, por ter um grande valor nutricional, é amplamente usado na alimentação humana (óleo, leite de soja e tofu), animal (farelo de soja) e na produção de biocombustível¹⁻³. No Brasil, a soja é considerada a principal espécie vegetal do agronegócio brasileiro, com uma produção estimada de 149,4 milhões de toneladas, o que mantém o país como o maior produtor e exportador de farelo e grãos de soja no mundo^{4,5}

Os insetos-praga impactam diretamente na produção, rendimento e qualidade das culturas agrícolas. Diante disso, as lavouras de soja são afetadas por muitos insetos herbívoros, resultando em perdas devastadoras de produtividade⁶. Na cultura da soja, a *Spodoptera frugiperda* é vista como uma praga secundária; no entanto, pode causar danos tão grandes ou até maiores que a lagarta da soja, a *Anticarsia gemmatilis*.

A *S. frugiperda* tem a capacidade de se alimentar de plantas muito jovens, o que intensifica a perda da área fotossintética e aumenta os prejuízos econômicos. Inicialmente, essa lagarta alimenta-se das folhas e, à medida que a planta entra nos estágios reprodutivos, passa a consumir também as vagens^{7,8}. Contudo, as plantas contam com vários mecanismos de defesa contra o ataque de herbívoros. Por exemplo, a produção de metabólitos que são capazes de modificar o comportamento de insetos e/ou inibir o seu crescimento e desenvolvimento^{9,10}.

Os compostos defensivos das plantas podem ser expressos de forma constitutiva ou ser induzida em resposta a ataques. Enquanto os

compostos constitutivos estão sempre presentes, os metabólitos de defesa induzidos são ativados pela herbivoria e representam uma estratégia adaptativa baseada no reajuste do metabolismo primário e secundário da planta. Esse mecanismo permite a realocação eficiente de recursos energéticos, ajudando a planta a resistir ou tolerar os danos causados por insetos herbívoros. Além disso, os metabólitos induzidos são mais específicos no combate aos herbívoros e apresentam menor custo metabólico para a planta em comparação com as defesas constitutivas^{7,11}.

Estudos voltados à identificação de fontes de resistência em genótipos de soja contra *S. frugiperda* têm o potencial de oferecer alternativas viáveis aos métodos de controle atualmente utilizados, contribuindo significativamente para o manejo dessa praga na cultura da soja. Este trabalho busca analisar a indução de metabólitos em plantas de soja expostas à herbivoria, além de avaliar como a resistência induzida influencia o desenvolvimento biológico da *S. frugiperda*. Portanto, avanços nesses conhecimentos possibilitarão entender como esse metabolismo está relacionado com as estratégias de defesa da soja frente ao ataque de pragas agrícolas.

1. 2 – REVISÃO DE LITERATURA

1. 2. 1 - Características da Soja

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é uma espécie pertencente à classe das Eudicotiledôneas, família Fabaceae, subfamília Papilionoideae e tribo Phaseoleae. É uma planta herbácea anual de autofecundação, que apresenta variação em determinados traços morfológicos influenciados por condições ambientais. Seu desenvolvimento ocorre de forma mais eficiente em temperaturas acima de 13°C, com uma faixa ideal entre 20°C e 30°C¹².

Apresenta altura variando entre 60 e 110 cm, dotada de um sistema radicular pivotante, composto por uma raiz principal bem desenvolvida e numerosas raízes secundárias. Essas raízes têm a capacidade de estabelecer simbiose com bactérias responsáveis pela fixação de nitrogênio atmosférico¹³.

As folhas da soja são trifolioladas, exceto pelo primeiro par de folhas simples localizado no primeiro nó acima do nó cotiledonar. A planta apresenta flores que podem ser brancas, roxas ou de tonalidade intermediária. Suas vagens são inicialmente verdes durante o desenvolvimento, tornando-se marrons ao atingirem a maturidade^{12,14}.

As sementes possuem superfície lisa e variam de uma a cinco por vagem, apresentando formato elíptico ou globoso, tegumento amarelo pálido e hilo preto. Quanto ao ciclo de desenvolvimento, a soja, uma planta anual, pode ser classificada como de ciclo determinado (cessa o crescimento após a emissão da primeira flor), ciclo indeterminado (continua crescendo após o início da floração) ou semideterminado (crescimento limitado após a floração). Os cultivares são agrupados em classes de maturação que incluem

precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio, de acordo com a variedade e as condições da região de cultivo¹²⁻¹⁴.

Os estágios fenológicos da soja foram definidos e descritos de maneira detalhada por FEHR e CAVINESS et al. (1971)¹⁵, que desenvolveram um sistema de classificação, como mostrado nas Tabelas 1.1, 1.2 e na Figura 1.1. Nesse sistema, utilizam-se as letras "V" e "R" para representar os estágios vegetativos (fases de estabelecimento e desenvolvimento da planta) e reprodutivos (fases de florescimento e maturação das vagens), respectivamente, seguidos dos índices numéricos que diferenciam estágios específicos nessas duas fases de desenvolvimento da planta, com exceção dos estágios VE (emergência) e VC (cotilédone)¹⁶.

TABELA 1. 1 - Descrição dos Estágios de desenvolvimento da soja.

Símbolo	Denominação	Descrição
VE	Emergência	Os cotilédones estão acima da superfície do solo.
VC	Cotilédone desenvolvido	Cotilédones totalmente abertos.
V1	Primeiro nó	As folhas unifoliadas estão totalmente abertas.
V2	Segundo nó	A primeira folha trifoliada está aberta.
V3	Terceiro nó	A segunda folha trifoliada está aberta.
V4	Quarto nó	A terceira folha trifoliada está aberta.
V5	Quinto nó	A quarta folha trifoliada está aberta.
V(n)	Enésimo nó	Enésimo nó ao longo da haste principal com trifólio aberto.

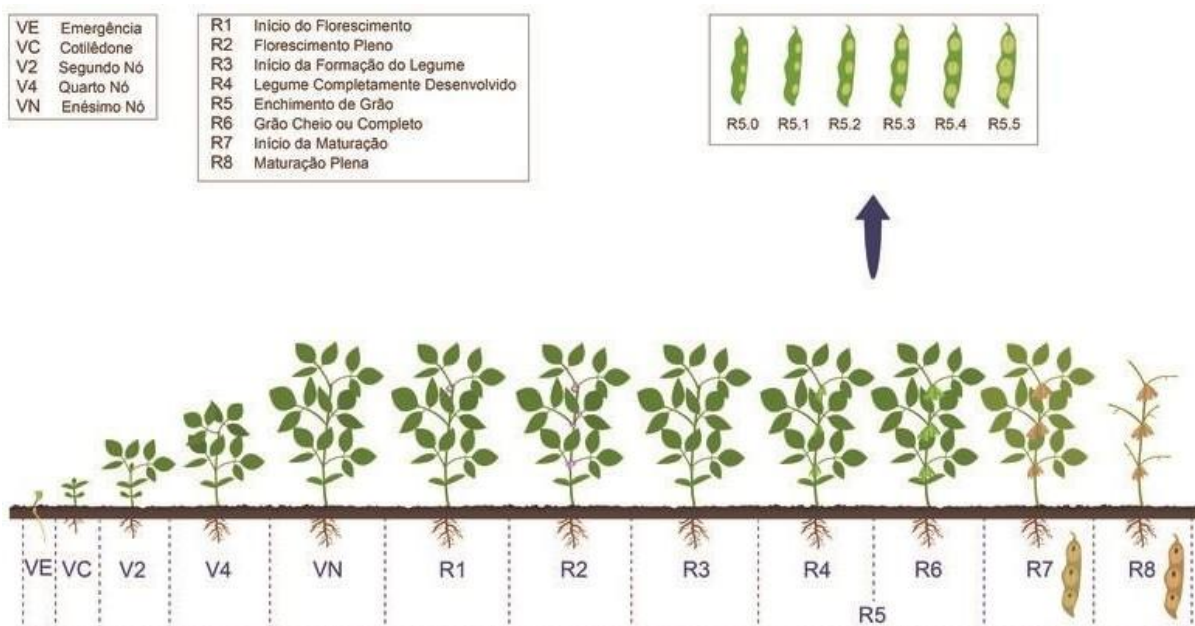
Fonte: (FEHR e CAVINESS,1971).

TABELA 1. 2 - Descrição dos estágios reprodutivos da soja.

Símbolo	Denominação	Descrição
R1	Início do florescimento	Uma flor aberta em qualquer nó da haste principal.
R2	Florescimento pleno	Uma flor aberta em um dos dois nós superiores da haste principal.
R3	Início da frutificação	Vagem com 0,5 a 2 cm em um dos quatro nós superiores da haste principal.
R4	Frutificação plena	Maioria das vagens no terço superior da haste principal com comprimento de 2 a 4 cm.
R5	Início da granação	Até 10% de granação máxima na maioria das vagens localizadas no terço superior da haste principal.
R6	Final da granação	Grão cheio em um dos quatro nós superiores da haste principal.
R7	Início da maturação	Uma vagem com coloração de madura na haste principal.
R8	Maturação plena	Mais de 95% das vagens com coloração de madura.

Fonte: (FEHR e CAVINESS,1971).

FIGURA 1. 1- Escala fenológica da soja.



Adaptado por TEJO et al, 2019.

Ao longo de seu ciclo, a cultura da soja está sujeita ao ataque de diversas pragas e a ação de diferentes estresses abióticos, que podem causar danos significativos e limitar a produtividade, resultando em grandes perdas. Entre os principais desafios enfrentados, a ação dos insetos-praga tem impactado negativamente a produção de soja no Brasil ^{6,7}.

1. 2. 2 - Cultivar de Soja BRS 284

A soja BRS 284 é uma cultivar não transgênica, de ciclo precoce, pertencente ao grupo de maturação 6.3, com hábito de crescimento indeterminado. Do ponto de vista botânico, apresenta flores de coloração roxa, pubescência cinza, hilo marrom-claro. A planta atinge uma altura média de aproximadamente 90 cm e possui elevado potencial de ramificação, o que pode favorecer a formação de um maior número de vagens e contribuir para a estabilidade da produtividade em diferentes condições ambientais ^{17,18}.

Desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), essa cultivar apresenta elevado potencial produtivo, especialmente em altitudes inferiores a 800 metros, e ampla adaptação regional, sendo recomendada para os estados do Paraná, São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso ^{17,18}.

No que se refere à resistência a doenças, a BRS 284 tem demonstrado desempenho fitossanitário satisfatório. Em avaliações realizadas sob condições controladas (casa de vegetação), evidenciou resistência ao cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis*) e à mancha "olho de rã" (*Cercospora sojina*). Em condições de campo, apresentou resistência à pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv.

glycines), à podridão parda da haste (*Phialophora gregata*) e moderada resistência à podridão radicular de *Phytophthora*. Tais atributos conferem à cultivar maior segurança fitossanitária, reduzindo o impacto das principais doenças da cultura nas regiões onde é recomendada^{17,18}.

Em relação aos nematoides, a BRS 284 apresenta moderada resistência ao nematoide de galha *Meloidogyne javanica*, entretanto é suscetível a *Meloidogyne incognita*, o que demanda atenção especial ao histórico da área de cultivo e à adoção de estratégias de manejo integrado de nematoides. Quanto à interação com insetos-praga, como ocorre com a maioria das cultivares convencionais, a BRS 284 não possui resistência genética específica aos principais insetos que atacam a cultura da soja^{17,18}.

Assim, essa cultivar é considerada suscetível a diversas pragas, com destaque para as lagartas desfolhadoras como *Chrysodeixis includens* (falsa-medideira), *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) e *Anticarsia gemmatilis* (lagarta-da-soja). Também está sujeita ao ataque de percevejos, especialmente *Euschistus heros* (percevejo-marrom) e *Piezodorus guildinii* (percevejo-verde), que causam danos diretos às vagens e grãos¹⁸⁻²⁰.

Com base nas informações apresentadas, observa-se que a cultivar de soja BRS 284, embora apresente elevado desempenho produtivo e resistência a diversas doenças, demonstra suscetibilidade a insetos-praga relevantes. Diante disso, o estudo aprofundado dessa cultivar sob a ótica das interações planta-inseto se mostra fundamental, especialmente considerando os desafios associados ao manejo de lagartas desfolhadoras.

Nesse contexto, investigações que visem compreender os mecanismos fisiológicos e químicos envolvidos na suscetibilidade da BRS 284 podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes e sustentáveis de controle, bem como orientar futuros programas de melhoramento genético com foco em resistência a insetos.

1. 2. 3 - Pragas que Atacam as Folhas da Soja

As lagartas desfolhadoras representam um dos principais grupos de insetos-praga na cultura da soja, impactando diretamente a produtividade ao reduzir a área foliar disponível para a fotossíntese. Dentre essas pragas, destacam-se as lagartas, pertencentes à ordem Lepidoptera. As principais espécies desse grupo incluem *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (lagarta-da-soja); *Chrysodeixis includens* (Walker) (lagarta falsa-medideira); *Helicoverpa armigera* (Hübner) (lagarta do velho mundo) e lagartas do gênero *Spodoptera*, como, *S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda*²¹⁻²³.

A espécie *A. gemmatalis*, conhecida como lagarta-da-soja, é uma das pragas mais importantes da cultura. Suas lagartas consomem intensamente as folhas, produzindo cortes desiguais que, em casos de infestações severas, podem levar à completa desfolha da planta. Já, a lagarta falsa-medideira, a lagarta-das-maçãs e as lagartas do gênero *Spodoptera* além de consumir as folhas, atacam também outras estruturas como as flores, vagens e as sementes da soja, sendo também consideradas pragas com alto potencial de danos na cultura²⁴⁻²⁸.

Em particular, a espécie *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) gera grande preocupação por ser uma praga polífaga, ou seja, capaz de se alimentar de plantas pertencentes a diferentes gêneros e espécies, incluindo culturas de importância econômica, como milho, algodão e soja, amplamente cultivadas no Brasil. No milho, as lagartas inicialmente colonizam a planta durante a fase vegetativa, alimentando-se das raízes e folhas jovens. Já no algodão, as lagartas de *S. frugiperda* começam consumindo a face inferior das folhas, em seguida migram para os botões florais e flores, e por fim se dirigem à base da planta, sob a cobertura vegetal, para se alimentar das cápsulas antes de completar seu ciclo reprodutivo^{8,29,30}.

Na cultura da soja, *S. frugiperda* é considerada uma praga secundária, mas pode causar danos equivalentes ou até mais severos que os de *A. gemmatilis*. Essa espécie é capaz de atacar a planta em estágios iniciais de desenvolvimento, agravando a redução da área fotossintética e ampliando as perdas econômicas. Em um primeiro momento, *S. frugiperda* alimenta-se das folhas, mas, conforme a planta atinge os estágios reprodutivos, passa a atacar também as vagens em fase inicial de formação^{288,31}.

1. 2. 4 - Importância e Biologia da *Spodoptera frugiperda*

O gênero *Spodoptera* inclui 30 espécies descritas, sendo a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) uma das principais pragas que afetam culturas em regiões tropicais das Américas, especialmente no Brasil^{19,32}. Sua relevância como praga se deve à elevada polifagia, com uma ampla variedade de plantas hospedeiras, destacando-se cultivos de grande importância econômica, como milho, algodão e soja³³⁻³⁶.

A *S. frugiperda* apresenta metamorfose completa, com ciclo de vida composto por quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos são depositados em massas, geralmente em duas camadas sobrepostas, na face superior das folhas. Cada fêmea pode colocar de 100 a 500 ovos por postura, totalizando entre 1.500 e 2.000 ovos ao longo de sua vida. Próximo à eclosão, os ovos tornam-se escuros devido à coloração da cápsula cefálica da lagarta. O período de incubação é influenciado principalmente pela temperatura, enquanto a umidade exerce menor impacto^{34,37-39}.

Após a eclosão, as lagartas inicialmente consomem a casca do ovo (córion) e, após um período de repouso de duas a dez horas, começam a buscar alimento. A dispersão inicial das lagartas ocorre por meio do balonismo, no qual elas produzem fios de seda que permitem serem

transportadas pelo vento. No entanto, essa habilidade é perdida após o primeiro instar. As lagartas de *S. frugiperda* possuem características distintas, como tubérculos em formato de trapézio nos segmentos abdominais, com pináculos pretas e um pelo curto e grosso na base, além de uma marca em "Y" invertido na frente⁴⁰⁻⁴³.

A duração dos instares larvais varia conforme a temperatura e a qualidade do alimento disponível. A fase larval inclui seis instares, cada um dividido em períodos de alimentação e repouso, ambos associados à troca de pele e podendo ser prolongado por temperaturas baixas. O canibalismo é um comportamento comum entre as lagartas, atuando como regulador natural da população^{40,41}.

Ao completar o desenvolvimento larval, a lagarta migra para o solo, onde entra na fase de pré-pupa, caracterizada pela interrupção da alimentação e duração de até cinco dias, dependendo das condições climáticas. Em seguida, ocorre a transformação em pupa, cuja duração é de aproximadamente nove dias^{14,36,40}. As mariposas emergentes voam para longe, acasalam e iniciam a oviposição entre o terceiro e o quarto dia após a emergência. Em regiões com condições climáticas favoráveis ao longo do ano, podem ocorrer seis ou mais gerações⁴⁰.

O comportamento alimentar da *S. frugiperda* varia entre os diferentes instares larvais, dependendo da planta hospedeira. Em milho, as lagartas neonatas inicialmente raspam um dos lados da folha, deixando a epiderme do lado oposto intacta, causando o sintoma conhecido como folhas raspadas. A partir do segundo instar, começam a fazer perfurações nas folhas^{8,28}. Do terceiro instar até a fase de pré-pupa, as lagartas consomem grandes áreas foliares, reduzindo a capacidade fotossintética e comprometendo a produtividade da planta. Além disso, elas podem atacar as espigas, afetando a qualidade dos grãos^{34,40}.

No algodão, as lagartas de primeiro a terceiro instar alimentam-se predominantemente das folhas localizadas nas partes média e inferior do dossel^{44,45}. Os instares mais avançados, do quarto ao sexto, migram para a base do dossel e passam a consumir as estruturas reprodutivas da planta, incluindo flores e cápsulas, o que pode causar danos severos às formas de frutificação em casos de altas infestações⁴⁵.

Na cultura da soja, as lagartas de *S. frugiperda*, quando não controladas, atacam plântulas rentes ao solo, alimentam-se das folhas na fase inicial e, em estágios mais avançados, podem consumir tanto as folhas quanto as vagens em formação⁴⁶.

Embora a *S. frugiperda* demonstre preferência por plantas da família Poaceae, como milho, trigo e arroz, o aumento significativo da sua ocorrência na soja nos últimos anos tem representado uma preocupação crescente para os produtores^{28,36}

Esse cenário é agravado pela elevada capacidade de adaptação do inseto às cultivares transgênicas (geneticamente modificadas), como a soja *Bt* (*Bacillus thuringiensis*), desenvolvida para ser resistente a insetos. Essa adaptação, aliada ao rápido crescimento populacional da praga, ao hábito de cortar plantas jovens e ao elevado potencial de desfolha e danos em flores e vagens, reforça a necessidade de estratégias de controle eficazes para minimizar as perdas de produtividade^{23,29,47}.

1. 2. 5 - Estratégias de Defesas de Plantas contra Herbívoros

Insetos e plantas têm coexistido por milhões de anos e aprimoraram uma série de relações que afetam diretamente esses organismos em todos os níveis. Os processos evolutivos produzem uma enorme variação de características que permitem adaptação dos indivíduos ao meio, tornando essa interação inseto-planta um sistema dinâmico e complexo. As adaptações podem ocorrer tanto nas plantas quanto nos insetos, num sistema onde um age ou reage conforme a resposta do outro⁴⁸⁻⁵¹.

As plantas, devido à sua forma sésil, desenvolveram diversas estratégias defensivas para resistir aos estresses causados por herbívoros. Essas estratégias podem ser classificadas em três mecanismos principais. O primeiro mecanismo envolve traços de resistência, que incluem características físicas, como tricomas, espinhos e folhas endurecidas; químicas, como compostos fenólicos, terpenoides, compostos nitrogenados, taninos, lignina, celulose, hormônios vegetais, inibidores de protease e compostos voláteis; e características bióticas, como a capacidade de atrair ou manter inimigos naturais dos herbívoros, causando ferimentos, morte ou redução no crescimento e reprodução desses organismos⁵²⁻⁵⁴.

O segundo mecanismo é a tolerância, que atua como uma forma de compensação, minimizando os efeitos da herbivoria. Este mecanismo envolve mudanças fenológicas, aumento na eficiência fotossintética, ativação de meristemas dormentes, utilização de reservas de recursos ou redistribuição de alocação de recursos para sustentar o crescimento e desenvolvimento da planta mesmo sob ataque^{25,55,56}.

Por fim, o terceiro mecanismo é a evitação, que busca reduzir a probabilidade de as plantas serem localizadas pelos herbívoros. Exemplos incluem o crescimento de plantas altamente suscetíveis próximas a espécies

bem protegidas ou a adoção de padrões fenológicos que dificultem o ataque por herbívoros.

Além do mais, essas estratégias defensivas podem ser de caráter constitutivo, enquanto outras são induzidas, ativando-se apenas após a detecção de agressões^{25,51,55,57}. As defesas constitutivas são características presentes de forma permanente nas plantas, como tricomas, espinhos, camadas de cera e revestimentos protetores. Esses mecanismos incluem também a presença de metabólitos secundários. Apesar de já estarem ativas em condições de ausência de ataque, observa-se que esses tipos de defesa podem ser intensificados durante eventos de herbivoria. Por outro lado, as defesas induzidas são ativadas apenas após o reconhecimento do estresse e, por isso, demandam menos recursos energéticos⁵⁸⁻⁶⁰.

A resistência induzida é um mecanismo em que um estímulo específico ativa sinais na planta hospedeira, levando à expressão de genes relacionados à defesa, à produção de proteínas e a alterações metabólicas específicas. Essas alterações metabólicas reduzem a atratividade e a adequação da planta como hospedeira, limitando os danos causados por pragas e patógeno^{11,61}. Além disso, a resistência induzida também é sentida nas partes não danificadas da mesma planta⁶². A comunicação entre diferentes tecidos vegetais ocorre por meio de moléculas sinalizadoras, resultando em uma resposta sistêmica. Essa resposta pode incluir a produção das mesmas proteínas defensivas observadas na resposta local. Contudo, a dinâmica temporal dessa produção e os detalhes das respostas podem variar entre os dois tipos de reações^{58,63,64}.

A resistência induzida vem sendo estudada em diversos vegetais de importância agrícola, como soja, arroz, tomate e trigo. Por exemplo, YANG et al. (2023)⁶³ observaram aumentos significativos nos níveis de benzoxazinoides nas folhas de milho infestadas por *S. frugiperda*. Em

plantas de tomate, CHUNG e FELTON (2011)²⁴, investigaram as respostas induzidas sobre o desenvolvimento da lagarta-do-tabaco, *Manduca sexta*. PERUCA et al. (2018)⁴⁶ conduziram um estudo sobre os efeitos adversos em *S. frugiperda* associados às defesas induzidas em plantas de soja.

Além dessas estratégias de resistência, plantas também utilizam mecanismos de defesa direta e indireta. As defesas diretas são características intrínsecas da planta que impactam diretamente a biologia dos herbívoros, interferindo no desenvolvimento, crescimento ou digestão desses organismos. Por outro lado, as defesas indiretas são mediadas pela liberação de metabólitos voláteis pelas plantas, em resposta à alimentação dos insetos, que funcionam como sinalizadores químicos para atrair predadores ou parasitoides dos herbívoros^{11,60}. Por exemplo, o alcaloide nicotina, um metabólito secundário produzido por plantas, demonstrou dificultar a alimentação de insetos⁶⁵. Além disso, predadores como joaninhas da família Coccinellidae, e ácaros da família Tydeidae são frequentemente atraídos por compostos voláteis liberados pelas plantas. De maneira similar, vespas parasitas da família Braconidae também são atraídas por voláteis emitidos por plantas danificadas⁶⁰.

Embora as defesas diretas e indiretas sejam frequentemente tratadas de forma independente, sabe-se que certos compostos associados às defesas indiretas podem influenciar o comportamento dos herbívoros. Da mesma forma, substâncias relacionadas às defesas diretas podem impactar o desenvolvimento dos inimigos naturais dos herbívoros⁶⁶. Contudo, essas defesas podem apresentar variações qualitativas e quantitativas dependendo de fatores como: a espécie de herbívoro causador do dano, seu hábito alimentar, o estágio fisiológico da planta e a espécie vegetal atacada^{11,67}.

1. 2. 6 - Respostas de Defesas Químicas da Soja

Cada fase de desenvolvimento da planta de soja, desde o estabelecimento da plântula até a produção de sementes, está sujeita a estresses por insetos herbívoros que podem afetar o seu desenvolvimento e conseqüentemente, sua produtividade^{68,69}. Para combater a herbivoria, a soja tem criado diversos mecanismos de defesa, como a produção de compostos especializados bioativos oriundos do seu metabolismo que podem ter ações repelentes, antinutritivas ou tóxicas sobre os insetos herbívoros⁶⁷.

A produção de metabólitos secundários é um dos principais mecanismos de defesa química da soja. Dentre os metabólitos secundários sintetizados, os flavonoides são os principais compostos encontrados^{9,70}. Estudos na literatura apontam os flavonoides como substâncias tóxicas relevantes na defesa da soja frente a patógenos e insetos herbívoros. Os flavonoides rutina (quercetina 3-*O*-rutinosídeo) e genisteína encontrados nas folhas de alguns genótipos de soja, apresentaram efeitos negativos nos parâmetros biológicos (desenvolvimento larval, sobrevivência e peso das pupas) e no desempenho alimentar de lagartas da *Anticarsia gemmatalis*¹⁰, *Trichoplusia ni* (Hübner)⁷¹ e *Spodoptera frugiperda*^{20,72}. Além disso, extratos de folhas de soja atacadas por *A. gemmatalis* apresentaram variação nos níveis de isoflavonas do tipo genisteína e afrormosina⁷³.

Outros metabólitos secundários, como taninos, fibras e ligninas, também desempenham um papel significativo na resistência da soja contra insetos. Estudos demonstram que a concentração desses compostos em folhas, vagens e grãos de cultivares, como a IAC-100, está diretamente associada à resistência contra *Cydia virescens*, sendo os taninos destacados como um dos principais mecanismos químicos de defesa⁷⁴.

Além dos compostos tóxicos presentes nos tecidos, a soja também é capaz de liberar metabólitos voláteis em resposta a danos^{75,76}. Diferentes compostos têm sido identificados em plantas de soja, incluindo terpenos, ésteres, aldeídos e álcoois. Por exemplo, foi visto que a herbivoria por *A. gemmatalis* aumentou significativamente a emissão de 3-hexen-1-ol, 1-octen-3-ol, 4-hexen-1-ol, ocimeno, linalool, metil salicílico e 12-farneseno⁷⁶⁻⁸⁰. Por sua parte, WAN et al. (2017)⁸¹ mostraram que lagartas de *Spodoptera exigua* infectadas com nucleopoliedrovírus melhoraram a função defensiva da soja por meio da liberação de três voláteis, 3-octanona, 2-hexenal e 2-butil-1,1,3-trimetil-ciclohexano, os quais também estão relacionados com a atração de mais parasitoides⁸¹.

Os inibidores de protease (IP) também desempenham um papel fundamental nas estratégias defensivas das plantas contra herbívoros^{11,82-84}. Esses compostos estão frequentemente concentrados em tecidos de armazenamento, onde atuam como barreiras naturais. No entanto, sua eficácia aumenta quando sua síntese é induzida por danos físicos ou pela ação de herbívoros. A ativação dos genes responsáveis pela produção de IP está diretamente associada à sinalização mediada pelo ácido jasmônico na via da lipoxigenase (LOX)²⁷.

Quando ingeridos pelos insetos, os IP inibem a atividade das proteases digestivas presentes no trato intestinal, prejudicando a absorção de nutrientes essenciais ao crescimento e à reprodução dos herbívoros. Um estudo realizado por PAIXÃO et al. (2013)⁸³ revelou que lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com uma variedade de soja resistente apresentaram alterações fisiológicas que afetaram negativamente a digestão de proteínas. Esses efeitos foram atribuídos ao aumento dos níveis de IP produzidos pela planta, destacando a eficácia desse mecanismo como uma ferramenta de defesa química contra pragas agrícolas.

Outra estratégia que as plantas utilizam é a produção de espécies reativas de oxigênio. Essas moléculas promovem estresse oxidativo que pode intensificar a atividade de enzimas oxidativas, como lipoxigenase, peroxidase e polifenoloxidase^{85,86}. A lipoxigenase, encontrada em leguminosas como soja e feijão vermelho, desempenha um papel crucial nesse processo, sendo sua ação associada à resistência contra ácaros na soja⁸⁷. Estudos indicam que essa resistência está fortemente correlacionada com o aumento da peroxidação lipídica e a degradação de carotenóides induzida pela lipoxigenase⁸⁸.

Adicionalmente, compostos como ácido azeláico, benzotriazol, ácido giberélico e ácido jasmônico têm mostrado capacidade de interferir nas respostas das plantas a herbívoros e patógenos, ou até mesmo estimular a produção de metabólitos relacionados à defesa^{88,89}. Um exemplo é o estudo de GORDY et al. (2015)³⁰, que relata uma redução consistente no crescimento de *S. frugiperda* ao serem alimentadas com folhas de algodão e soja tratadas com ácido jasmônico.

1. 2. 7 - Metabolômica no Estudo de Resistência da Soja

Embora alguns mecanismos de ação e os benefícios associados à resistência das plantas contra a herbivoria sejam conhecidos, muitos dos processos bioquímicos vegetais ainda permanecem parcialmente ou totalmente não elucidados. Diversas abordagens podem ser aplicadas para compreender as alterações bioquímicas induzidas por fatores externos^{90,91}.

Entre essas, as abordagens não direcionadas têm se destacado por não exigirem hipóteses prévias, tornando-se ideais para lidar com cenários complexos. As ciências ômicas, como genômica, proteômica e

metabolômica, investigam o perfil de genes, proteínas e metabólitos em sistemas biológicos, respectivamente. Dentre elas, a metabolômica tem sido amplamente utilizada para identificar moléculas bioativas relacionadas à resistência de plantas a insetos na interação inseto-planta^{90,92-96}.

A metabolômica é tradicionalmente descrita como a análise abrangente e holística de todas as moléculas de pequeno peso molecular, ou metabólitos com massa ≤ 1500 Da, presentes em um sistema biológico⁹⁷. Com isso, informações detalhadas obtidas a partir de órgãos foliares podem revelar padrões característicos que refletem a impressão digital metabólica do sistema vegetal estudado. A aplicação dessa ciência ômica multidisciplinar tem grande utilidade para explorar potenciais metabólitos bioativos e investigar o mecanismo de resposta metabólica^{98,99}.

Além disso, avanços recentes em equipamentos analíticos, como a espectrometria de massas de alta resolução, têm facilitado a detecção e anotação de uma ampla gama de moléculas, possibilitando análises sensíveis e seletivas. Esses avanços têm impulsionado a adoção da metabolômica nas ciências agrícolas. A combinação da espectrometria de massas com técnicas de Cromatografia Gasosa (GC-MS) e Cromatografia Líquida (LC-MS) constitui uma das principais plataformas analíticas para determinar o perfil metabolômico abrangente de plantas. Esses métodos são complementados pela disponibilidade de bancos de dados e por ferramentas avançadas de gerenciamento de dados, incluindo análises estatísticas multivariadas e bioinformáticas, que auxiliam na interpretação detalhada dos resultados¹⁰⁰⁻¹⁰³.

RAZZAQ e colaboradores (2022)¹⁰⁴ ressaltam a importância dos métodos avançados de metabolômica aliados a outras abordagens ômicas como ferramentas indispensáveis para desvendar as complexas interações entre genótipo, metabólito e fenótipo em plantas. Essas técnicas permitem o

melhoramento vegetal assistido por metabolômica, viabilizando a identificação de marcadores metabólicos associados à resposta a estresses, a exploração de redes metabólicas envolvidas na resistência a estresses abióticos e bióticos, bem como a triagem e seleção de culturas mais adaptadas às mudanças climáticas com base em perfis metabólicos^{4,90,92,99,105}.

Pesquisas baseadas em metabolômica têm identificado metabólitos que conferem resistência a estresses bióticos em plantas de soja. Por exemplo, ZHU et al. (2018)¹⁰⁶ detectaram metabólitos como açúcares (monossacarídeos e oligossacarídeos), ácidos orgânicos, derivados de aminoácidos e metabólitos secundários associados à resistência contra o patógeno *Phytophthora sojae*. De maneira semelhante, YOUSEFI-TAEMEH et al. (2021)¹⁰⁷ analisaram alterações metabolômicas em cultivares de soja resistentes à lagarta *Chrysodeixis includens* e observaram que a resistência da planta está associada a mudanças significativas em centenas de metabólitos, sobretudo flavonoides.

Essas descobertas mostram que as respostas metabólicas da soja são altamente específicas e dependem do tipo de interação biótica, como observado em estudos que analisaram respostas a microrganismos, nematoides, pulgões e insetos¹⁰⁸⁻¹¹². Nesse contexto, a metabolômica se destaca como uma ferramenta inovadora e eficiente para compreender essas alterações, permitindo a identificação de vias metabólicas envolvidas nas respostas de defesa da planta. Essa abordagem oferece *insights* valiosos que podem ser aplicados para uma caracterização mais detalhada e precisa da resistência da soja a diversos fatores bióticos^{113,114}.

CAPÍTULO 2: Análise Metabolômica da Soja: Variações Temporais e Espaciais em Resposta à Herbivoria por *Spodoptera frugiperda*.

RESUMO - A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é uma cultura agrícola de grande importância mundial, mas enfrenta desafios como pragas e estresses abióticos, que podem resultar em perdas significativas. Entre essas pragas, a *Spodoptera frugiperda* afeta negativamente a produção de soja no Brasil. O controle dessas pragas tem sido realizado através de inseticidas. Porém, seu uso prolongado pode causar impactos negativos no agroecossistema. Isso levou programas de manejo de pragas a explorar a resistência natural das plantas com foco em entender como as moléculas produzidas podem afetar o desempenho e desenvolvimento dos insetos-praga. Alguns estudos mostram que essas moléculas bioativas são moduladas quando as plantas estão sob estresse, e essas alterações dependem de muitos fatores. Aspectos como a idade da folha e o estágio de crescimento da planta influenciam significativamente o grau de resistência em genótipos de soja. Diante do exposto, este trabalho visa investigar a indução de metabólitos em folhas de soja submetidas à herbivoria por *Spodoptera frugiperda*. A indução desses compostos foi avaliada em folhas injuriadas jovens e velhas, e em diferentes estágios de desenvolvimento da soja. As sementes de soja convencional do genótipo BRS 284 foram germinadas e mantidas em casa de vegetação. Amostras de folhas velhas e novas, com ou sem herbivoria, dos estágios VC, V2 e V5 foram coletadas e extraídas em metanol/água 1:1 (v/v). A análise metabolômica foi realizada por UHPLC-Q-TOF-MS/MS, com uma abordagem não direcionada. A abundância dos principais metabólitos anotados, responsáveis pela diferenciação dos perfis metabólicos entre os grupos, foi avaliada por meio de análises uni e multivariadas. Os estágios VC e V2 compartilham variações metabólicas semelhantes, enquanto o estágio V5 apresenta uma distinção clara. Os compostos que apresentaram alterações significativas na abundância pertencem, em sua maioria, ao metabolismo primário, como ácidos graxos e seus derivados. Dentre eles, destacaram-se os ácidos voláteis da família dos octadecanoides que são altamente acumulados nos estágios VC e V2. Observamos que ácidos graxos, ácidos fenólicos e terpenoides são os principais metabólitos encontrados na soja durante a fase vegetativa, mas são acumulados de maneira diferenciada em folhas jovens e velhas, de modo que os órgãos jovens aparentam ser mais induzíveis do que os órgãos mais velhos. Anotamos os principais metabólitos que diferiram significativamente entre os tratamentos: muurola-4,10(14)-dien-3-ona, ácido havaridico F, daidzeína e ácido linolênico foram induzidos apenas em folhas velhas de VC; enquanto nas folhas jovens são induzidos majoritariamente derivados de ácidos graxos. Em V2, os terpenos foram os compostos secundários mais induzidos em ambas as folhas, porém, nas folhas mais velhas houve maior diversidade desses metabólitos como turmerona, ácido smaditerpênico C, diéster

de betulina e muurola-4,10(14)-dien-3-ona. Já no estágio V5, apenas as folhas jovens apresentaram compostos induzidos, todos pertencentes ao metabolismo primário. Assim, a idade da folha e o estágio da soja influenciam diretamente a resposta de indução: os estágios VC e V2 mostraram uma resposta metabólica mais robusta ao estresse, enquanto V5 demonstra ser menos responsivo à herbivoria do ponto de vista do seu perfil metabólico.

ABSTRACT - Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is a globally important agricultural crop but faces challenges such as pests and abiotic stresses, which can lead to significant losses. Among these pests, *Spodoptera frugiperda* negatively affects soybean production in Brazil. Pest control has traditionally relied on insecticides; however, their prolonged use can cause negative impacts on the agroecosystem. This has led pest management programs to explore the natural resistance of plants, focusing on understanding how plant-produced molecules can affect the performance and development of insect pests. Some studies indicate that these bioactive molecules are modulated when plants are under stress, and these alterations depend on multiple factors. Aspects such as leaf age and plant growth stage significantly influence the degree of resistance in soybean genotypes. Given this context, this study aims to investigate the induction of metabolites in soybean leaves subjected to herbivory by *Spodoptera frugiperda*. The induction of these compounds was evaluated in young and old injured leaves, and at different stages of soybean development. Conventional soybean seeds of the BRS 284 genotype were germinated and maintained in a greenhouse. Leaf samples (young and mature) from the VC, V2, and V5 stages, with and without herbivory, were collected and extracted in methanol/water 1:1 (v/v). Metabolomic analysis was performed using UHPLC-Q-TOF-MS/MS with an untargeted approach. The abundance of key annotated metabolites responsible for differentiating metabolic profiles among the groups was assessed through univariate and multivariate analyses. The VC and V2 stages shared similar metabolic variations, while the V5 stage displayed a clear distinction. Most metabolites that showed significant changes in abundance belonged to primary metabolism, such as fatty acids and their derivatives. Among them, volatile acids from the octadecanoid family were highly accumulated in the VC and V2 stages. We observed that fatty acids, phenolic acids, and terpenoids are the main metabolites found in soybean during the vegetative phase, but they accumulate differently in young and mature leaves, with young tissues appearing more inducible than older tissues. We identified key metabolites that significantly differed between treatments: muurola-4,10(14)-dien-3-one, havardic acid F, daidzein, and linolenic acid were induced only in mature leaves of VC, while young leaves primarily induced fatty acid derivatives. In V2, terpenes were the most induced secondary compounds in both leaf types. However, mature leaves showed a greater diversity of these metabolites, including turmerone, smaditerpenic acid C, betulin diester, and muurola-4,10(14)-dien-3-one. At the V5 stage, only young leaves exhibited induced compounds, all belonging to primary metabolism. Thus, leaf age and soybean developmental stage directly influence the induction response: the VC and V2 stages exhibited a more robust metabolic response to stress, while V5 appeared to be less responsive to herbivory in terms of its metabolic profile.

2. 1 - INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) ocupa posição importante entre as culturas agrícolas por seu valor agrônômico e nutricional e é utilizada principalmente como fonte de proteína e óleo para consumo humano, ração animal e na produção de biocombustíveis. No Brasil, a soja é considerada a principal espécie vegetal do agronegócio brasileiro, estabelecendo o país como maior produtor e exportador de farelo e grãos de soja no mundo ^{4,5,115}.

Apesar do expressivo crescimento na produção de soja no país, essa cultura frequentemente sofre com o ataque de diversas pragas e a ação de diferentes estresses abióticos, que podem causar danos significativos e limitar a produtividade, resultando em grandes perdas. Entre os principais desafios enfrentados, a ação dos insetos-praga tem impactado negativamente a produção de soja no Brasil ^{6,7}.

Um exemplo notável é a *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), que, embora tradicionalmente considerada uma praga secundária na cultura da soja, pode causar danos tão extensos quanto ou até maiores do que a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae). Esse alto potencial de dano da *Spodoptera frugiperda* deve-se ao seu comportamento alimentar, que se alimenta das folhas de plantas muito jovens, mas, à medida que a soja entra nos estágios reprodutivos, ela passa a consumir também as vagens ^{21,30,116}.

O controle dessas pragas tem sido realizado através da aplicação de inseticidas. No entanto, o uso prolongado dessas substâncias pode causar diversos efeitos negativos no agroecossistema, como o surgimento de pragas mais resistentes e a redução do complexo de inimigos naturais ^{117,118}.

Mais recentemente, isso levou programas de manejo de pragas a explorar a resistência natural das plantas como estratégia ecologicamente correta para o controle de *Spodoptera*, com foco em entender como as

moléculas produzidas pelas plantas podem afetar o desempenho, a preferência e parâmetros biológicos dos insetos-praga. Tem sido observado que a biossíntese dessas moléculas bioativas é modulada quando as plantas estão sob estresse e essas alterações dependem de muitos fatores^{11,62,119,120}.

Estudos mostraram que fatores como a idade da folha e o estágio de crescimento da planta influenciam significativamente o grau de resistência em genótipos de soja. Por exemplo, XAVIER et al. (2017)¹²¹ relataram que as folhas mais jovens de plantas de soja eram mais suscetíveis à infecção do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática. Por outro lado, PICANÇO et al. (2023)¹²² mostraram que órgãos foliares mais velhos em plantas mais jovens são mais suscetíveis à ferrugem da soja.

No trabalho de SOUZA et al. (2021)¹²³, observou-se que folhas mais velhas e folhas de plantas em estágio reprodutivo da soja apresentaram maior expressão de resistência às lagartas *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*. REYNOLDS e SMITH (1985)¹²⁴ também observaram diferenças nos níveis de resistência nas folhas em diferentes posições da planta de genótipos de soja à lagarta de *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). Genótipos resistentes de soja, como PI 227687, PI 227682 e IAC 100, também afetaram negativamente o desenvolvimento da desfolhadora *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae)¹²⁵.

Neste contexto, compreender os metabólitos envolvidos nas interações ecológicas é fundamental para avaliar a resistência das plantas. A metabolômica, associada à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), tem sido amplamente utilizada por ser uma metodologia eficaz para analisar de forma abrangente mudanças metabólicas complexas. Essa técnica analítica permite a identificação e quantificação de metabólitos em organismos sob diferentes condições de crescimento ou em momentos

específicos, contribuindo para um melhor entendimento das dinâmicas metabólicas relacionadas à defesa das plantas.^{105,126-129}.

Estudos metabolômicos anteriores da soja demonstraram que a resistência constitutiva de algumas variedades de soja a *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) pode estar relacionada ao conteúdo de alguns lipídeos e isoflavonas em suas folhas¹³⁰. Seguindo esta linha de estudo, MURAKAMI et al. (2014)¹³¹ verificaram que os níveis de daidzina, 4',7-di-hidroflavona, daidzeína e formononetina alteraram após a herbivoria de *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de soja.

Diferentes trabalhos avaliaram o perfil químico de genótipos resistente e suscetível e observaram vários compostos relacionados à resistência contra *Anticarsia gemmatalis*. Metilquercetina, glicoconjugados de quercetina, daidzeína, genisteína e kaempferol apresentaram níveis elevados nos órgãos do genótipo resistente, sendo os derivados de quercetina e kaempferol os mais abundantes^{132,133}.

Embora a maioria dos estudos tenha focado amplamente nas mudanças no conteúdo de flavonoides ao longo dos estágios de desenvolvimento da planta, o conhecimento sobre a caracterização abrangente das respostas biológicas da soja sob estresse por herbivoria ainda é limitado. Com o objetivo de aprofundar nossa compreensão sobre os efeitos da idade das folhas e do estágio de desenvolvimento da planta na expressão de resistência da soja, propusemos o uso de uma abordagem metabolômica não direcionada. Através dessa abordagem, buscou-se avaliar, de maneira abrangente, as alterações metabólicas globais.

O avanço nesse campo permitirá entender melhor como esse metabolismo está relacionado às estratégias de resistência da soja ao ataque

de pragas agrícolas, fornecendo uma base para o desenvolvimento de métodos de controle de insetos mais sustentáveis.

2. 2 - OBJETIVOS

Este trabalho visou a investigação da indução de metabólitos em folhas de soja quando submetidas à herbivoria por lagartas de *Spodoptera frugiperda*. A indução desses compostos foi avaliada em folhas injuriadas jovens e velhas, em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. O genótipo estudado foi a cultivar comercial (BRS 284) de soja (*Glycine max* (L.) Merr).

Para isso, propusemos os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolver e otimizar métodos por LC-QqTOF-MS/MS para comparação das variações dos compostos no perfil metabólico entre folhas de diferentes idades e estágios de desenvolvimento da soja (VC, V2 e V5);
- Investigar e comparar alterações metabólicas em folhas jovens e velhas de soja antes e após a injúria por *Spodoptera frugiperda*;
- Comparar e avaliar as mudanças nos perfis metabólicos antes e após a injúria por *Spodoptera frugiperda* entre os diferentes estágios de desenvolvimento da soja (VC, V2 e V5).

2.3 - MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 - Obtenção das Plantas e Insetos

As sementes de soja do cultivar BRS 284 foram cedidas pela Empresa Di Solo Sementes (São Carlos, SP, Brasil). As sementes foram selecionadas e submetidas à germinação em sementeiras com uma mistura de terra vegetal da Spagnhol Plantas Ornamentais (composta de carvão ativado, húmus de minhoca, casca de pínus e terra preta) e areia grossa na proporção 2:1, respectivamente.

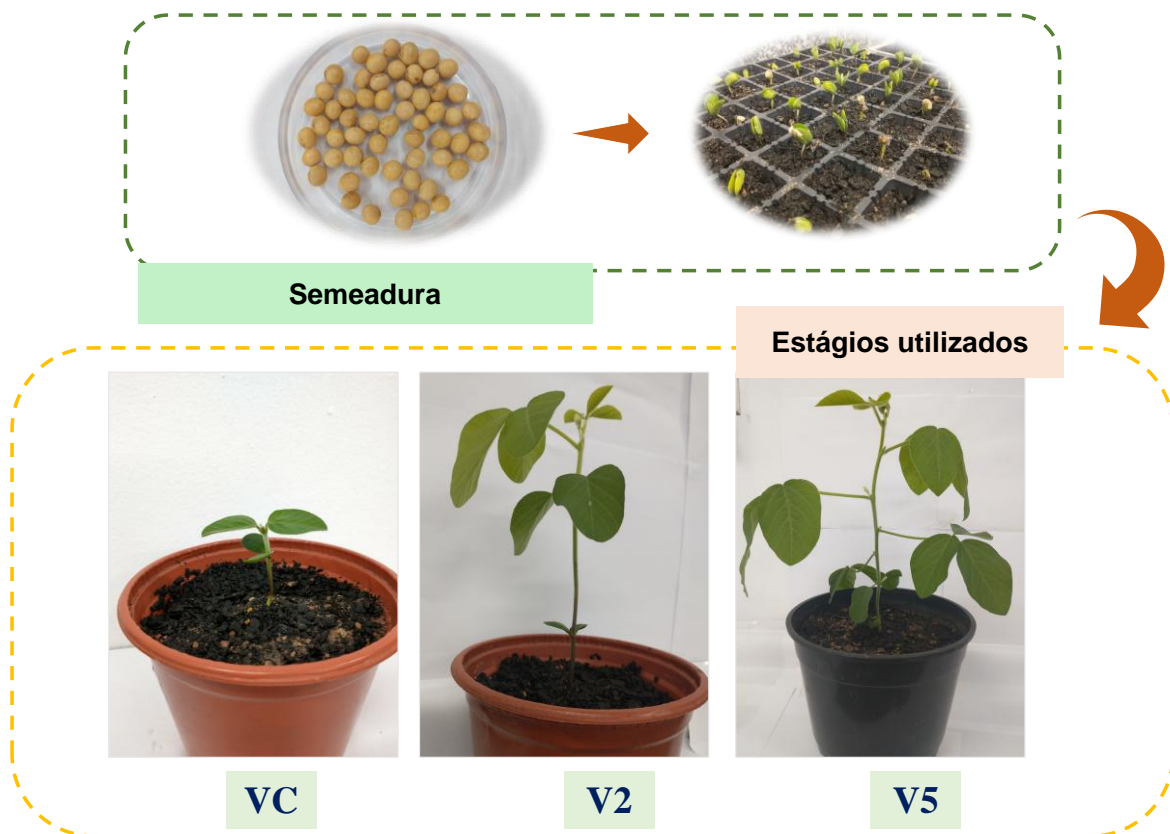
Após a germinação, as plântulas destinadas às análises nos estágios VC (cotilédones desenvolvidos com dois pares de folhas opostas e abertas) e V2 (folíolos expandidos, com a segunda folha trifoliolada aberta) foram cuidadosamente transplantadas para vasos plásticos N° 02 (1L), e o estágio V5 (folíolos expandidos, com a quarta folha trifoliolada aberta) para vasos N° 04 (4,9L), a fim de evitar estresse das raízes por falta de espaço, (FIGURA 2.1)¹⁵.

Os vasos continuam a mesma proporção de terra vegetal e areia grossa da germinação. As plantas foram mantidas em casa de vegetação externa com cobertura, em colaboração com o Departamento de Botânica da UFSCar, campus São Carlos, durante 35 dias, sob temperatura a $27 \pm 10^\circ \text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e irrigadas sempre que necessário. Este experimento ocorreu durante o período de fevereiro a março de 2022.

Ovos de *Spodoptera frugiperda* foram obtidos comercialmente da empresa Pragas.com (Piracicaba, SP, Brasil). Após a eclosão, as lagartas foram individualizadas em placas de Petri e mantidas em uma incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), em condições de temperatura e fotoperíodo controlados (25°C , ciclo de 12:12h luz/escuro). Inicialmente, a alimentação desses insetos foi realizada com dieta artificial à base de farinha

de feijão branco (Apêndice A.1), até alcançarem o quarto instar de desenvolvimento ¹³⁴.

FIGURA 2. 1 - Esquema de obtenção das plantas nos estágios VC, V2 e V5.



2. 3. 2 - Indução em folhas de soja por *Spodoptera frugiperda*

Antes dos testes de indução, as plantas foram cuidadosamente transferidas da casa de vegetação para o laboratório de Controle Biorracional de Insetos Praga, vinculado ao Departamento de Química/Produtos Naturais, com 24 horas de antecedência. O teste de indução por herbivoria foi realizado simultaneamente nos três estágios de desenvolvimento em estudo: VC, V2 e V5.

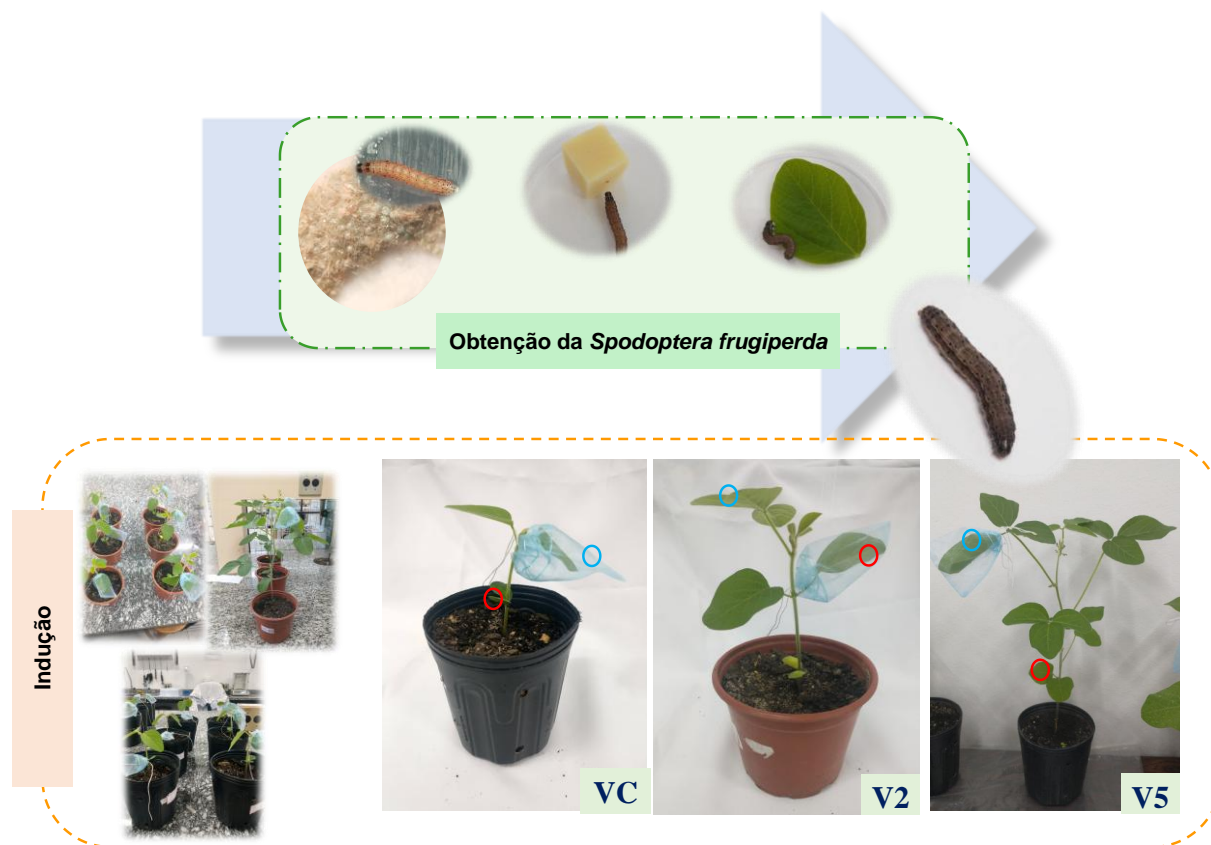
As lagartas de *Spodoptera frugiperda*, no quarto instar, foram alimentadas com folhas de soja por dois dias. Após esse período, o material

vegetal foi retirado, e as lagartas ficaram em jejum por 24h até a realização dos experimentos.

Depois desse tempo sem alimentação, as lagartas foram colocadas nas folhas velha (FV, a primeira folha próxima ao solo), e nova (FN, última folha superior totalmente desenvolvida), em plantas independentes de soja nos estágios de desenvolvimento VC, V2 e V5, e os folíolos foram cobertos com sacos de organza para impedir que as lagartas mudassem de folha durante o experimento, conforme ilustrado na FIGURA 2. 2. Levando em conta três estágios de desenvolvimento, a herbivoria em duas folhas de diferentes idades, o grupo controle e as 5 réplicas biológicas para cada tratamento, foram utilizadas um total de 60 plantas.

Este teste foi realizado no período das 9:00h às 13:00h, com duração de 2h para VC e 4h para V2 e V5. O tempo final do experimento foi de acordo com o consumo observado da área foliar para cada estágio de desenvolvimento em estudo, o qual foi determinado antes de atingir 50% do material vegetal consumido. Após retirar as lagartas, as plantas que sofreram danos por herbivoria e as plantas controle (sem danos por herbivoria) permaneceram na bancada do laboratório sob temperatura de 27°C e luz fluorescente por 24h para possível indução dos compostos que podem estar relacionados com o metabolismo ou mecanismo de resistência da soja.

FIGURA 2. 2 - Indução por *Spodoptera frugiperda* em folhas de soja. Os círculos azul e vermelho indicam a indução nas folhas jovem e velha, respectivamente.



2. 3. 3 - Coleta e Extração de Material Vegetal

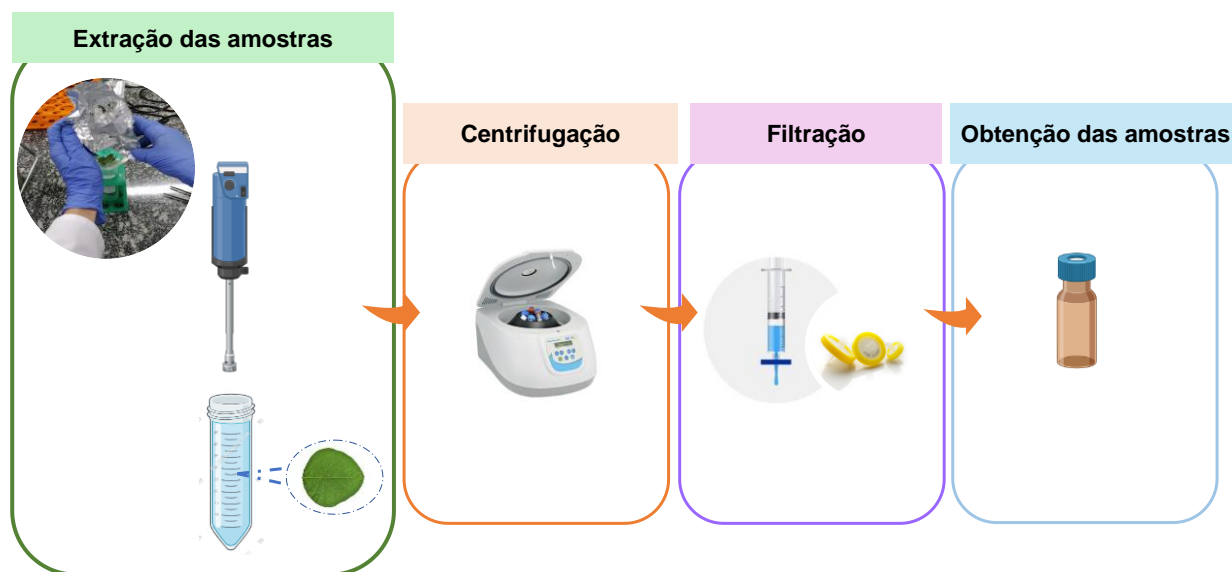
Após 24 horas do término do experimento de indução, com o objetivo de investigar os níveis de metabólitos nas folhas de soja de diferentes idades e estágios de desenvolvimento, foram coletadas 60 folhas. As folhas, incluíam tanto as folhas que sofreram herbivoria (folhas injuriadas) quanto as folhas de plantas controle (sem herbivoria). Essas amostras foram pesadas, congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até a etapa de extração.

As amostras congeladas foram extraídas em um volume normalizado de metanol grau HPLC-UV (Merck) e água ultrapura

(Millipark® Express40, 0,22µm (Milli-Q)) na proporção de 1:1 (v/v). Foram utilizados tubos falcon de 50 mL para a extração e as amostras foram moídas com ultraturrax® (IKA, modelo T10 B S32) na velocidade 4, em torno de 9100 rpm por 2 minutos. Para a normalização do volume, considerou-se a menor massa vegetal pesada (0,0596 g), e o volume mínimo de 1 mL. Assim, obteve-se uma concentração relativa de (0,0596g/mL), a qual foi levada em consideração para encontrar os volumes para o restante das amostras de massas diferentes.

Após a extração líquida, as suspensões resultantes foram centrifugadas em um equipamento da Universal 320R, a 4°C, 10000 g por 10 min. Os sobrenadantes foram filtrados através de filtros de seringa de PVDF com diâmetro de 13 mm e poros de 0,22 µm (Filtrilo), transferidos para *vials* de 1,5 mL, incolor da KASVI e mantidos a -20°C para posterior análise por LC-QqTOF-MS/MS (FIGURA 2. 3). A fim de avaliar a presença de interferentes na análise química posterior, foram preparados dois tipos de brancos: um branco da composição do solvente de extração e o segundo do processo de extração, o qual passou por todas as etapas, porém, sem adição do material vegetal.

FIGURA 2. 3 - Esquema simplificado da extração das amostras de folhas de soja.



2. 3. 4 - Análise Metabolômica por LC-QqTOF-MS/MS

A análise metabolômica foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução LC-QqTOF-MS/MS, baseada em uma abordagem não direcionada. A partir da amostra “*Quality Control*” (QC), resultante da adição de 40 μL de cada amostra em um único *vial*, foi desenvolvido e otimizado um método para a matriz de folhas de soja por LC-QqTOF-MS/MS, no modo de aquisição *full MS scan*.

Os extratos obtidos no item anterior 2. 3. 3 foram analisados por LC-HRMS/MS. As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) Agilent (modelo 1290 Infinity II, Agilent Technologies). O software HyStar (HyStar Versão 3.2, Bruker Daltonics) foi utilizado para a aquisição de dados, e o Compass Data Analysis (DataAnalysis Versão 3.2, Bruker Daltonics) foi empregado para a análise e processamento de dados.

Os compostos foram separados utilizando uma coluna SB-C18 Agilent (2,1×100 mm, 1,8 µm) Zorbax RRHD, mantida a 30 °C. A fase móvel consistia em água ultrapura do sistema MilliparkR Express 40 de 0,22 µm, Milli-Q como solvente A e acetonitrila de grau HPLC, Supelco (Sigma-Aldrich) o solvente B, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico grau massas (>98%, Sigma- Aldrich). Foram utilizados volumes de injeção de 2 µL e vazão de 400 µL/min. O programa de eluição dos compostos utilizado encontra-se na (TABELA 2. 1).

TABELA 2. 1 - Programa de eluição no modo isocrático e gradiente da fase móvel, usado na separação dos analitos por LC-QqTOF-MS/MS (ESI+).

Tempo (min)	A %	B%
0	90	10
1	90	10
8	80	20
12	60	40
14	20	80
16	0	100
18	0	100
18.1	90	10
20	90	10

Os compostos detectados foram inspecionados através de um espectrômetro de massa de alta resolução (HRMS) acoplado com analisador de tempo de voo quadrupolo (QqTOF) (*Impact* HD QTOF™, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) operando somente no modo positivo de ionização (ESI+).

Os dados de MS e MS/MS foram adquiridos através do Compass QtofControl v.3.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e processados usando o software Data Analysis 4.2 (Bruker Daltonics). Os parâmetros da fonte de íons foram definidos da seguinte forma: tensão capilar, +4000V íons positivos; *end plate offset*, 450 V; gás nebulizador, 4

bar; temperatura do gás de secagem, 180 °C; fluxo gás nebulizador, 8 L·min⁻¹; e faixa de varredura no modo de aquisição *full MS scan*, *m/z* 50-1300.

Para a análise no modo MS/MS foi utilizada a aquisição dependente de dados (DDA), onde a radiofrequência (RF) de colisão foi estabelecida para variar de 200,0 a 550,0% Vpp; o tempo de transferência de íons foi ajustado para variar de 50,0 a 90,0 µs, com temporização de 50% em cada. Os funis RF 1 e 2 foram 250,0 e 150,0 Vpp, respectivamente. O RF do hexapolo foi de 50,0 Vpp, a energia do quadrupolo foi de 5,0 eV com um armazenamento pré-pulso de 6,0 µs. Os parâmetros usados para acionar a fragmentação no modo de aquisição MS/MS foram 2,0 Hz para contagens *LOW* (50.000 cts) e 4,0 Hz para contagens *HIGH* (500.000 cts), com um tempo de ciclo total de 3s e exclusão ativa de 1 espectro.

A calibração do instrumento QqTOF-MS/MS foi realizada externamente antes do lote de injeção, executada com solução de formiato de sódio 1 mM em acetonitrila/água (9:1, v/v). As massas teóricas dos íons de calibração no modo positivo foram 158,964069, 226,951493, 294,938917, 362,926341, 430,913765, 498,901189, 566,888613, 634,876037 e 702,863461 correspondentes à fórmula Na(NaCOOH)_n⁺, n = 2–10, respectivamente. Também, foi realizado um teste inicial do sistema LC-HRMS/MS, para isto foi injetado duas vezes metanol e a solução padrão de (120ng/mL de acetato de L-leucina-encefalina anidro, BACHEM, Lote: 1064605) (C₂₈H₃₇N₅O₇) apresentando massa exata de 556,2765 Da ([M+H]⁺) em modo de ionização positivo.

Após essa verificação, deu-se início a análise metabolômica, onde a sequência de injeção foi organizada desta seguinte maneira: três injeções das amostras dos brancos, com posterior injeção da amostra QC por cinco vezes para condicionar a coluna cromatográfica e, em seguida, as amostras de extratos de folhas (randomizadas). A sequência de injeção das

amostras foi randomizada para reduzir o efeito da contaminação da(s) injeção(ões) anterior(es). Para monitorar o desempenho e a estabilidade do instrumental ao longo da análise, o QC foi injetado três vezes a cada 10 amostras.

A solução de calibração também foi injetada no final de cada corrida analítica (no tempo de 16 a 20 min, sem prejudicar a identificação dos analitos), e antes do pré-processamento dos dados, todos os espectros foram recalibrados internamente utilizando o modelo de regressão quadrática de calibração de alta precisão (HPC). Os espectros foram calibrados automaticamente usando o *software* ProfileAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

2. 3. 5 - Processamento dos Dados

Os arquivos dos dados brutos (formato “.d” nativo do instrumento) recalibrados, adquiridos das análises por LC-HRMS, foram convertidos para o formato mzXML utilizando o software MSConvertGUI (64 bits) do ProteoWizard. Os dados mzXML foram importados no MZmine 3 versão 3.7 e processados usando as seguintes etapas: *mass detection*, *feature processing*, *chromatogram building*, *smoothing in retention time dimension*, *feature resolving*, *13C isotope filter*, *feature alignment*, *subtraction blank* e *gap-filling*. Os parâmetros utilizados para cada etapa encontram-se no Apêndice (TABELA A.2).

A tabela contendo as informações como área de cada *feature* do MZmine 3 foi exportado como arquivo .txt, convertido para .csv (amostras nas linhas e características-pares de m/z com tempo de retenção nas colunas). Essa matriz convertida foi inserida na plataforma *MetaboAnalyst* (versão 6.0) para realizar as análises estatísticas. Dentro dessa plataforma, os dados

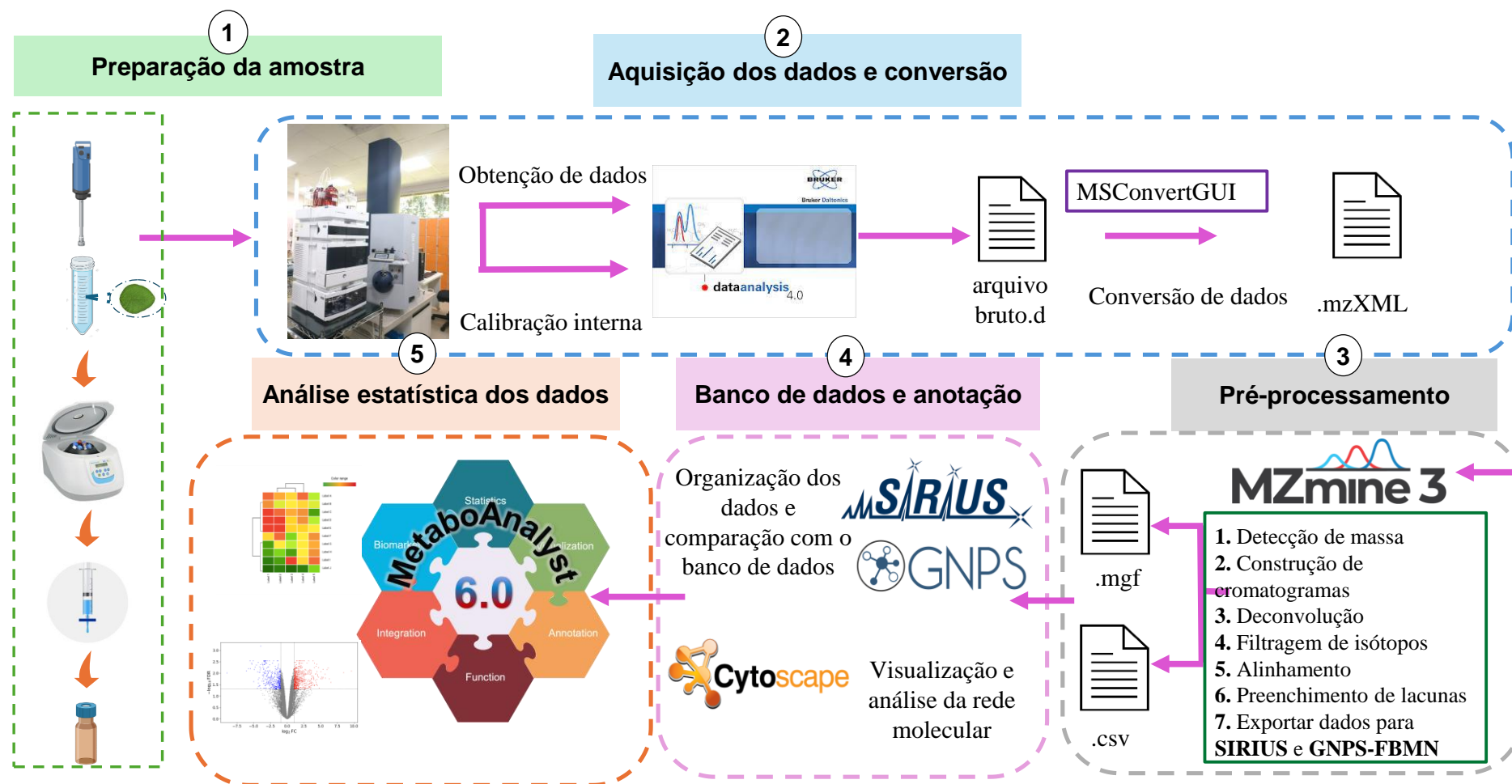
foram filtrados com base no desvio padrão (DP) e valor médio de intensidade de 80%. Através da centralização na média foi realizada a normalização dos dados.

Em seguida, esses dados foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), Análise Hierárquica de Cluster (mapa de calor), gráficos de caixa dos metabólitos significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) e Análise de *fold Change*. A anotação das moléculas relevantes obtidas dos testes estatísticos foi realizada utilizando o *software* gratuito Sirius, que utiliza ferramentas de fragmentação *in silico*. A plataforma de acesso aberto, Rede Social Molecular Global de Produtos Naturais (GNPS; <http://gnps.ucsd.edu>) foi utilizada para auxiliar nessa anotação¹³⁵⁻¹³⁷.

A Análise de Variância (ANOVA) ($p \leq 0,05$) foi aplicada para comparar as abundâncias dos compostos individuais responsáveis pela diferenciação dos perfis metabólicos dos grupos. Já, a Análise de Variância Multivariada Permutacional (PERMANOVA) foi realizada com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas entre as respostas obtidas nos tratamentos. Ambas as análises foram conduzidas utilizando o *software MetaboAnalyst*.

Todas as etapas para a análise metabolômica estão simplificadas no fluxograma de trabalho, como mostrado na FIGURA 2. 4.

FIGURA 2. 4 - Fluxo de trabalho da análise de metabolômica.



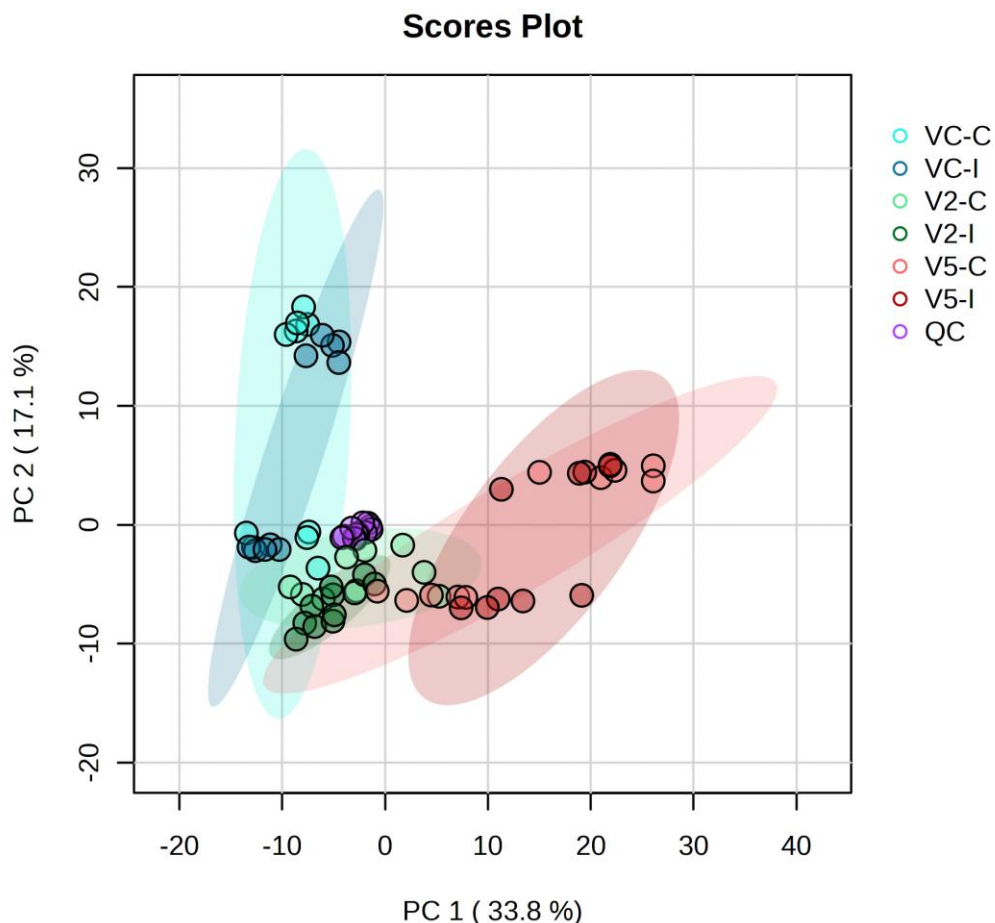
Adaptada pela autora.

2. 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

2. 4. 1 – Análise Metabolômica entre os Diferentes Estágios de Desenvolvimento da Soja sob Herbivoria por *Spodoptera frugiperda*

Para investigar de forma abrangente as alterações metabolômicas da soja em diferentes estágios de crescimento (VC, V2 e V5) e desenvolvimento (folha nova e velha) após dano por *Spodoptera frugiperda*, utilizamos uma abordagem metabolômica não direcionada por LC-QqTOF-MS/MS. Um total de 2308 *features* de metabólitos foram adquiridos após o processamento dos dados brutos e exportados em uma tabela contendo as características (m/z e tr) e área de cada *feature*. Para avaliar a validade dos resultados quimiométricos e garantir a ausência de erros sistemáticos, alíquotas de controle de qualidade (QC) foram medidas sistematicamente entre sequências de amostras. A FIGURA 2. 5 mostra o agrupamento próximo das amostras de QC, confirmando a reprodutibilidade do método analítico (Apêndice A.1).

FIGURA 2. 5 - Gráfico de PCA comparando o agrupamento do QC com os grupos das folhas jovem e velha dos estágios VC, V2 e V5.



2. 4. 2 - Análise Metabolômica Geral entre os Estágios VC, V2 e V5.

Inicialmente, utilizamos análises multivariadas, como a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Hierárquica de Cluster (HCA) para fornecer uma visão geral dos metabólitos significativamente diferenciais que contribuem para as variações metabólicas entre os estágios VC, V2 e V5 da soja.

A fim de visualizar melhor as diferenças na composição química das plantas, realizamos a PCA separada para as amostras controle e tratamento. Os resultados mostraram um agrupamento diferencial nos perfis metabólicos

constitutivos e induzidos da soja entre VC, V2 e V5, como ilustrado na FIGURA 2.6. Isto foi confirmado pelo teste de Análise de Variância Multivariada Permutacional (PERMANOVA) que mostrou diferença significativa entre os estágios ($p \leq 0,05$). No entanto, os perfis induzidos de VC, V2 e V5 mostraram maiores valores de $R^2 = 0.80, 0.55$ e 0.72 . Esses valores indicam o poder do modelo para explicar a variabilidade entre os tratamentos, TABELA 2. 2.

FIGURA 2. 6 - Gráfico de PCA comparando os tratamentos em folhas de soja nos estágios VC (azul), V2 (verde) e V5 (vermelho); (a) amostras de controle (b) amostras de indução.

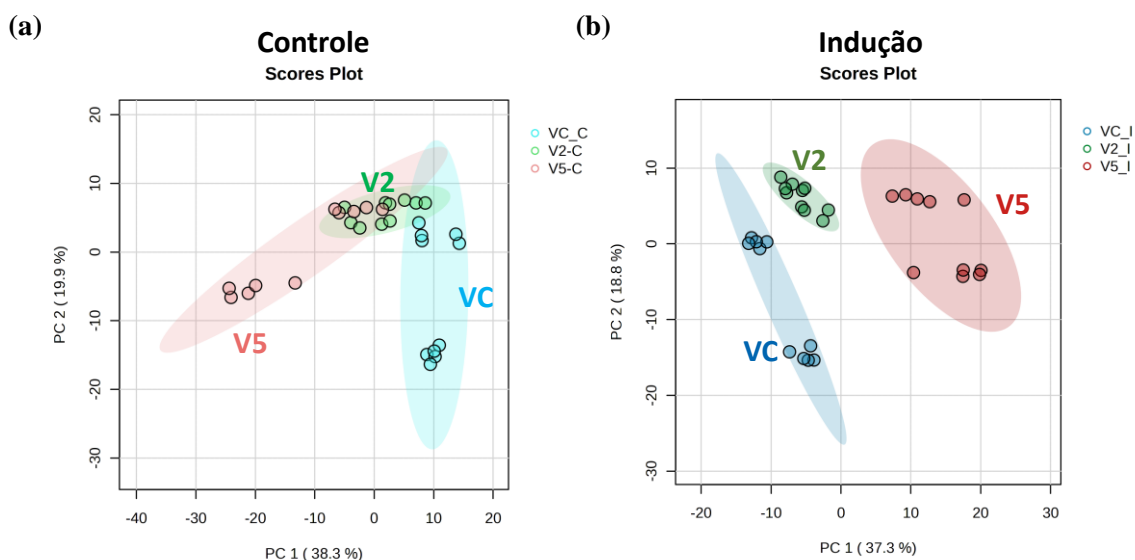


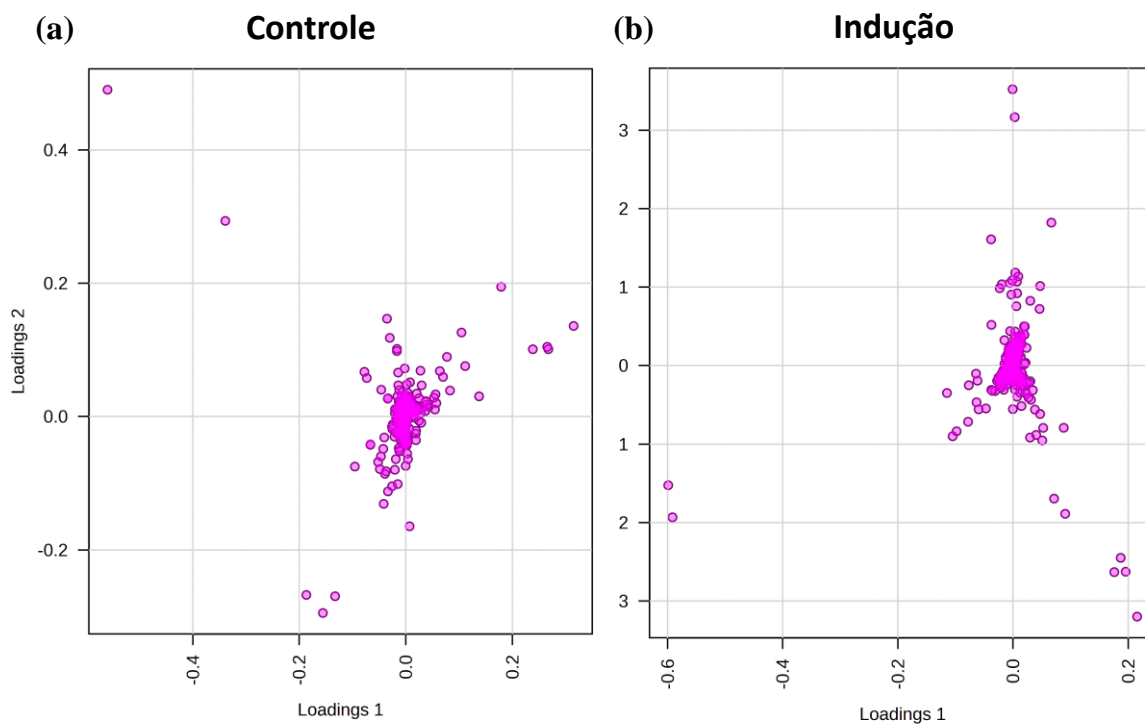
TABELA 2. 2 - Resultados de PERMANOVA dos tratamentos controle e indução dos estágios VC, V2 e V5.

Tratamentos	F	R ²	p.Valor
V2-C vs V5-C	13.73	0.43	0.002*
V2-C vs VC-C	19.17	0.51	0.001*
V5-C vs VC-C	23.35	0.56	0.001*
V2-I vs V5-I	74.46	0.80	0.001*
V2-I vs VC-I	22.32	0.55	0.001*
V5-I vs VC-I	47.38	0.72	0.001*

* Indica significância $p \leq 0,05$.

Para termos uma compreensão preliminar das diferenças metabólicas gerais, selecionamos os metabólitos com maiores pontuações nos gráficos de *loadings* (FIGURA 2. 7). Observamos que a variação no conteúdo total de metabólitos das classes de ácidos graxos e conjugados, terpenos e fenilpropanoides podem estar relacionados com o grau de variação entre os grupos.

FIGURA 2. 7 - Gráficos de *loadings* para a primeira e segunda componentes das amostras de folhas de soja nos estágios VC, V2 e V5; (a) amostras de controle (b) amostras de indução.



Em seguida, utilizamos o mapa de calor de agrupamento (FIGURA 2. 8) e a Análise de variância (ANOVA) (FIGURA 2. 9) para investigar as abundâncias dos compostos que são significativamente responsáveis pela diferenciação entre os perfis metabólicos dos estágios e tratamentos.

O mapa de calor foi dividido em dois clusters com base nas mudanças de metabólitos durante o desenvolvimento da planta. Notavelmente, os estágios VC e V2 parecem compartilhar variações metabólicas semelhantes, enquanto o estágio V5 apresenta uma distinção clara. Os principais compostos que apresentaram variações expressivas na abundância relativa são provenientes do metabolismo primário, como ácidos graxos e seus conjugados.

Entre os metabólitos, destacam-se: metil-9,10-dihidroxi-octadeca-11,13,15-trienoato, ácido 13-hidroxi-9-metoxi-10-oxo-11-octadecenoico, ácido octadeca-3,6,9,12,15-pentaenoico e ácido heptadeca-8,11-dienoico. Seguido de alguns compostos do metabolismo secundários da classe dos terpenos, tais como 8,8-dihidroxi-trans-neoxantina, ácido havardico F e muuro-la-4,10(14)-dien-3-ona. Assim, esses compostos são encontrados em altos níveis apenas nos estágios VC e V2, e parecem aumentar quando a planta está sob estresse (FIGURA 2.8).

Em contrapartida, no estágio V5, os metabólitos secundários pertencentes às classes dos fenólicos (derivados de kaempferol, 3,4-metilenodioxicinamaldeído e ácido cumárico) e terpenos (turmerona e derivados de soja saponina), também se mostraram significativos para a discriminação metabólica, indicando uma evidente diferença em relação aos estágios anteriores. A anotação química dos compostos está apresentada no Apêndice (TABELA A.3).

FIGURA 2. 8 - Mapa de calor da abundância média dos 60 metabólitos significativos em linhas (ID), e as amostras dos diferentes estágios em colunas. Os metabólitos regulados para cima e para baixo são indicados por diferentes tons de vermelho e azul, respectivamente. Abundância foi significativa pela ANOVA $p \leq 0,05$.

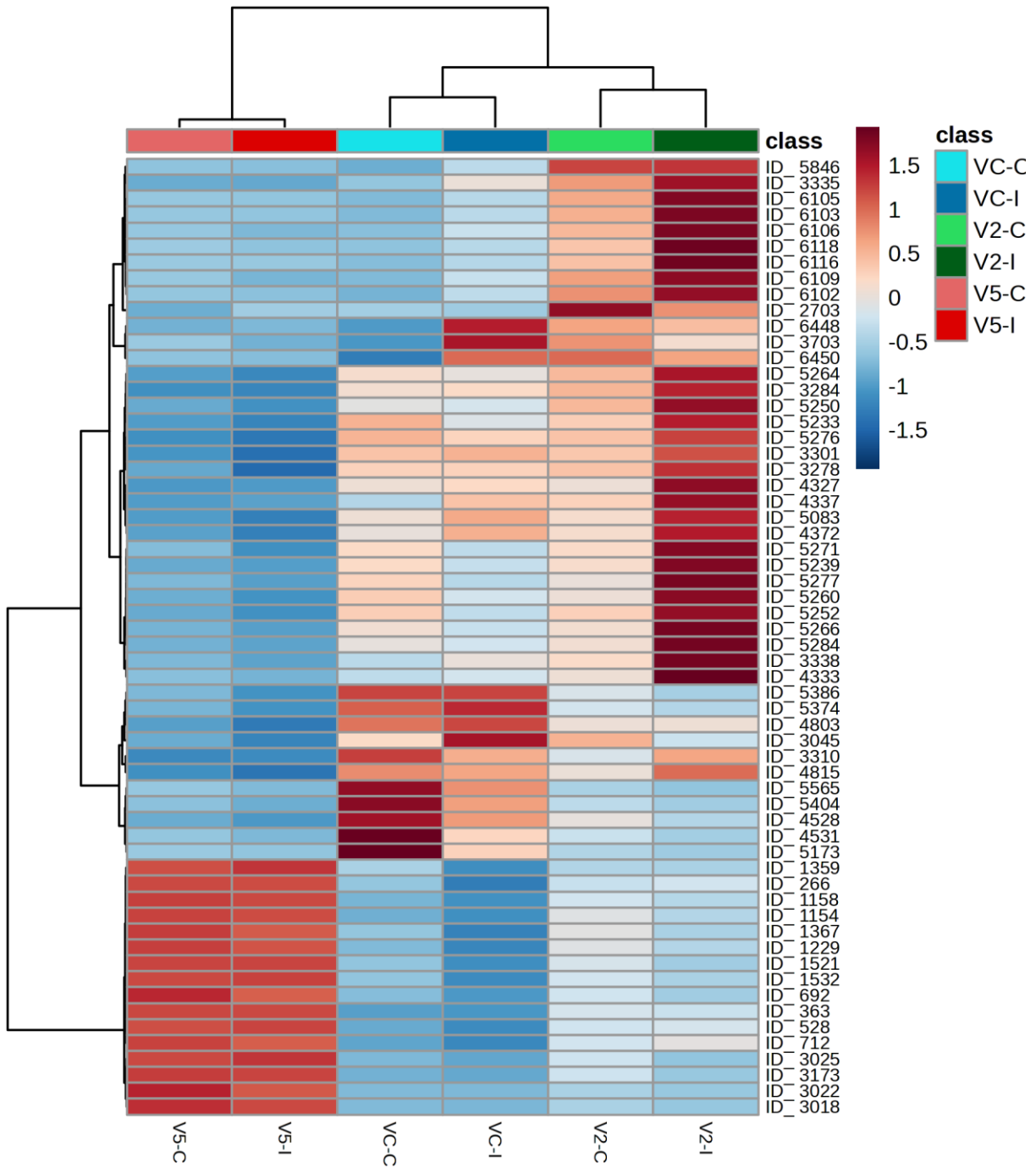
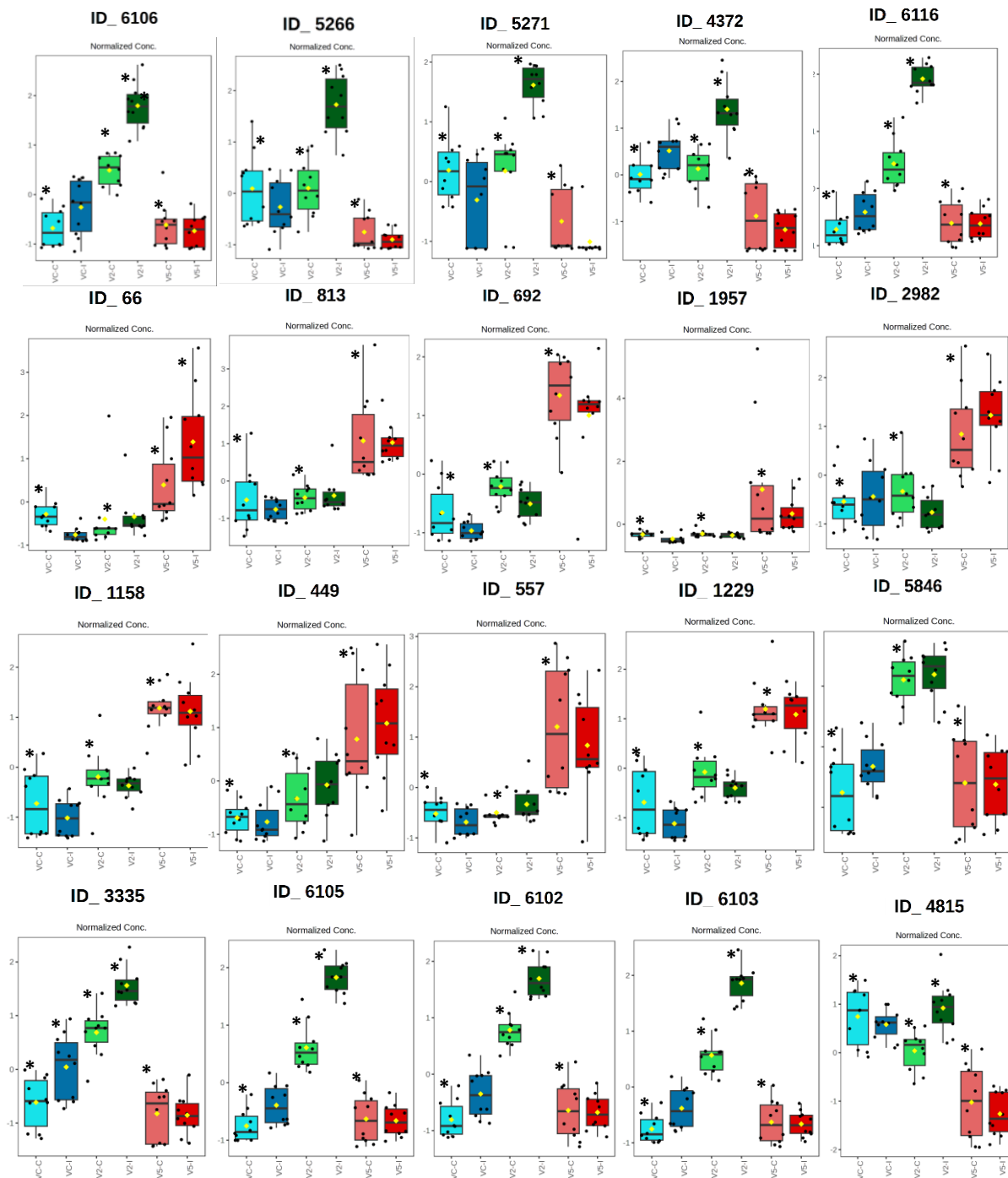


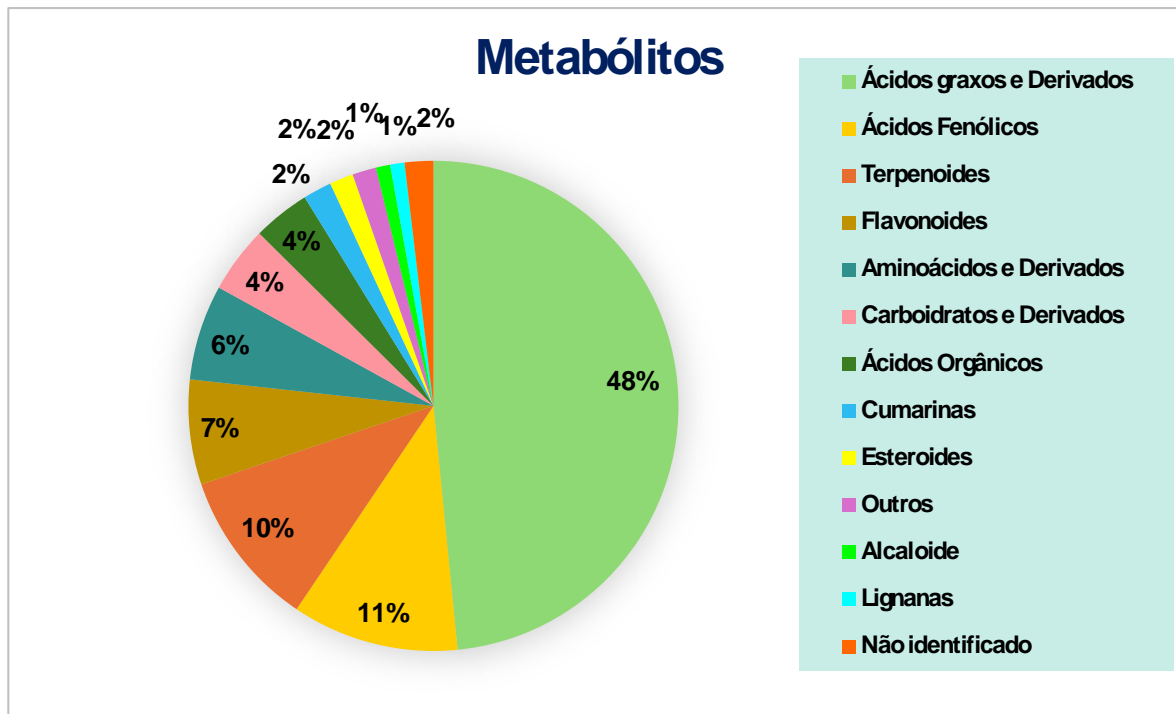
FIGURA 2. 9 - Comparação da abundância relativa de 20 compostos responsáveis pela diferenciação dos grupos entre os estágios VC, V2 e V5 da soja. O (*) significa que a abundância foi significativa pela ANOVA $p \leq 0,05$.



Através dos resultados anteriores (*loadings* e mapa de calor), selecionamos e classificamos um total de 318 metabólitos significativos. Os metabólitos anotados foram divididos em 12 grupos, incluindo ácidos graxos e derivados (48%, 154), ácidos fenólicos (11%, 35), terpenoides (10%, 33), flavonoides (7%, 22), aminoácidos e derivados (6%, 20), carboidratos e derivados (4%, 14), ácidos orgânicos (4%, 12), cumarinas (2%, 6), alcaloides (1%, 3) lignanas (1%, 3), esteroides (2%, 5), outros (5%, 3) e não identificados (2%, 6) (FIGURA 2. 10).

Portanto, os ácidos graxos e seus derivados, os ácidos fenólicos e os terpenoides foram os principais metabólitos encontrados na soja durante a fase vegetativa, estando diretamente envolvidos na diferenciação metabólica entre os grupos analisados. Os dados apresentados na FIGURA 2. 10, demonstram que a técnica de extração, associada à integração dos dados obtidos nas análises por cromatografia líquida, utilizando uma abordagem não direcionada, permitiu a anotação de uma diversidade de classes químicas. Os compostos classificados como 'outros' referem-se às moléculas que foram anotadas apenas uma vez.

FIGURA 2. 10 - Classificação dos 318 metabólitos significativos em folhas jovem e velha nos estágios de desenvolvimentos da soja (VC, V2 e V5), considerando os tratamentos controle e indução.



Neste contexto, é possível notar o efeito temporal do desenvolvimento da planta na variação e composição dos metabólitos nos diferentes tratamentos. Os compostos oriundos do metabolismo primário foram principalmente abundantes nos estágios iniciais, e no final do ciclo vegetativo, há uma maior diversificação de metabólitos. Deve-se enfatizar que estas correlações observadas são consequências diretas das reações e regulações enzimáticas, sendo este um sistema altamente dinâmico, durante o crescimento da planta. Outro ponto interessante para considerarmos é que essa diferença pode estar diretamente relacionada ao paradigma custo-benefício, uma hipótese de defesa que assume que a produção de compostos secundários é custosa para a planta, pois desvia energia e recursos do crescimento e outros processos vegetais^{138,139}.

Embora a produção de metabólitos secundários reflita na resistência da planta, vários estudos mostram relação direta de metabólitos primários na adaptação das plantas a estresses. Por exemplo, alterações no metabolismo de aminoácidos e carboidratos na soja em resposta a infecções ao fungo *Phytophthora sojae* ^{106,140,141}. Em plantas de tomate, genes envolvidos na biossíntese ou homeostase de aminoácidos e carboidratos demonstraram indução em resposta a *Phytophthora sojae*. Além do metabolismo de carboidratos e aminoácidos, há evidências de acúmulo de diferentes subclasses de ácidos graxos durante a resposta de defesa de planta *Arabidopsis* a *Phytophthora sojae* ^{139,142-144}.

Assim, essas análises permitiram avaliar as mudanças gerais na composição metabólica da soja ao longo do seu desenvolvimento. O entendimento do metabolismo primário e secundário nas plantas é crucial para compreender não apenas a fisiologia básica, mas também a incrível diversidade de estratégias adaptativas que utilizam para prosperar sob condições de estresse.

2. 4. 3 - Análise Metabolômica em Folhas de Soja após Herbivoria: comparação entre idades nos estágios VC, V2 e V5

Para compreender melhor as mudanças nos perfis metabólicos após a indução por herbivoria como estratégia de defesa, avaliamos individualmente as plantas nos estágios VC, V2 e V5 por meio de análises multivariadas e univariadas detalhadas. Investigamos se essas alterações diferem dependendo da idade da folha, considerando o aspecto folha jovem vs. folha velha. Além disso, buscamos identificar os principais metabólitos que diferiram significativamente entre os tratamentos (controle e indução).

2. 4. 4 - Metabolômica Comparativa das Folhas de Soja no Estágio VC.

Realizamos a PCA para visualizar os padrões de acúmulo de metabólitos entre os órgãos da soja (FIGURA 2. 11). Os resultados da PCA mostraram uma boa separação entre os grupos, onde o primeiro componente principal (PC1) e o segundo componente principal (PC2) explicaram 59.8% da variância total metabólica. A maior separação está relacionada com a idade do órgão (jovem e velha), separada por PC1 (41.7%). As amostras de controle e indução foram separadas pela PC2, apresentando (18.1%) da variação, sugerindo que há diferença na composição metabolômica após o dano por *Spodoptera frugiperda* nos grupos. Os resultados de PERMANOVA confirmam essa magnitude na separação das folhas, como mostrado na TABELA 2. 3.

FIGURA 2. 11 - Gráfico de PCA comparando o metaboloma das folhas jovem e velha (controle e indução) no estágio VC.

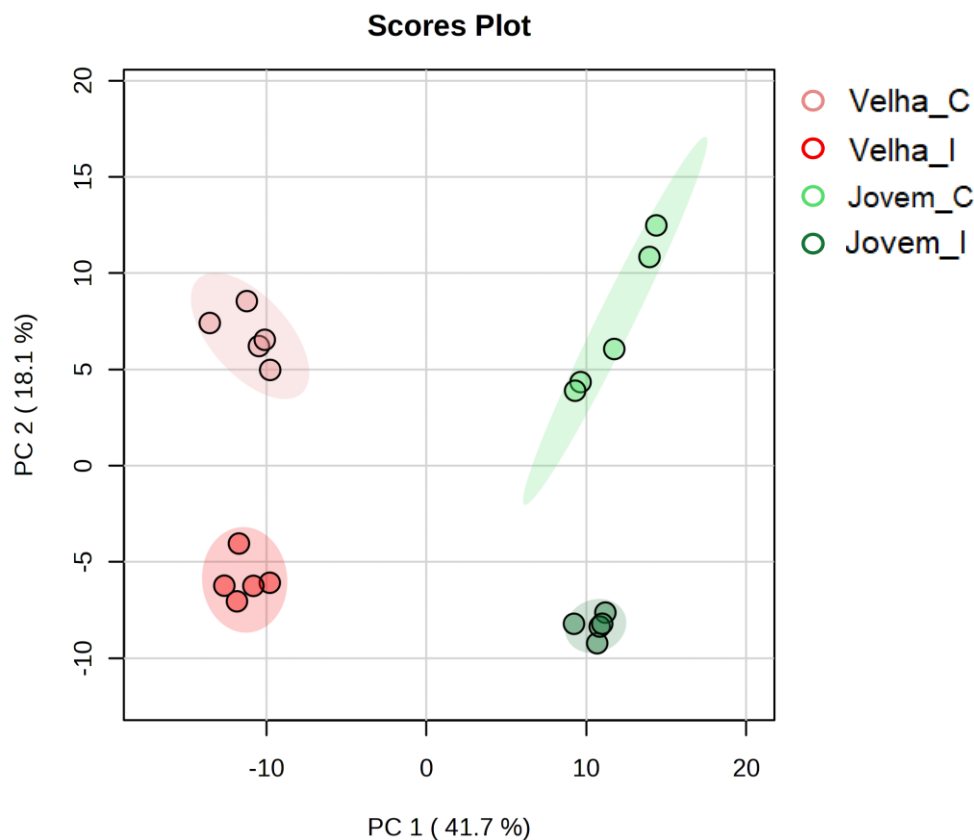


TABELA 2. 3 - Resultados de PERMANOVA dos tratamentos entre as folhas jovem e velha no estágio VC.

Tratamentos VC	F	R ²	p.Valor
Velha-C vs velha-I	123.29	0.94	0.012*
Velha-C vs jovem-C	104.92	0.93	0.012*
Velha-C vs jovem-I	692.42	0.98	0.009*
Velha-I vs jovem-C	154.43	0.95	0.009*
Velha-I vs jovem-I	721.26	0.98	0.009*
Jovem-C vs jovem-I	58.11	0.87	0.013*

* Indica significância $p \leq 0,05$.

A fim de identificar os metabólitos diferenciais que contribuem para as variações entre diferentes grupos, empregamos a Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) (FIGURA 2. 12). Os valores de Importância Variável na Projeção (VIP) é uma soma ponderada dos quadrados do

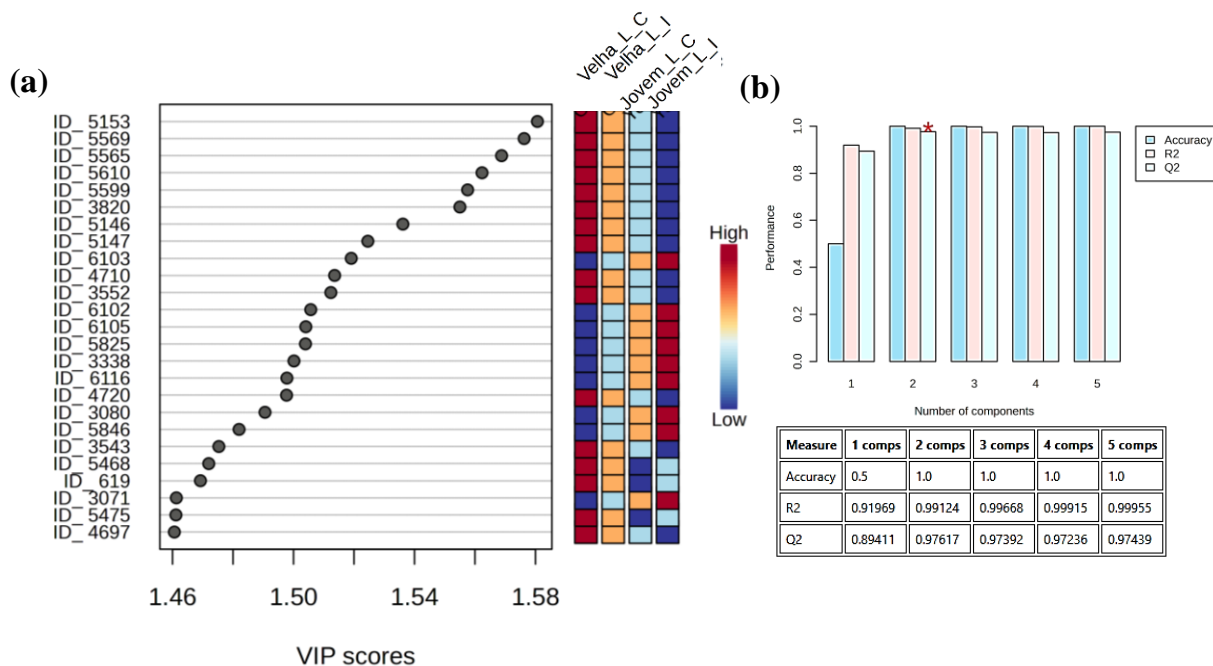
peso do PLS, e um valor >1 é geralmente usado como critério para identificar as variáveis importantes para o modelo¹⁴⁵.

A partir disso, foram utilizados valores de $VIP \geq 1,3$ como valor de corte para selecionar as variáveis com maior influência na distribuição das amostras observadas. Um total de 72 metabólitos provenientes das classes de ácidos graxos e conjugados, ácidos orgânicos, carboidratos e conjugados, cumarinas, policetídeos, terpenos e fenólicos tiveram um valor de $VIP \geq 1,3$. A avaliação desse modelo é apoiada pelos valores de $R^2=0,83$ e $Q^2=0,76$, confirmando a validade e fiabilidade dos resultados obtidos através da análise.

A FIGURA 2. 12(a) está representando apenas os 25 metabólitos com alto valor de VIP (Apêndice A.4). Os compostos que apresentaram variações expressivas para a discriminação metabolômica das folhas de soja foram os conjugados de ácidos graxos, seguidos pelos terpenos. Esses constituintes são acumulados de maneira diferenciada nos tratamentos de ambas as folhas. Os conjugados de ácidos graxos são mais acumulados nas folhas velhas, destacando-se os metabólitos ácido 18-metoxi-18-oxooctadec-9-enoico, metil-13-oxooctadeca-9,11-dienoato e metil-11,12-dihidroxi-octadeca-9-ienoato como aqueles com maior VIP. No entanto, nas folhas velhas induzidas, há uma diminuição desse grupo de metabólitos.

Nas folhas jovens, além do acúmulo de outros ácidos graxos, como ácido octadeca-3,6,9,12,15-pentaenoico e ácido 2-(5-hidroxi-4-metil-pent-3-enil)-6,10-dimetil-undeca-2,6,10-trienoico também se observou o acúmulo dos terpenos, ácido havardico F, 2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro-3-hidroxi-4a-metil-7-(1-metilenoilnaftalenocarboxaldeído e muuro-la-4,10(14)-dien-3-ona. É importante mencionar que esses compostos mostraram uma alteração significativa na abundância quando a planta está sob ataque de insetos. Assim, os metabólitos discriminantes variam tanto pela idade da folha, quanto após a indução de herbivoria na planta.

FIGURA 2. 12 – Análises discriminantes por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). (a) VIP scores destacando a variação dos 25 metabólitos anotados de relevância significativa entre os tratamentos das folhas jovem e velha no estágio VC da soja; (b) Capacidade preditiva do modelo PLS-DA com base no valor de Q^2 validados cruzadamente em 10 vezes e a precisão de R^2 e Q^2 superiores a 0,8. O asterisco em vermelho em (b) representa o melhor modelo classificador.

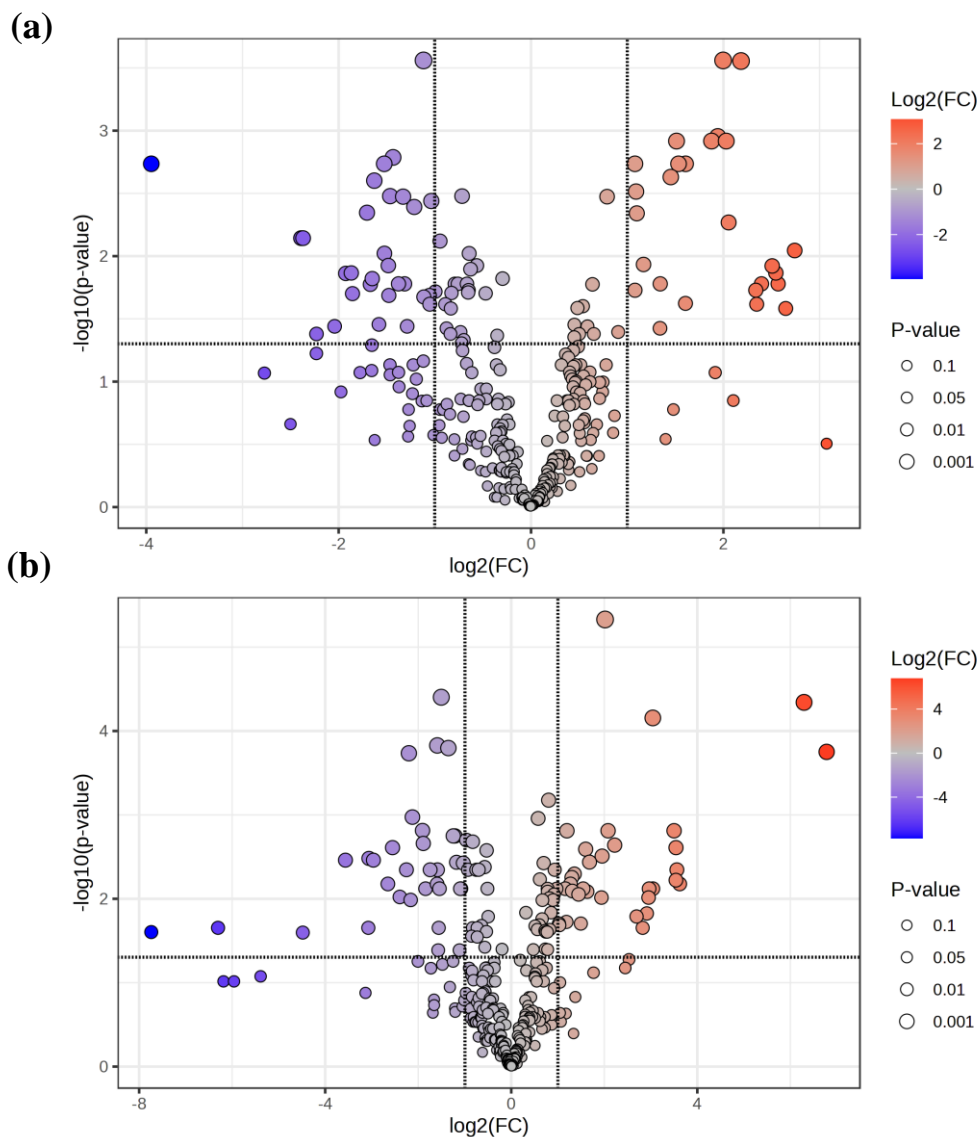


Com base nisso, utilizamos gráficos de *volcano* para identificar os metabólitos que diferiram significativamente entre os tratamentos (controle e indução) nos órgãos em estudo. O gráfico de *volcano* está apresentado na FIGURA 2. 13. O eixo x representa a taxa de variação entre o valor máximo e mínimo entre as duas variáveis consideradas (logaritmo do *fold-change*). Já o eixo y é o logaritmo do p -valor do *fold change*. Dessa forma, os metabólitos de maior significância estatística e tamanhos de efeitos pronunciados no gráfico, são aqueles que aparecem mais próximos do topo e distantes do centro.

Baseados nisso, extraímos as informações do gráfico de *volcano* que mostrou que 26 metabólitos foram significativamente regulados positivamente, enquanto 29 metabólitos foram regulados negativamente na folha velha (FIGURA

2. 13(a). Já nas folhas jovens, 34 e 32 metabólitos diferencialmente abundantes foram regulados positivamente e negativamente, respectivamente (FIGURA 2. 13(b)). No Apêndice A.5 apresentamos as possíveis moléculas que tiveram variação significativa nos dois órgãos.

FIGURA 2. 13 - Gráfico de *volcano* comparando os metabólitos diferenciais nos tratamentos controle e indução de folhas de soja no estágio VC. (a) metabólitos regulados na folha velha; (b) metabólitos regulados na folha jovem. Os pontos vermelhos e azuis denotam metabólitos significativamente regulados positivamente e negativamente, respectivamente. Valor $p \leq 0,05$; mudança relativa (FC)= 2,0; taxa de descoberta falsa (FDR)<0,5.

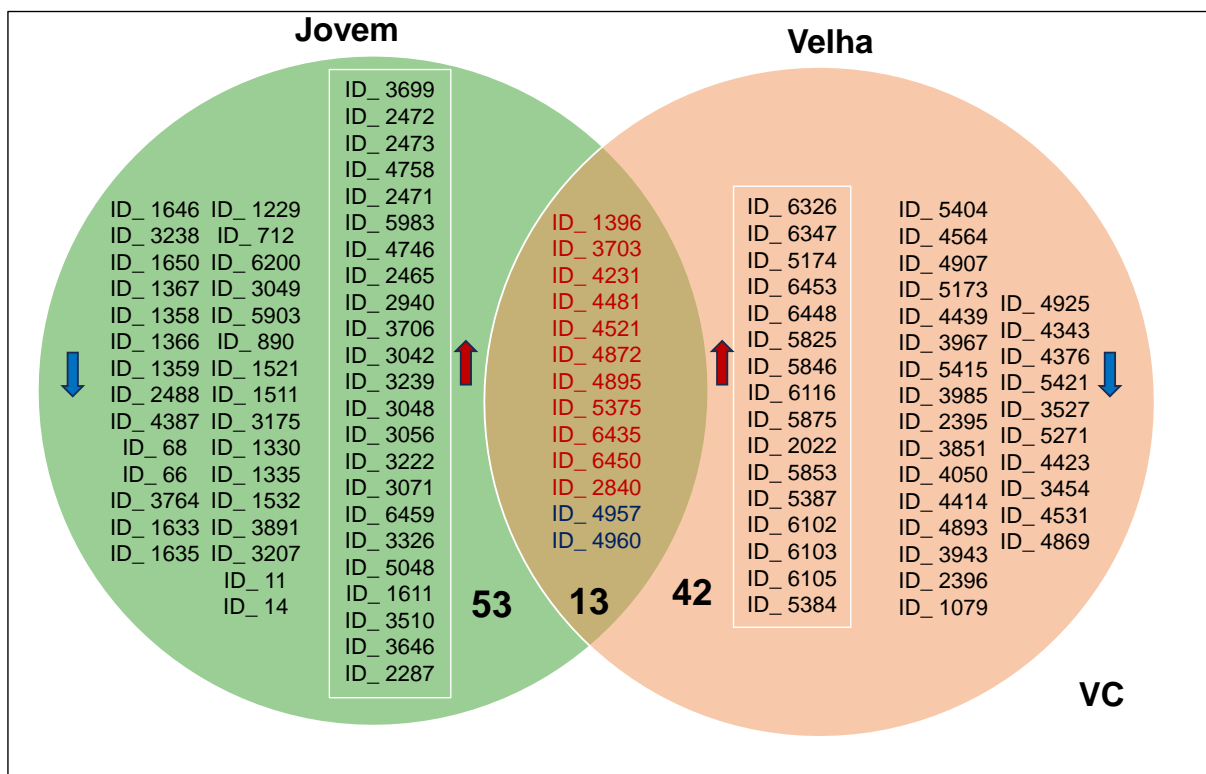


Destacamos alguns metabólitos alterados e anotados para discutí-los no contexto da literatura sobre suas possíveis funcionalidades na planta e/ou em resposta ao estresse. Dentre os compostos induzidos nas folhas jovens e/ou velhas, temos: ácido 9-oxo-10,12-octadecadienoico, ácido 9-oxooctadeca-10,12,15-trienoico, ácido 9,10,13-trihidroxi-octadeca-11,15-dienoico, ácido 13-oxooctadeca-9,11,15-trienoico, ácido 12-oxo-9-octadecenoico, ácido linolênico, metil-9,11,13,15-octadecatetraenoato, ácido 9-metiloctadecanoico, heptadecanal, ácido nonadecílico, pentadec-5-en-1-ol, heptadec-2-eno-1,5-diol, pentadec-2-en-1-ol, 2-aminoheptadecano-1,3-diol, malonil-D-triptofano, 2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro-3-hidroxi-4a-metil-7-(1-metilenoil)-1-naftalenocarboxaldeído, 4-hidroxitestosterona, 5alfa-androstan-17alfa-ol-3-ona, muuro-la-4,10(14)-dien-3-ona, ácido havardico F e daidzeína. As informações dos compostos induzidos são apresentadas no Apêndice A.5.

Os compostos como, ácido 9-oxo-10,12-octadecadienoico, ácido 9-oxooctadeca-10,12,15-trienoico, ácido 9,10,13-trihidroxi-octadeca-11,15-dienoico, ácido 13-oxooctadeca-9,11,15-trienoico, ácido 12-oxo-9-octadecenoico, ácido linolênico, metil-9,11,13,15-octadecatetraenoato, ácido 9-metiloctadecanoico, heptadecanal, ácido nonadecílico, pentadec-5-en-1-ol, heptadec-2-eno-1,5-diol, pentadec-2-en-1-ol e 2-aminoheptadecano-1,3-diol são derivados de ácidos graxos, sendo a classe mais induzida nas folhas.

Para melhor visualizar esse grau de interações, utilizamos o diagrama de Venn com todos os IDs referente às moléculas induzidas nas folhas jovem e velha (FIGURA 2. 14).

FIGURA 2. 14 - Diagrama de Venn representando os IDs exclusivos e comuns dos metabólitos significativos pelo *volcano* nas folhas jovem e velha do VC. As setas vermelha e azul, referem-se às moléculas reguladas positivamente e negativamente, respectivamente.



Na planta, os ácidos graxos, metabólitos primários, são compostos cruciais para os mecanismos fisiológicos básicos. Além disso, estudos mostram que eles desempenham um papel importante na adaptação das plantas e estão ganhando destaque como um dos sistemas gerais de defesa contra vários estresses bióticos e abióticos ¹⁴⁶.

Por exemplo, ADIGUN et al. (2023)¹¹² mostraram que ácido 13-oxo-9,11-octadecadienoico e outros conjugados foram induzidos em cultivares de soja tolerantes após a infecção por *Phytophthora sojae*. O ácido linolênico é um precursor para a produção do ácido jasmônico, um importante composto de

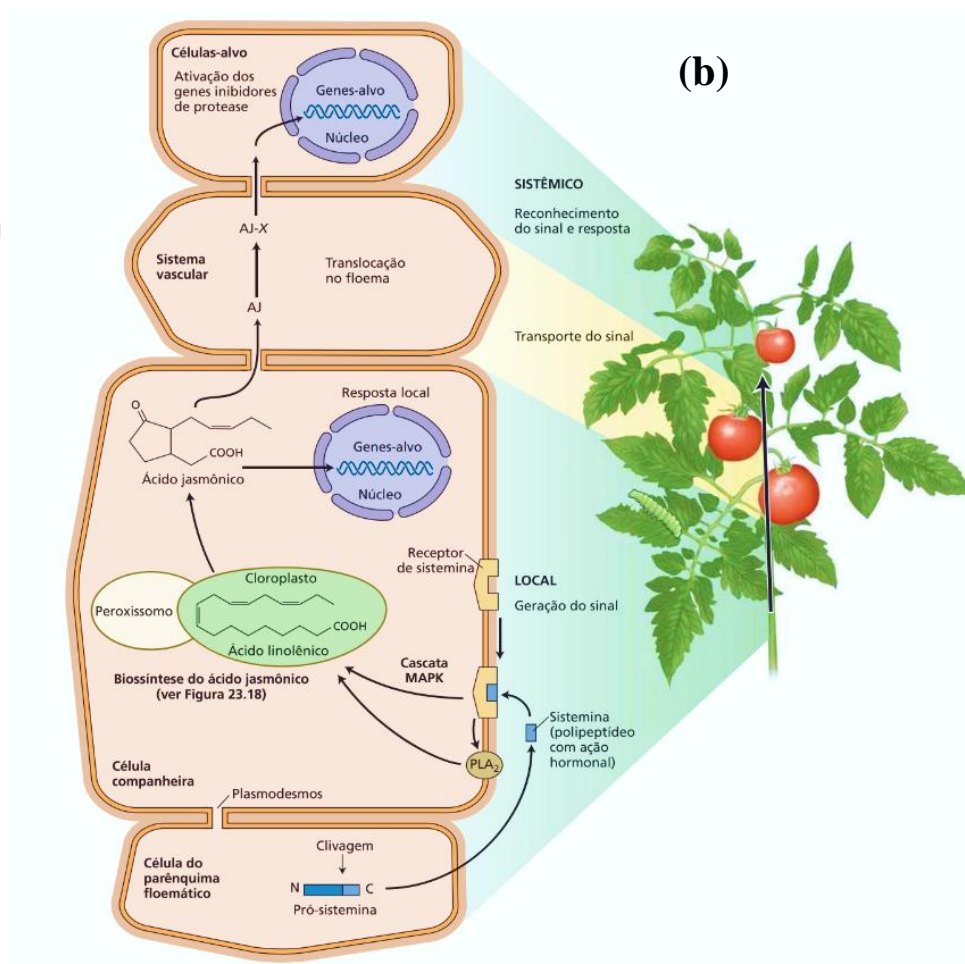
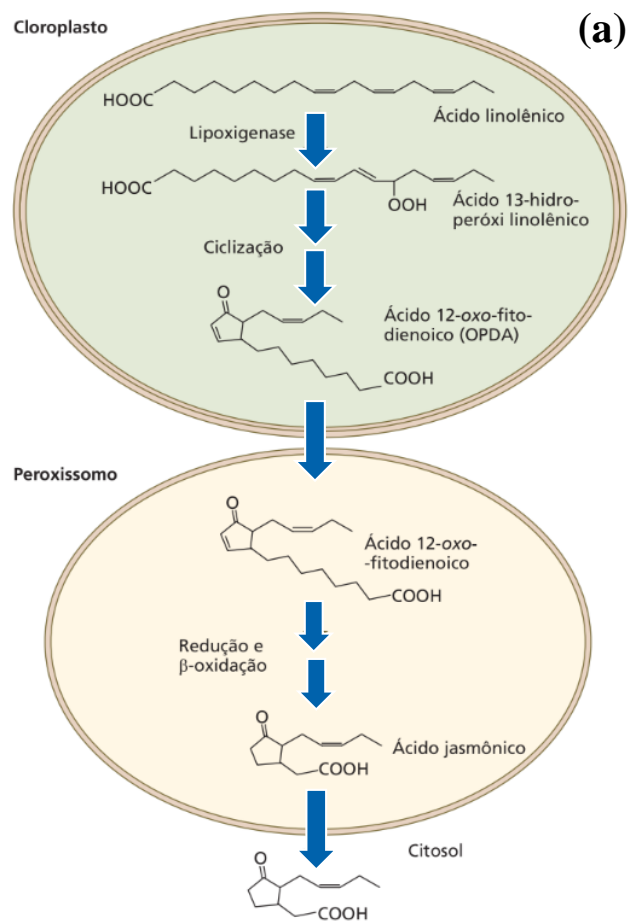
sinalização envolvido na defesa e desenvolvimento das plantas, (FIGURA 2. 15(a)).

Estudos genéticos e com a avaliação do aumento da radiação UVB revelaram um papel essencial do ácido jasmônico na regulação da defesa das plantas contra ataques de insetos¹⁴⁷⁻¹⁵⁰. Em tomateiro, o ácido jasmônico pode desencadear sistemicamente rotas de sinalização para a ativação de defesas, como visto na FIGURA 2. 15(b)¹⁵¹⁻¹⁵³.

O ácido linolênico também desempenha um papel crucial na biossíntese de eliciadores presentes na saliva de insetos, como a volicitina, um conjugado de ácido linolênico com aminoácido. Esse composto é formado a partir da ingestão do órgão vegetal contendo ácido linolênico, em conjunto com uma enzima liberada pelo inseto. Por exemplo, em plantas de milho, o conjugado demonstrou potencial para induzir a produção de metabólitos secundários voláteis após dano causado pela *Spodoptera exigua*¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

A aplicação exógena de ácido linolênico também foi avaliada por SUMAYO et al. (2014)¹⁵⁷, que observaram uma série de mudanças fisiológicas e bioquímicas que resultaram em maior resistência do tabaco à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*.

FIGURA 2. 15 - Etapas na rota de conversão do ácido linolênico em ácido jasmônico (a) e rota de sinalização para ativação das respostas induzidas em tomateiro (b).

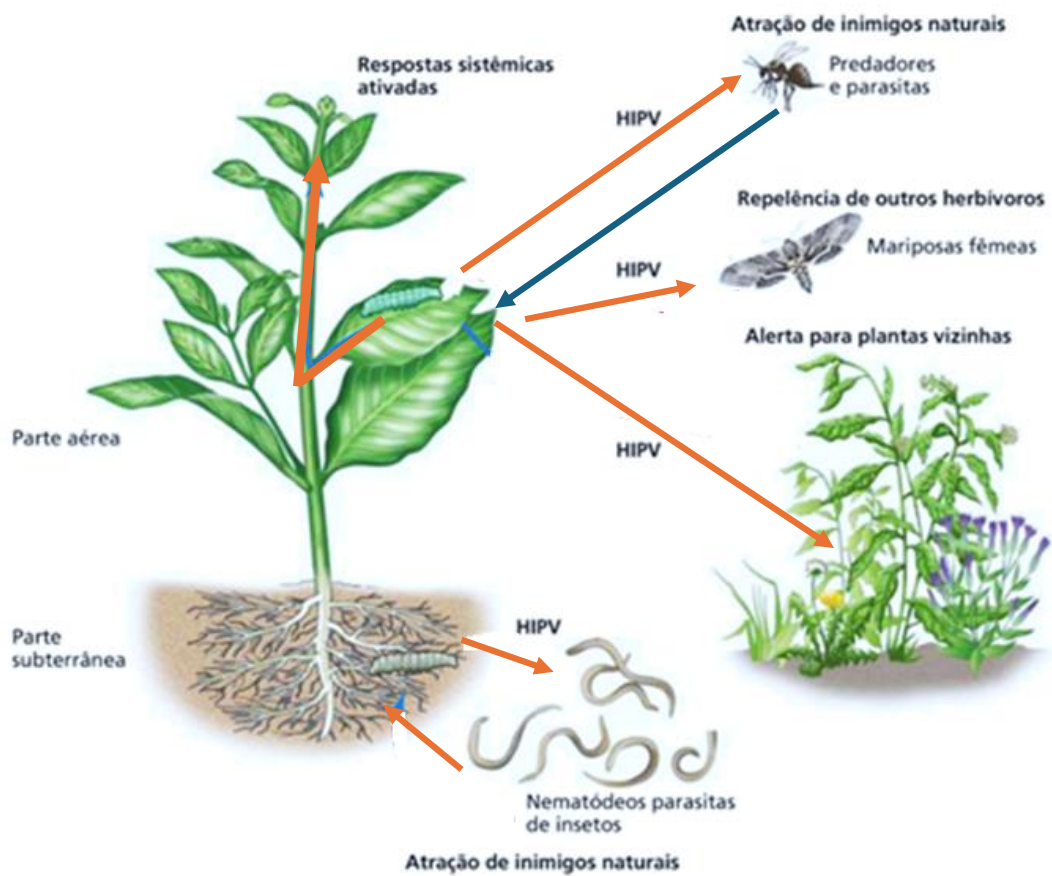


Adaptado: LINCONL TAIZ, 2017¹⁵⁶

Heptadecanal, pentadec-5-en-1-ol, heptadec-2-eno-1,5-diol e pentadec-2-en-1-ol são derivados de aldeídos e álcoois, cuja produção em plantas tem sido relacionada ao cheiro de folhas frescas¹⁵⁸. Esses compostos voláteis são considerados sinalizadores químicos da indução da expressão gênica associada a condições de estresse.

Os voláteis produzidos pelas plantas desempenham diversas funções ecológicas, que vão além da mediação das interações entre plantas e insetos. Esses compostos podem atrair inimigos naturais e parasitoides, além de atuar como sinais sistêmicos dentro da própria planta. Também podem funcionar como sinais a longa distância, comunicando-se com plantas vizinhas para iniciar mecanismos de defesa, (FIGURA 2. 16)¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Por exemplo, plântulas de milho tratadas com volicitina liberam grandes quantidades de terpenos, os quais atraem as vespas parasitoides *Microplitis croceipes*.

FIGURA 2. 16 - Representação esquemática das funções ecológicas dos voláteis induzidos por insetos herbívoros.



Adaptado: LINCONL TAIZ, 2017¹⁵⁶

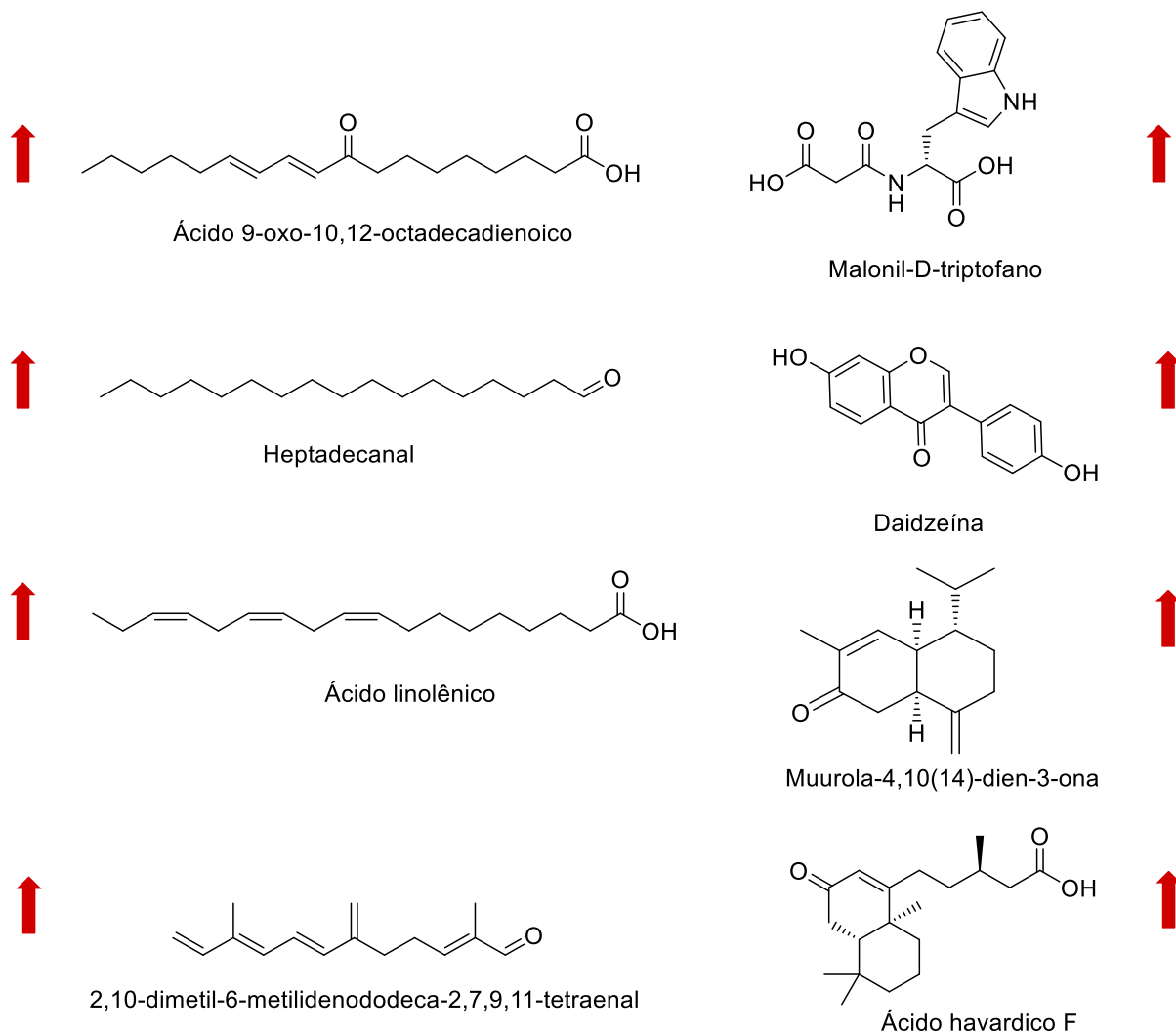
Em artemísia, estudos demonstraram que os voláteis induzem resistência a herbívoros em diferentes ramos da planta^{155,161}. Os álcoois aqui induzidos podem ter sido produzidos a partir da redução dos aldeídos por enzimas redutases (aldeído redutases). Uma importante correlação é que essa cascata de modificações pode ter como precursor o ácido linolênico, indicando uma forte ativação dessa via biossintética em resposta ao dano causado pela *Spodoptera frugiperda*.

Outro ponto interessante é que a daidzeína, uma isoflavona, foi induzida exclusivamente na folha velha. Na literatura, essa isoflavona está

diretamente relacionada à defesa da planta contra estresse de insetos e patógenos. MURAKAMI et al. (2014)¹³¹ observaram que a daidzeína foi induzida em folhas de soja após herbivoria por *Spodoptera litura*. ZHOU et al. (2011)¹⁶² também demonstraram que a daidzeína pode inibir significativamente o crescimento larval de *Spodoptera litura*.

Outros compostos que são metabólitos induzidos diferencialmente entre os órgãos foram os diterpenoides muurola-4,10(14)-dien-3-ona e ácido havárdico F, induzidos somente na folha velha. Por outro lado, o sesquiterpenoide 2,3,4,4,5,6,7,8-octahidro-3-hidroxi-4-metil-7-metilenoinaftalenocarboxaldeído foi induzido exclusivamente na folha nova. Na FIGURA 2. 17 apresentamos as estruturas químicas de algumas moléculas que foram anotadas e induzidas em folhas jovem e velha.

FIGURA 2. 17 - Estruturas químicas de moléculas induzidas em folhas jovem e velha de VC. As setas em vermelho indicam que o metabólito aumentou em relação ao controle.



O estágio VC é uma fase crucial durante o ciclo de vida das plantas, caracterizado por pouco órgão foliar e intensa atividade metabólica complexa. Diante disso, para compararmos a indução temporal, decidimos coletar o cotilédone (folha não verdadeira com baixa taxa fotossintética) como órgão aéreo mais velho. O cotilédone, por sua vez, é uma folha embrionária modificada, responsável por fornecer nutrientes essenciais nas fases iniciais do desenvolvimento, sendo, portanto, fundamental para o estabelecimento da planta.

Dessa forma, sua função nutricional e seu estágio de desenvolvimento podem influenciar diretamente na forma como a planta responde ao estresse causado pela herbivoria, contribuindo para a diferenciação das respostas observadas entre os órgãos analisados. Outra hipótese a se considerar é que todos os órgãos são importantes, o que pode explicar a grande semelhança de perfis metabólicos entre as folhas quando a planta está sob ataque de insetos.

Diante disso, além de mostrar tolerância e direcionar também energia para a emergência de novas folhas, a planta parece investir em defesa indireta e/ou em defesa sistêmica devido à grande correlação de compostos voláteis emitidos. Portanto, como a planta se encontra em uma fase crítica para a sua sobrevivência, estas podem ser as possíveis estratégias para superar o estresse de herbivoria¹⁶³.

2. 4. 5 - Metabolômica Comparativa das Folhas de Soja no Estágio V2.

Para observar padrões de separação de grupos no estágio V2 da soja, também aplicamos a PCA (FIGURA 2. 18). Observamos que a maior separação dos grupos está relacionada aos tratamentos das folhas (controle e indução), PC1 (24.3%). A separação relacionada à idade das folhas é menor, sendo mais pronunciada quando as plantas estão sob estresse por insetos, PC2 (21.6%). Assim, esses resultados sugerem uma contribuição importante da indução para a modulação dos níveis de metabólitos e para a diferenciação entre as folhas. Os valores da PERMANOVA refletem esse grau de separação dos grupos, conforme mostrado na TABELA 2. 4.

FIGURA 2. 18 - Gráfico de PCA comparando o metaboloma das folhas jovem e velha (controle e indução) no estágio V2.

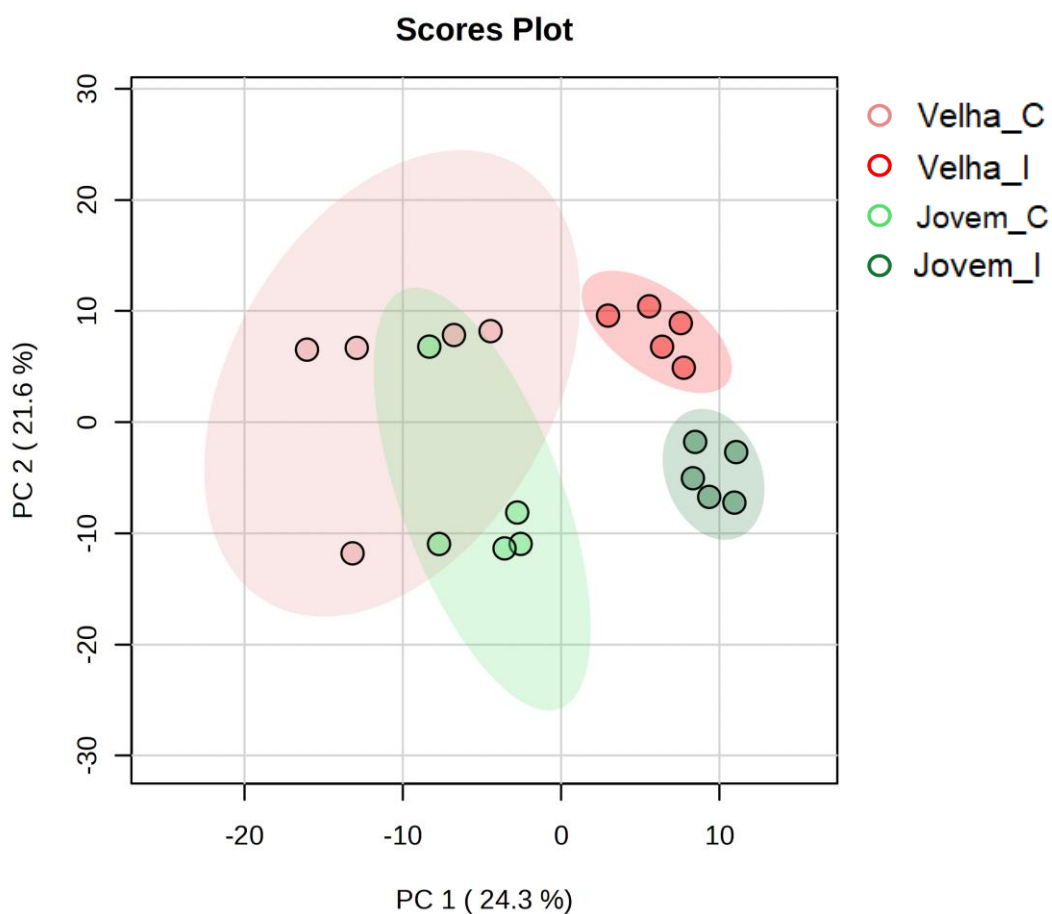


TABELA 2. 4 - Resultados de PERMANOVA dos tratamentos entre as folhas jovem e velha no estágio V2.

Tratamentos V2	F	R ²	p.Valor
Velha-C vs velha-I	14.19	0.64	0.006*
Velha-C vs jovem-C	4.25	0.35	0.052
Velha-C vs jovem-I	22.88	0.74	0.008*
Velha-I vs jovem-C	22.55	0.74	0.013*
Velha-I vs jovem-I	54.17	0.87	0.006*
Jovem-C vs jovem-I	14.40	0.64	0.008*

* Indica significância $p \leq 0,05$.

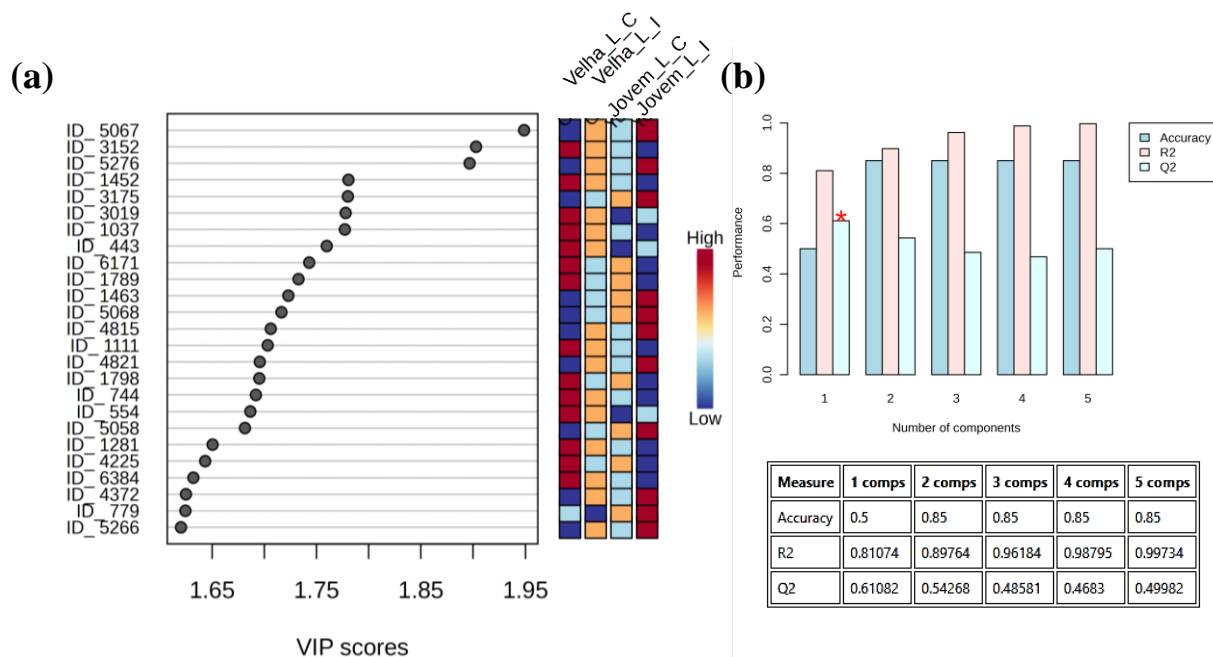
Em seguida, utilizamos o valor de VIP para determinamos as moléculas com abundâncias significativas entre os órgãos (FIGURA 2. 19(a)). Dentre os 25 metabólitos que apresentaram variações significativas, 12 pertencem à classe dos ácidos graxos e conjugados, 4 são aminoácidos e conjugados, 3 são terpenos, 3 são ácidos cinâmicos e derivados, e os demais incluem 1 derivado de carboidrato e 1 esteroide. Esses compostos mostraram-se alocados diferencialmente em ambos os tratamentos das folhas jovens e velhas.

Os ácidos graxos e conjugados metil 8-[3-(1-hidroxioceta-2,5-dien-1-il)oxiran-2-il]octanoato, ácido 12,14-dihidroxi-13-(metoxicarbonil)-3,5,7-trimetiltetradeca-2,4-dienoico, ácido 2,16-dimetilidenoheptadecanodioico, coelenato de metila, ácido 8-hidroxiocetadeca-11,17-dien-9-inoico, ácido 2,8-dietilnonanodioico, o aminoácido (glicilfenilalanileucilglicina), o terpenoide (turmerona), e o esteroide (estra-2,5(10)dien-17-ona) são constitutivamente mais presentes nas folhas jovens. No entanto, observamos que nas folhas induzidas (jovens e velhas), os níveis desses metabólitos aumentam, sendo esse aumento mais pronunciado no órgão jovem.

Por outro lado, a piumsaponina I (terpenoide), ácido ferúlico (ácido fenólico), ácido tuberônico- β -D-glicosídeo, (derivado de ácido graxo), e o aminoácido *N,N'*-[4-(2-fenil-hidrazinilideno)-4H-pirazol-3,5-diil]diacetamida, diminuem na folha velha induzida, enquanto aumentam na folha jovem induzida.

Diante dessas análises, observamos diferenças marcantes entre os perfis metabólicos das folhas, com destaque para as folhas jovens, que apresentaram maior variação na abundância de compostos em resposta à indução. De forma semelhante, Meldau et al. (2012) também ressaltam que tecidos jovens tendem a ser mais responsivos a estímulos induzidos do que os tecidos mais velhos. Essa maior responsividade pode estar associada ao fato de que as folhas jovens são mais ativas do ponto de vista fotossintético e recebem maior incidência de luz em comparação às folhas mais velhas.¹⁶⁴

FIGURA 2. 19 - Análises discriminantes por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). (a) VIP scores destacando a variação dos 25 metabólitos anotados de relevância significativa entre os tratamentos das folhas jovem e velha no estágio V2 da soja; (b) Capacidade preditiva do modelo PLS-DA com base no valor de Q^2 validados cruzadamente em 10 vezes e a precisão de R^2 e Q^2 superiores a 0,6. O asterisco em vermelho em (b) representa o melhor modelo classificador.



Com base nas informações do gráfico de *volcano*, selecionamos algumas moléculas que diferiram significativamente entre o controle e indução (FIGURA 2. 20). Esses metabólitos induzidos pertencem a diferentes classes como ácidos graxos e conjugados, carboidratos e derivados, terpenoides, alcaloides e benzoides, como mostrado no Apêndice A.7.

Os metabólitos significativamente induzidos em resposta a herbivoria nas folhas jovem e velha foram: ácido 3-hidroxitetradecanoico, ácido 12-hidroxiheptadeca-8,10,14-trienoico, turmerona, ácido indol-3-acrílico e o 9,10,13-trihidroxiocetadeca-11,15-dienoico. Enquanto isso, o ácido 3-hidroxi-12-metiltridecanoico, ácido 2,6-hexadecadiinoico, ácido 2-prop-1-en-2-ildecanoico,

hexoato de etila, ácido smaditerpênico C, diéster de betulina, muurola-4,10(14)-dien-3-ona e o triptofano foram exclusivos na folha velha.

Por outro lado, os compostos restritos na folha jovem foram: metil 3,6-octadecadiinoato, ácido 5-hidroxi-4-metilpent-3-enil-6,10-dimetilundeca-2,6,10-trienoico, ácido 9-oxooctadeca-10,12,15-trienoico e ácido 12-hidroxi-octadec-9-enoico. No diagrama de Venn também representamos essas comparações, porém com todas as moléculas induzidas em ambas as folhas (FIGURA 2. 21).

FIGURA 2. 20 - Gráfico de *volcano* comparando os metabólitos diferenciais nos tratamentos controle e indução de folhas de soja no estágio V2. (a) metabólitos regulados na folha velha; (b) metabólitos regulados na folha jovem. Os pontos vermelhos e azuis denotam metabólitos significativamente regulados positivamente e negativamente, respectivamente. Valor $p \leq 0,05$; mudança relativa (FC)= 2,0; taxa de descoberta falsa (FDR)<0,5.

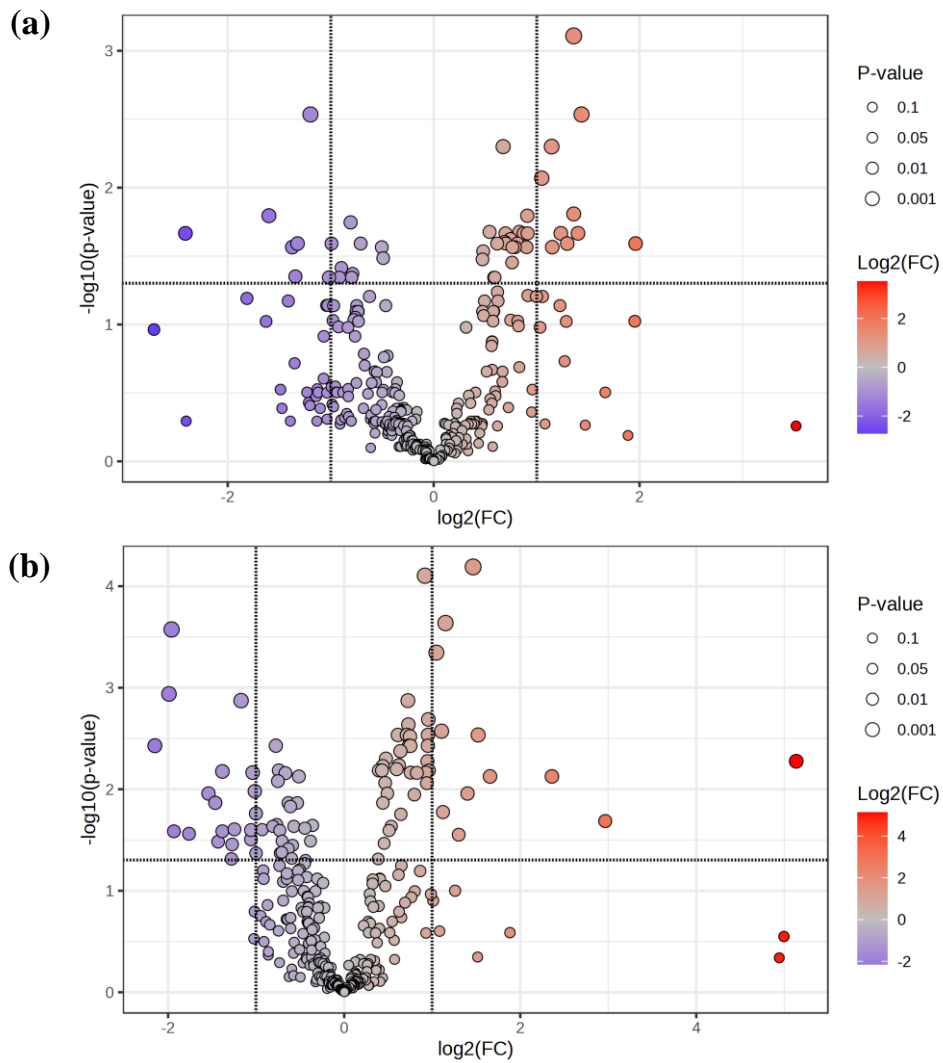
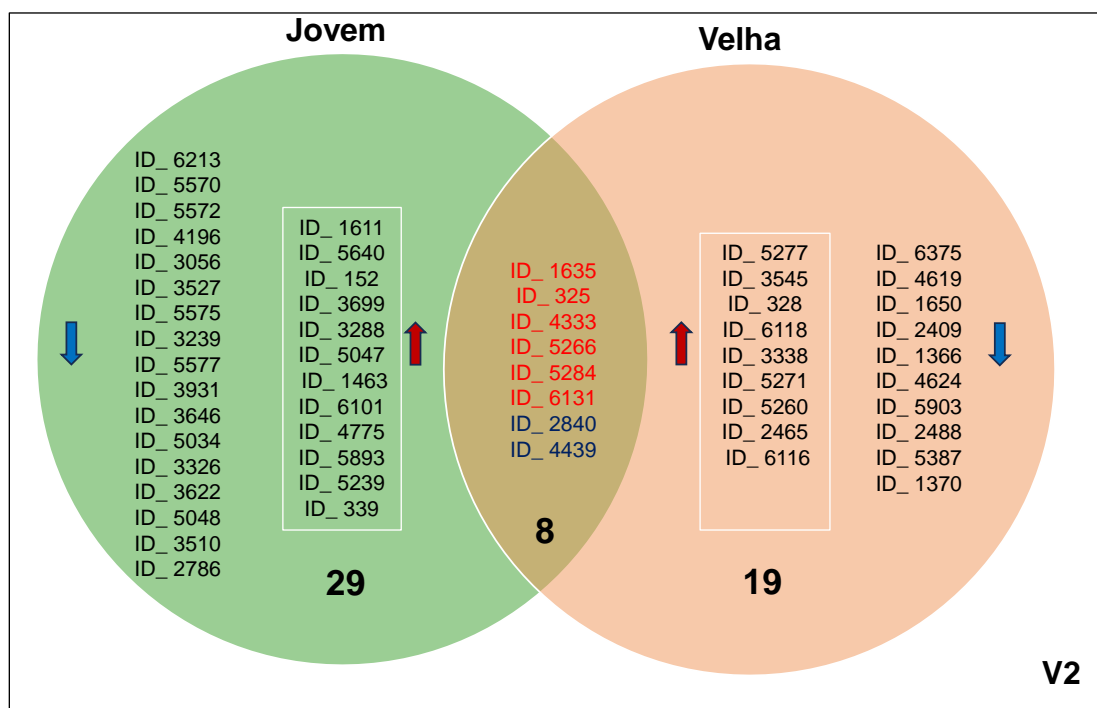


FIGURA 2. 21 - Diagrama de Venn representando os IDs exclusivos e comuns dos metabólitos significativos pelo *volcano* nas folhas jovem e velha do V2. As setas vermelha e azul, referem-se às moléculas reguladas positivamente e negativamente, respectivamente.

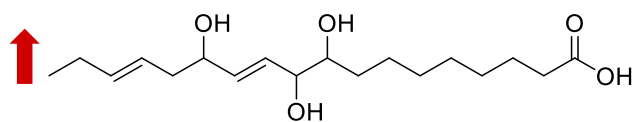


Com base nisso, as moléculas da classe dos ácidos graxos e seus conjugados foram mais induzidas em comparação com o controle, tanto nas folhas jovens quanto nas velhas. No caso dos metabólitos secundários, os terpenos voláteis se destacaram como os compostos mais induzidos em ambas as folhas. Embora os perfis metabolômicos dos órgãos fossem semelhantes, observou-se que as folhas velhas apresentaram uma maior quantidade de terpenos induzidos (Apêndice A.7).

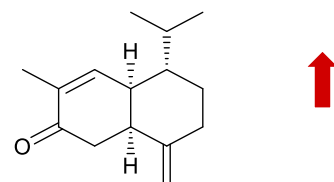
Dentre os compostos anotados, podemos destacar os sesquiterpenos e triterpenos que apresentam estrutura química similar a turmerona, muuroala-4,10(14)-dien-3-ona, ácido smaditerpênico e diéster de betulina. Embora ainda não existam relatos da presença desses metabólitos específicos na soja, em plantas como o milho, a turmerona demonstrou efeitos inseticidas e repelentes sobre a

lagarta-da-couve (*Trichoplusia ni*), o gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais* M.) e a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith). No arroz e no pepino, essa molécula exibiu atividade antifúngica significativa contra os patógenos fúngicos *Bipolaris oryzae* e *Podosphaera xanthii*, respectivamente ¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. É interessante mencionar que essa molécula também se mostrou significativa pelo valor de VIP score. A muurola-4,10(14)-dien-3-ona, foi isolado pela primeira vez do cerne de *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*, e o ácido smaditerpênico foi encontrado em folhas de *Yacon* (*Smallanthus sonchifolius*). Na FIGURA 2. 22 mostramos as estruturas químicas das moléculas anotadas e induzidas em ambas as folhas.

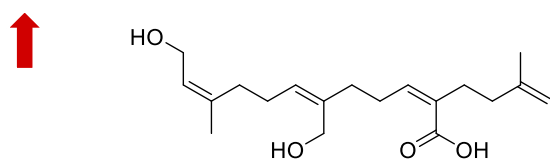
FIGURA 2. 22 - Estruturas químicas de moléculas induzida em folhas jovem e velha de V2. As setas em vermelho indicam que o metabólito aumentou em relação ao controle.



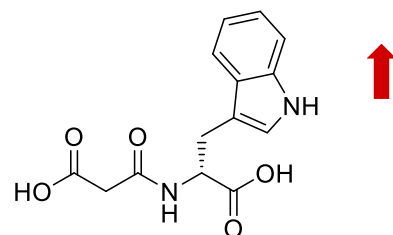
Ácido 9,10,13-trihidroxiocetadeca-11,15-dienoico



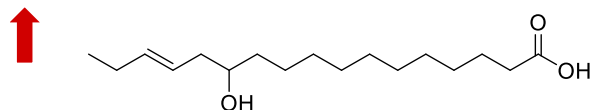
Muurola-4,10(14)-dien-3-ona



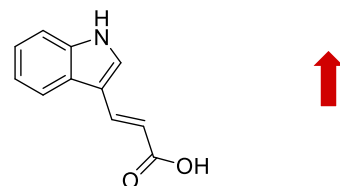
Ácido smaditerpênico



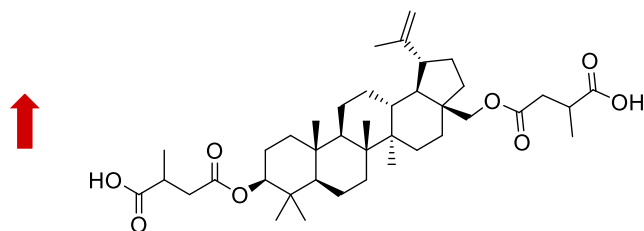
Malonil-D-triptofano



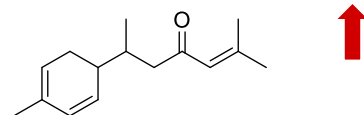
Ácido 12-hidroxiheptadec-14-enoico



Ácido indol-3-acrílico



Diéster de betulina



Turmerona

Está bem estabelecido que os voláteis induzidos das plantas ajudam nas interações bióticas e abióticas. Assim, a liberação de terpenos voláteis pode ter vários efeitos ecológicos, servindo como componentes essenciais de vários fitohormônios, pigmentos e esteróis. Além disso, eles também atuam como aleloquímicos, toxinas defensivas e dissuadores de herbívoros¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

Além dos voláteis induzidos, temos o ácido indol-3-acrílico (ácido butírico), um fitohormônio relacionado com o crescimento vegetal. Este metabólito tem como precursor o triptofano, que também se mostrou induzido no estágio V2. O triptofano é um dos aminoácidos essenciais nas plantas e intermediário na biossíntese das auxinas. Assim, essas moléculas estão envolvidas em alterações morfológicas das plantas, como no crescimento das raízes e no surgimento de novas folhas^{172,173}.

A hipótese de defesa ótima prevê que as folhas jovens são mais defendidas que as folhas velhas pela maior aptidão metabólica para a planta. De fato, muitos estudos em diferentes plantas têm mostrado isso. No entanto, neste estudo a soja parece não atender a essa hipótese. Essa discordância também foi vista por BOIÇA JUNIOR et al. (2015)¹⁷⁴ e SOUZA et al (2021)¹²³.

Em geral, as plantas tendem a aumentar sua resistência e reduzir o crescimento como resposta a ataques de herbívoros. No entanto, observamos que a cultivar suscetível BRS 284, melhorada com foco em alta produtividade, adota estratégias distintas para lidar com o estresse. Nossos resultados indicam que, além de ativar uma intensa cascata de sinalização capaz de induzir a biossíntese de diversos compostos, essa cultivar também mantém o investimento em crescimento, sugerindo um possível balanço entre defesa e desenvolvimento.

Como a maioria dos compostos induzidos são voláteis e podem atuar como sinalizadores, supomos que a planta esteja investindo em defesa indireta e/ou induzindo sistemicamente em outros órgãos. Alternativamente, devido ao tempo de indução analisado, a planta pode ainda estar no início da ativação das

defesas. Outra hipótese é que, por estar em um estágio vegetativo inicial e ao investir em crescimento para alcançar a fase de reprodução, a planta apresente características bioquímicas de tolerância ao estresse por herbivoria.

Para responder a essas hipóteses, é importante realizar uma anotação precisa dos compostos. Além dos experimentos realizados, é necessário promover estudos para entender melhor os papéis fisiológicos e ecológicos dos terpenos no sistema soja-inseto. Outro ponto relevante é realizar estudos de expressão dos genes biossintéticos e testes de toxicidade para avaliar a alocação e ação desses compostos. Ademais, é interessante conduzir testes com as folhas sistêmicas para verificar a magnitude de resistência nesses órgãos.

2. 4. 6 - Metabolômica Comparativa das Folhas de Soja no Estágio V5.

Os resultados da análise de PCA para os grupos no estágio V5 mostraram que a maior diferença nos níveis de metabólitos está relacionada com a idade da folha, PC1 (55.7%). Ao comparar os tratamentos, induzido e controle, os grupos apresentaram forte sobreposição. Porém, é possível observar uma tendência de separação entre o controle e a indução na folha jovem, PC2 (12.4%) (FIGURA 2. 23). Dessa forma, o dano causado pelo herbívoro pouco impacta na diferenciação da composição metabólica entre as folhas de soja. Dentre os estágios em estudo, o V5 foi o que apresentou o menor grau de indução após o ataque por *Spodoptera frugiperda*. Os resultados da PERMANOVA, apresentados na TABELA 2. 5, refletem esse padrão de agrupamento.

FIGURA 2. 23 - Gráfico de PCA comparando o metaboloma das folhas jovem e velha (controle e indução) no estágio V5.

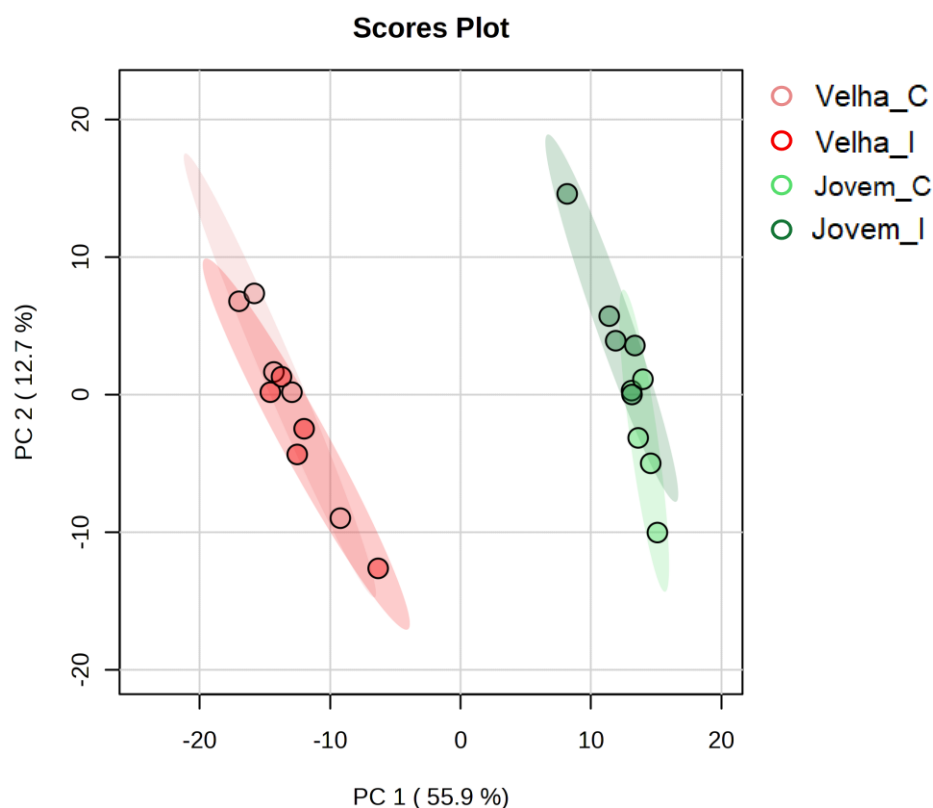


TABELA 2. 5 - Resultados de PERMANOVA dos tratamentos entre as folhas jovem e velha no estágio V5.

Tratamentos V5	F	R ²	p.Valor
Velha-C vs velha-I	1.62	0.17	0.247
Velha-C vs jovem-C	55.69	0.88	0.012*
Velha-C vs jovem-I	38.59	0.83	0.008*
Velha-I vs jovem-C	53.84	0.87	0.006*
Velha-I vs jovem-I	41.35	0.84	0.005*
Jovem-C vs jovem-I	7.55	0.49	0.027*

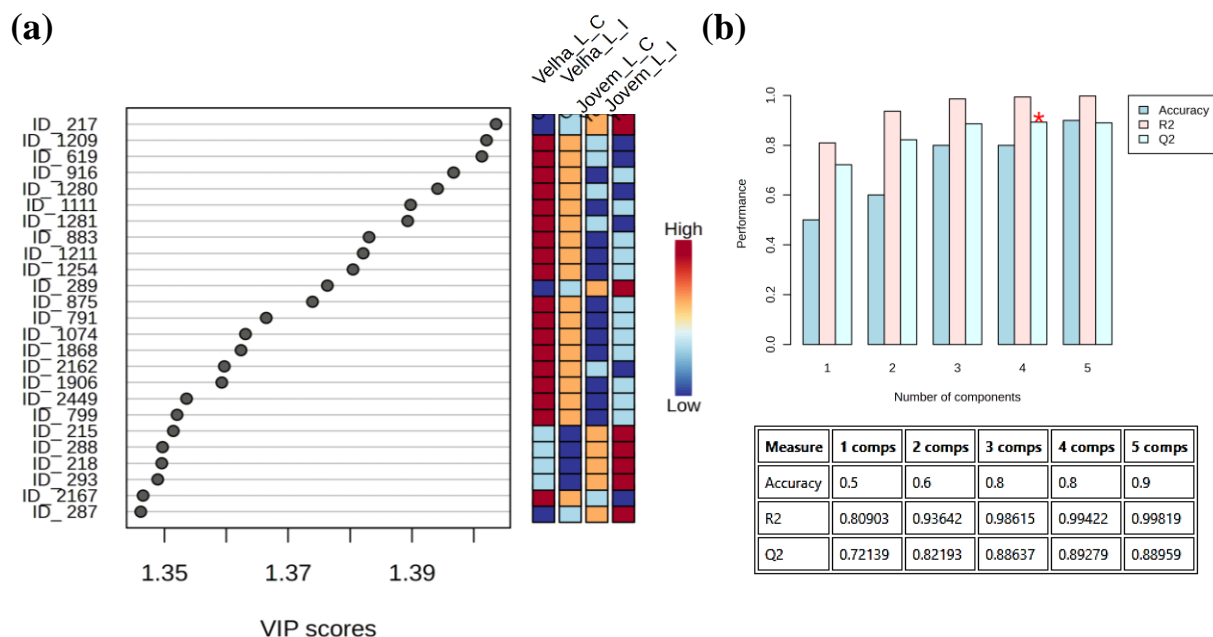
* Indica significância $p \leq 0,05$.

Baseado nisso, utilizamos o valor de VIP para identificar os compostos que apresentaram variações expressivas na discriminação metabolômica das folhas de soja. Os 25 metabólitos com maior valor de VIP estão apresentados na FIGURA 2. 24(a). Esses metabólitos apresentam alocação

diferencial entre os órgãos e pertencem às classes de ácidos graxos e derivados, ácidos cinâmicos e seus derivados, carboidratos e derivados, benzoides, terpenoides, e cumarinas e seus derivados.

Assim, na folha velha, os níveis constitutivos de compostos como 7-(hidroximetil)-4-({[3,4,5-trihidroxi-6-({[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi}metil)oxan-2-il]oxi}metil)-ciclopenta[c]piran-1-il, 6-[[6-[6-(2-etil-4,5-dihidroxi-6-metiloxan-3-il)oxi-4,5-dihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-4,5-dihidroxi-2-metiloxan-3-il]amino]-4-(hidroximetil)ciclohex-4-eno-1,2,3-triol, 2-butyl-4-metoxi-6,6-dimetilciclohexa-2,4-dien-1-ona, 6,10-dimetilundeca-5,9-dieno-2,8-diona, 2-oxo-4-(2,6,6-trimetilciclohexen-1-il)butanal, ácido 2-[4-butan-2-il]fenil]propanoico, 5-hidroxi-1,3-dimetil-2-(3-oxobutil)ciclohex-2-eno-1-carbaldeído, ácido 5-[[5-[3,4-dihidroxi-4-(hidroximetil)tetra-hidrofuran-2-il]oxi-3,4-dihidroxi-6-(2-metil-4-oxo-piran-3-il)oxi-tetrahidropiran-2-il]metoxi]-3-hidroxi-3-metil-5-oxo-pentanoico, 4-(2,4-dimetoxifenil)-3-metilbutan-2-ol, 4-[4-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-il]but-3-eno-2,2-diol, 2-[2-amino-3-3,4,5-tri-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxipropoxi]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol e teasaponina A5 são mais elevados. Em contrapartida, na folha jovem, estão em menor abundância. No entanto, sob condições de ataque, foi observada uma modulação nesses padrões: os níveis desses metabólitos diminuiram nas folhas velhas, enquanto aumentaram nas folhas jovens.

FIGURA 2. 24 - Análises discriminantes por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). (a) VIP scores destacando a variação dos 25 metabólitos anotados de relevância significativa entre os tratamentos das folhas jovem e velha no estágio V5 da soja; (b) Capacidade preditiva do modelo PLS-DA com base no valor de Q^2 validados cruzadamente em 10 vezes e a precisão de R^2 e Q^2 superiores a 0,7. O asterisco em vermelho em (b) representa o melhor modelo classificador.



Entre as moléculas responsáveis pela maior diferenciação entre os órgãos, os metabólitos secundários desempenham um papel central. Considerando que o estágio V5 está temporalmente mais próximo do início da fase reprodutiva, ocorre uma reconfiguração metabólica nas folhas, refletindo o equilíbrio entre a alocação de recursos para o desenvolvimento reprodutivo e a manutenção das defesas contra estresses^{145,175,176}.

Durante esse estágio, a planta redireciona compostos primários, como açúcares e aminoácidos, para sustentar o crescimento de flores, vagens e sementes. Como consequência, o metabolismo primário nas folhas diminui, enquanto a produção de metabólitos secundários é intensificada. Os resultados observados corroboram os achados de PARK et al. (2023)¹⁷⁵ e KOCH et al. (2004)¹⁷⁶, que indicam que, nos estágios reprodutivos da soja, como o início da

floração (R1), a concentração de açúcares aumenta, refletindo a redistribuição desses carboidratos das folhas para os órgãos coletores, como as sementes, para dar suporte à sua maturação. Esse fenômeno também está relacionado à intensa reprogramação metabólica que prepara a planta para suportar os desafios do desenvolvimento reprodutivo.

Em seguida, construímos o gráfico de *volcano* (FIGURA 2. 25) para detectarmos as moléculas com variações significativas entre os tratamentos. Notamos que apenas a folha jovem apresentou moléculas induzidas, o que pode ser explicado pelo fato de essas folhas serem metabolicamente mais ativas em comparação às folhas velhas, que já se encontram em processo de senescência (processo de envelhecimento e morte natural das folhas de uma planta).

Dentre as moléculas induzidas estão um dissacarídeo 6-O-(β -L-ramnopiranosil)-D-glicose, regulado positivamente, e quatro derivados de ácidos graxos: ácido tridecanodioico, ácido 9-oxooctadeca-10,12,15-trienoico, ácido 16-hidroxihexadecanoico e ácido 3-hidroxi-10-metil-6-fenilmetoxiundecanoico, que mostraram regulados negativamente. É interessante mencionar que esses resultados refletem no agrupamento dos grupos da PCA. As estruturas químicas desses compostos estão apresentadas na FIGURA 2. 26.

FIGURA 2. 25 - Gráfico de *volcano* comparando os metabólitos diferenciais nos tratamentos controle e indução de folhas de soja no estágio V5. (a) metabólitos regulados na folha velha; (b) metabólitos regulados na folha jovem. Os pontos vermelhos e azuis denotam metabólitos significativamente regulados positivamente e negativamente, respectivamente. Valor $p \leq 0,05$; mudança relativa (FC)=2,0; taxa de descoberta falsa (FDR)<0,5.

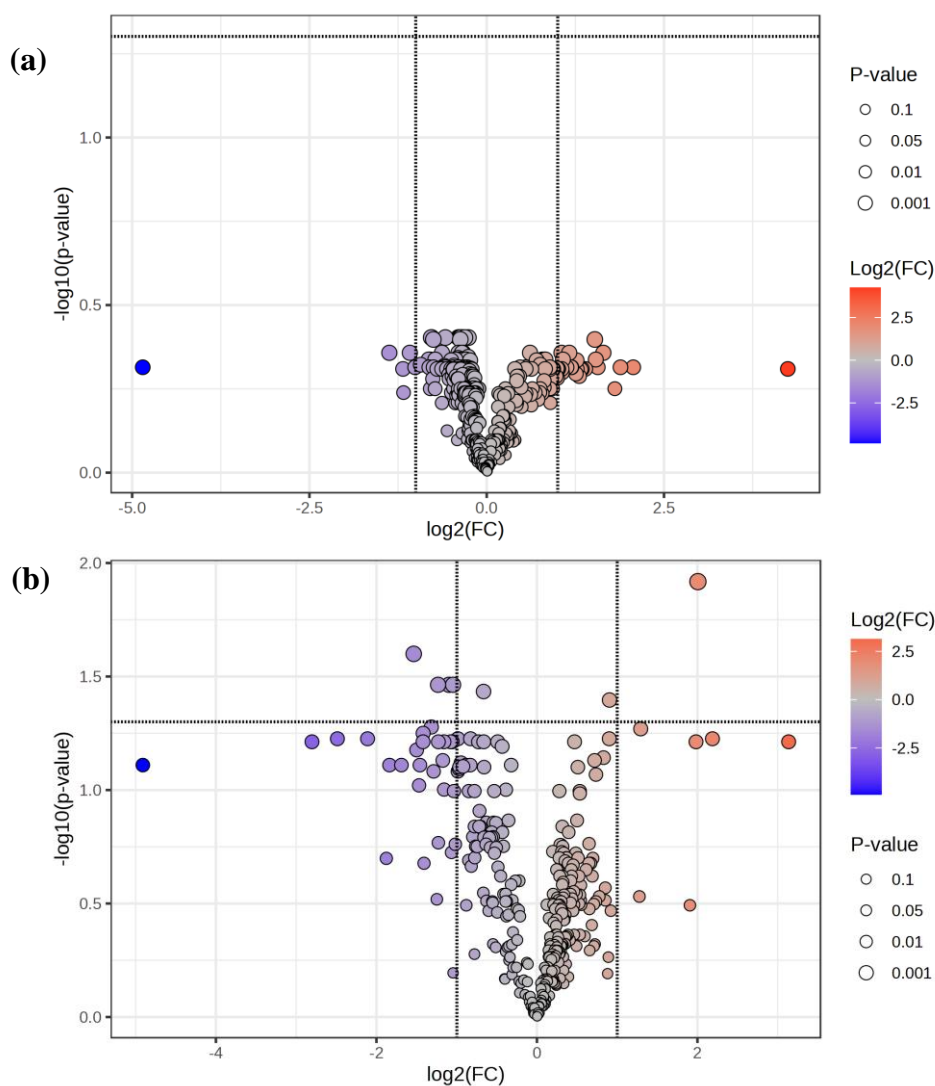
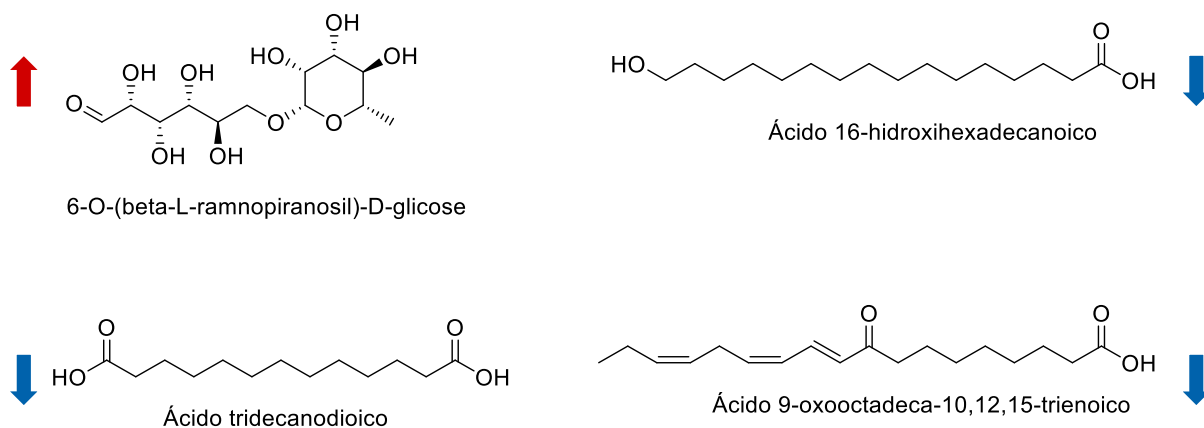


FIGURA 2. 26 - Estruturas químicas dos compostos induzidos na folha jovem de V5. As setas vermelha e azul indicam, respectivamente, o aumento e a diminuição do metabólito em relação ao controle.



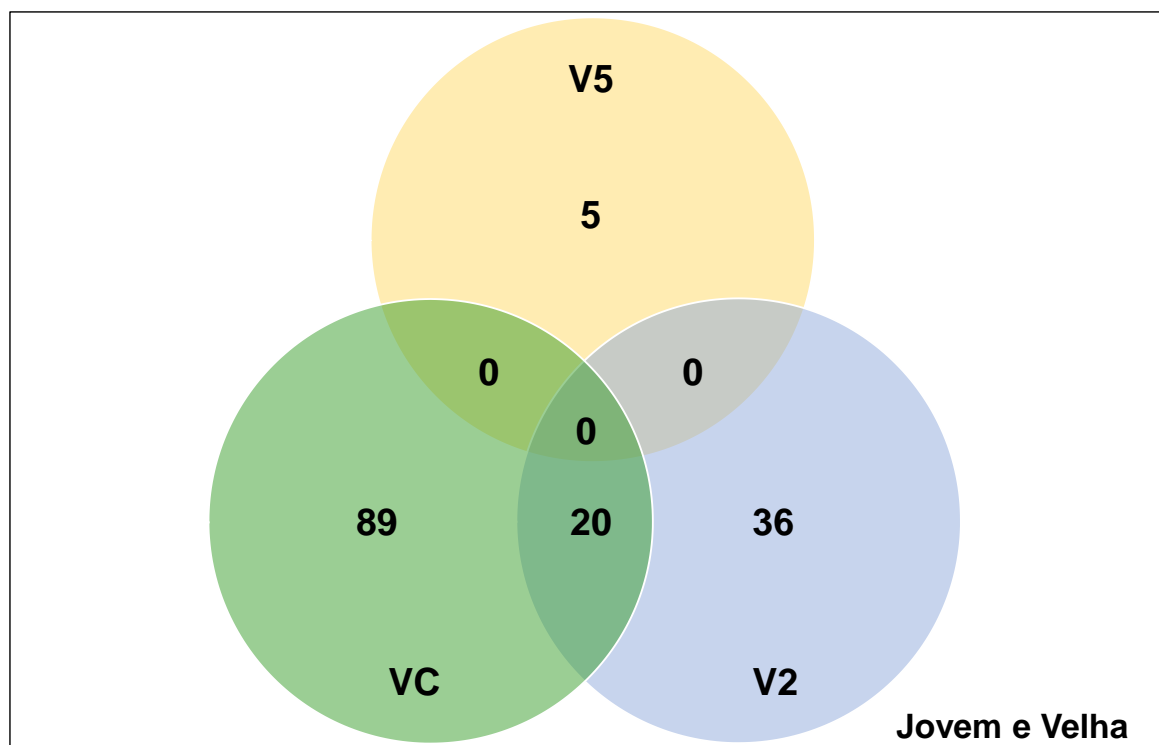
A partir dos resultados, uma das hipóteses de defesa vegetal é baseada na premissa de que há um *trade-off* fisiológico, onde as plantas só direcionam energia para a defesa quando o custo é menor que o benefício. Ou seja, a alocação de recursos da reprodução para a defesa, como resistência induzível e metabólitos secundários que são altamente bioativos em baixas concentrações^{64,177,178}.

Portanto, a resposta de indução em V5 pode estar relacionada à fase de desenvolvimento da planta. Neste estágio, a planta já está estabelecida e encontra-se em transição para a fase reprodutiva. Possivelmente, a planta esteja direcionando suas energias para o surgimento de novos órgãos, que passam ser de extrema importância para alcançar seu alvo final. Assim, a planta pode estar priorizando esses processos ao invés de alocar recursos para a defesa contra o dano foliar.

Diante desses resultados, é interessante observar que a maior diferença entre os órgãos no estágio V5 está relacionada com a idade da folha. Essa dinâmica de alocação diferencial é consistente com estudos anteriores na

literatura^{70,149,179}. Ao comparar entre os estágios, o V5 apresentou menor variação metabólica entre os tratamentos, FIGURA 2. 27.

FIGURA 2. 27 - Diagrama de Venn representando a quantidade de IDs exclusivos e comuns dos metabólitos significativos induzidos (aumentados e reduzidos em relação ao controle), conforme identificado pela análise de *volcano* nas folhas jovem e velha dos estágios VC, V2 e V5.



Assim, é importante destacar que a resposta de indução da planta à herbivoria pode variar qualitativa e quantitativamente, dependendo de fatores como a espécie de herbívoro que causa o dano, o hábito alimentar do inseto, o estágio fisiológico, e a espécie da planta hospedeira^{58-60,67,180}.

2.5 - CONCLUSÕES

Neste estudo, demonstramos que a técnica de extração associada a uma abordagem metabolômica não direcionada permitiu a detecção e anotação de uma diversidade de metabólitos de diferentes classes químicas. Ficou evidente que, além do efeito temporal do desenvolvimento da planta, o estresse por herbivoria também modula os níveis dos metabólitos nos diferentes estágios de desenvolvimento (VC, V2 e V5).

Os estágios VC e V2 compartilham variações metabólicas semelhantes frente à herbivoria, enquanto o estágio V5 apresenta um perfil diferente. Nos estágios VC e V5, a idade da folha (jovem *versus* velha) é o fator predominante nas diferenças de perfil químico. Por outro lado, o estágio V2 é a fase em que a indução por herbivoria mais influenciou as separações dos grupos.

Os compostos que apresentaram alterações significativas na abundância relativa pertencem, em sua maioria, ao metabolismo primário, como ácidos graxos e seus derivados. Dentre eles, destacaram-se os ácidos voláteis da família dos octadecanoides que são altamente acumulados nos estágios VC e V2. Observamos que ácidos graxos, ácidos fenólicos e terpenoides são os principais metabólitos encontrados na soja durante a fase vegetativa, mas são acumulados de maneira diferenciada em folhas jovens e velhas, de modo que os órgãos jovens aparentam ser mais induzíveis do que os órgãos mais velhos.

Anotamos os principais metabólitos que diferiram significativamente entre os tratamentos (controle e indução). Muuro-la-4,10(14)-dien-3-ona, ácido havárdico F, daidzeína e ácido linolênico foram induzidos apenas em folhas velhas de VC. Enquanto nas folhas jovens são induzidos derivados de ácidos graxos. Em V2, os terpenos foram os compostos secundários mais induzidos em ambas as folhas, porém, nas folhas mais velhas houve maior diversidade desses metabólitos como turmerona, ácido smaditerpênico C, diéster de betulina e muuro-la-4,10(14)-dien-3-ona.

Muurola-4,10(14)-dien-3-ona foi o metabólito secundário comum entre as folhas velhas dos estágios VC e V2. A turmerona, por sua vez, foi o único terpenoide induzido exclusivamente no estágio V2, tanto nas folhas velhas quanto nas jovens. No estágio V5, apenas as folhas jovens apresentaram compostos induzidos, todos pertencentes ao metabolismo primário. Isso sugere que a planta pode estar priorizando processos bioquímicos voltados para o crescimento da planta para o estágio reprodutivo, em vez de alocar recursos para a defesa contra danos foliares.

Em síntese, a idade da folha e o estágio da soja influenciaram diretamente a resposta de indução. As folhas velhas parecem responder mais fortemente à herbivoria que folhas jovens do ponto de vista da diversidade e abundância de metabólitos secundários induzidos. Além disso, os estágios VC e V2 mostraram uma resposta metabólica mais robusta ao estresse por herbivoria, enquanto V5 demonstra ser menos responsivo à herbivoria do ponto de vista do seu perfil metabólico.

Entender o papel dos metabólitos primários e secundários durante a interação planta-inseto é crucial para compreender não apenas a fisiologia básica da planta, mas também a diversidade de estratégias adaptativas que ela utiliza para prosperar sob condições de estresse. Do ponto de vista prático, o conhecimento sobre a alocação espacial e temporal dos metabólitos que mediam a interação planta-inseto poderá contribuir para a implementação de novas abordagens de monitoramento e controle de pragas agrícolas. Focar em partes da planta e estágios fenológicos nos quais a expressão de resistência ao ataque de insetos é maior pode colaborar para uma agricultura mais produtiva, adaptável e sustentável, além de aumentar a resistência das plantas aos estresses bióticos e abióticos.

CAPÍTULO 3: Estudo do Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em Diferentes Estágios da Soja

RESUMO – A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma cultura agrícola de grande importância econômica e nutricional. Entretanto, seu cultivo enfrenta desafios significativos relacionados ao ataque de pragas, sendo a *Spodoptera frugiperda* uma das principais ameaças à produtividade e à qualidade das lavouras. Este inseto destaca-se pela elevada capacidade de adaptação e resistência aos métodos convencionais de controle, como o uso de inseticidas químicos, além de ser capaz de atacar as plantas desde os estágios iniciais de desenvolvimento até as fases reprodutivas. Diante desse cenário, pesquisas têm se concentrado na exploração da resistência natural das plantas, visando o desenvolvimento de cultivares de soja mais resistentes ou tolerantes ao ataque de *S. frugiperda*. Este trabalho objetivou avaliar o efeito da resistência induzida em plantas de soja e dos diferentes estágios vegetativos (VC, V2 e V5) no desenvolvimento biológico de *S. frugiperda* alimentada com folhas previamente submetidas à herbivoria pela mesma espécie. As sementes da cultivar BRS 284 foram germinadas e mantidas em casa de vegetação. Após o transplante para vasos, as plantas foram utilizadas nos experimentos de herbivoria prévia e bioensaio de alimentação. Para a indução por herbivoria, utilizaram-se lagartas no 4^o/5^o instar, enquanto no bioensaio, lagartas no 3^o/4^o instar foram alimentadas com folíolos de soja previamente induzidos. Foram avaliados cinco tratamentos: controle (sem herbivoria) e herbivoria prévia nos três estágios da soja (VC, V2 e V5), com 20 repetições por tratamento. Os parâmetros como consumo foliar, peso larval, peso pupal e peso dos adultos, foram avaliados por meio de análise univariada. Os resultados demonstraram que o desenvolvimento de *S. frugiperda* foi significativamente influenciado pelo estágio de desenvolvimento da planta, enquanto a indução prévia tendo pouco efeito sobre a lagarta. Os estágios VC e V2 apresentaram maior impacto no desenvolvimento da praga: no estágio VC, houve redução significativa no peso de pupas e adultos, enquanto no estágio V2, observou-se uma diminuição expressiva na massa larval e do adulto. Em contrapartida, o estágio V5 revelou-se mais suscetível, permitindo um melhor desenvolvimento da lagarta, sem alterações significativas em sua biologia.

ABSTRACT – Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is an agricultural crop of great economic and nutritional importance. However, its cultivation faces significant challenges related to pest attacks, with *Spodoptera frugiperda* being one of the main threats to crop productivity and quality. This insect stands out for its high adaptability and resistance to conventional control methods, such as the use of chemical insecticides, and is capable of attacking plants from the early developmental stages to the reproductive phases. In this context, research has focused on exploring the natural resistance of plants to develop soybean cultivars that are more resistant or tolerant to *S. frugiperda* attacks. This study aimed to evaluate the effect of induced resistance in soybean plants and the influence of different vegetative stages (VC, V2, and V5) on the biological development of *S. frugiperda* fed with leaves previously subjected to herbivory by the same species. Seeds of the BRS 284 cultivar were germinated and maintained in a greenhouse. After transplanting into pots, the plants were used in the prior herbivory and feeding bioassay experiments. For herbivory induction, caterpillars in the 4th/5th instar were used, while in the bioassay, caterpillars in the 3rd/4th instar were fed with soybean leaflets previously induced by herbivory. Five treatments were evaluated: control (no herbivory) and prior herbivory at the three soybean stages (VC, V2, and V5), with 20 repetitions per treatment. Parameters such as leaf consumption, larval weight, pupal weight, and adult weight were evaluated through univariate analysis. The results demonstrated that the development of *S. frugiperda* was significantly influenced by the plant's developmental stage, while the prior induction had little effect on the caterpillar. The VC and V2 stages had the most significant impact on pest development: at the VC stage, there was a significant reduction in pupal and adult weights, while at the V2 stage, a substantial decrease in larval and adult mass was observed. In contrast, the V5 stage proved to be more susceptible, allowing better caterpillar development without significant changes in its biology.

3.1 - INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma cultura agrícola de alta relevância econômica e nutricional^{3,181}. No entanto, o cultivo da soja enfrenta desafios significativos relacionados a pragas, sendo a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, uma das principais ameaças ao rendimento e à qualidade das lavouras^{21,33}.

A *S. frugiperda* é um inseto polífago com elevada capacidade de adaptação e resistência a métodos convencionais de controle, como o uso de inseticidas químicos^{29,117}. Essa espécie pode atacar plantas desde os estágios iniciais de desenvolvimento até as fases reprodutivas, causando sérios prejuízos à produtividade. Esse cenário tem incentivado pesquisas voltadas para a exploração da resistência natural das plantas, com o objetivo de desenvolver cultivares de soja mais resistentes ou tolerantes ao ataque dessa praga^{8,28,62,182}.

As características de resistência das cultivares de soja à *S. frugiperda* impactam diretamente a biologia das lagartas, influenciando aspectos como sobrevivência, crescimento, reprodução e comportamento alimentar. Esses efeitos são atribuídos a mecanismos de resistência da planta que podem ser classificados como antibiose e antixenose¹⁸³⁻¹⁸⁵.

A antibiose é uma forma de resistência em que a biologia do inseto é prejudicada, impactando negativamente seu crescimento, desenvolvimento, reprodução e sobrevivência. Essa resistência é avaliada por parâmetros como redução do peso e tamanho corporal, prolongamento do ciclo de vida, deformações nos adultos e diminuição da fecundidade. Por outro lado, antixenose está associada ao comportamento do inseto, influenciando a atratividade e a colonização da planta hospedeira. Para avaliá-la, analisam-se fatores como consumo alimentar, preferência de alimentação e oviposição¹⁸⁴⁻¹⁸⁸.

Por exemplo, lagartas de *Spodoptera cosmioides*, *Helicoverpa armigera* e *Anticarsia gemmatalis* apresentaram redução de peso ao serem

alimentadas com cultivares de soja resistentes^{183,184,189}. Similarmente, genótipo de soja apresentou alto grau de resistência a *Spodoptera eridania* do tipo não preferência para alimentação, em testes com e sem chance de escolha²⁶.

Outros estudos também têm destacado características de resistência em genótipos de soja contra importantes pragas. WILLE et al. (2017)¹⁹⁰ demonstraram que o genótipo Benso 1RR prolongou o ciclo de vida da lagarta-falsa medideira (*Chrysodeixis includens*) e reduziu os pesos larval e pupal dessa espécie. MORAES (2017)¹⁹¹ concluiu que os genótipos IAC 100 e PI 227682 apresentaram menor atratividade para alimentação de *H. armigera*. Os genótipos M8230 RR e PI 227687 também causaram efeitos negativos no desenvolvimento de *H. armigera*, incluindo o prolongamento do período larval e do ciclo total.

Para espécies do gênero *Spodoptera*, que são pragas importantes em áreas de cultivo sucessivo, também foram observadas características de resistência em genótipos de soja. SOUZA et al. (2014)¹⁸² relataram que os genótipos PI 227687 e PI 227682 prolongaram os períodos larval, pupal e de lagarta a adulto da *S. eridania*. Esses genótipos também causaram redução no peso larval e pupal, além de diminuir a sobrevivência larval. Estudos de BOIÇA JÚNIOR et al. (2015)¹⁸⁹ indicaram que os genótipos PI 227687, PI 227682 e IAC 100 afetaram negativamente o desenvolvimento de *Spodoptera cosmioides*.

Embora a resistência de diferentes genótipos de soja a diversas lagartas seja amplamente estudada, o papel dos estágios fenológicos da planta e o impacto da indução prévia nesse mecanismo de defesa permanecem pouco explorados. Compreender como essas características influenciam a biologia das lagartas é fundamental para aprofundar o entendimento das interações planta-inseto, fornecendo bases científicas para o desenvolvimento de práticas de manejo integrado de pragas mais eficazes e sustentáveis.

3.2 – OBJETIVOS

Objetivou-se, por meio desta pesquisa, avaliar o efeito da resistência induzida em plantas de soja e dos diferentes estágios, no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* alimentada com folhas submetidas à herbivoria prévia pela mesma espécie, utilizando a variedade convencional BRS 284.

Para isso, os seguintes objetivos específicos são propostos:

- Comparar o efeito da resistência constitutiva e induzida da soja BRS 284 em função dos estágios VC, V2 e V5 nos parâmetros biológicos da *S. frugiperda*;
- Avaliar o desenvolvimento larval, pupal e do adulto de *S. frugiperda* alimentada com folíolos de soja nos estágios VC, V2 e V5, submetidas à herbivoria prévia;
- Avaliar o consumo foliar de *S. frugiperda* alimentada com folíolos de plantas de soja nos estágios VC, V2 e V5, submetidas à herbivoria prévia.

3. 3 - MATERIAL E MÉTODOS

3. 3. 1 - Bioensaio de Desenvolvimento com *Spodoptera frugiperda*

3. 3. 2 - Obtenção das Plantas e Insetos

As sementes de soja (BRS 284), fornecidas pela Empresa Di Solo Sementes, situada em São Carlos, SP, Brasil, foram semeadas de forma escalonada, visando sincronizar os estágios das plantas com as lagartas aptas para infestação. De forma que, no momento da infestação das lagartas, as plantas estivessem nos estágios VC-V1, V2-V3 e V5-R1¹⁵. Nas sementeiras, foi utilizada uma mistura de terra vegetal da Spagnhol Plantas Ornamentais, composta por carvão ativado, húmus de minhoca, casca de pinus e terra preta e areia grossa na proporção de 2:1, respectivamente.

Após a germinação, a quantidade de plântula transplantada por vaso foi estabelecida de acordo com os estágios que foram utilizados no teste: uma plântula para cada vaso plástico de 0,24 L (Nº 8) para o estágio VC-V1, enquanto duas plântulas foram transferidas para vasos de 1 L (Nº 02) destinados aos estágios V2-V3 e V5-R1. As plantas foram mantidas em casa de vegetação externa do Departamento de Botânica da UFSCar, campus São Carlos, sob condições controladas com temperatura de $27 \pm 10^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa a $70 \pm 10\%$, sendo irrigadas conforme necessário. Os vasos com as plantas de soja permaneceram nessas condições até sua utilização nos ensaios de alimentação com *S. frugiperda* (FIGURA 3.1)

FIGURA 3. 1 - Obtenção das plantas nos estágios VC, V2 e V5 para o teste de indução prévia por *S. frugiperda*.



Os ovos da espécie *S. frugiperda* foram adquiridos comercialmente da empresa Pragas.com, localizada em Piracicaba, SP, Brasil. Após a eclosão, as lagartas foram mantidas em uma incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand), com controle de temperatura de 25°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotoperíodo de 12 horas. A alimentação desses insetos foi com dieta artificial composta principalmente por farinha de feijão branco¹³⁴. Ao atingirem o terceiro instar de desenvolvimento, dois grupos de lagartas foram separados: um grupo para fazer o dano prévio nas folhas de soja, e o segundo era destinado ao ensaio biológico de alimentação com folhas previamente induzidas do grupo anterior.

Para avaliar a influência dos estágios e da herbivoria prévia em planta de soja no desenvolvimento de *S. frugiperda*, foram realizados dois experimentos simultâneos: A indução prévia em folhas de soja por lagartas de *S. frugiperda* e o bioensaio de alimentação de *S. frugiperda* com folhas de soja previamente induzidas. Esses testes foram conduzidos em março de 2024 no

laboratório de multiusuário do Departamento de Botânica da UFSCAR, campus São Carlos.

3. 3. 3 - Indução Prévia em Folhas de Soja

Antes de realizar o experimento de herbivoria prévia, as lagartas de quarto ou quinto instar de *S. frugiperda* foram submetidas a 48 horas de alimentação exclusiva com folhas de soja, a fim de se adaptarem ao tipo de alimento. Em seguida, as lagartas ficaram em jejum por 24 horas para garantir que consumissem uma quantidade significativa de órgão foliar. Após esse período sem alimentação, as lagartas foram colocadas nas folhas novas, última folha superior totalmente desenvolvida, em plantas de soja em três estágios de desenvolvimento diferentes: VC-V1, V2-V3 e V5-R1 (FIGURA 3.2).

Os folíolos que receberam as lagartas foram cobertos com sacos de organza para impedir o consumo de outra folha durante o experimento. As lagartas permaneceram nas plantas por aproximadamente 4h, nas quais consumiram, em média, 30% da área foliar. Posteriormente, as lagartas foram retiradas, e as plantas que sofreram danos causados pela herbivoria, juntamente com as plantas controle (sem danos), foram mantidas na bancada do laboratório, sob temperatura de 27°C e luz elétrica, por 24 horas, para possível indução de metabólitos. A indução foi realizada diariamente, no período das 8:00h às 13:00h, e a quantidade de planta para cada estágio foi proporcional ao consumo foliar observado no segundo experimento de bioensaio de alimentação de *S. frugiperda*.

FIGURA 3. 2 - Experimento de indução prévia em plantas de soja nos estágios VC, V2 e V5 por herbivoria de *S. frugiperda*.



3. 3. 4 - Bioensaio de Alimentação de *Spodoptera frugiperda* com Folhas de Soja Previamente Induzidas

Lagartas com oito dias após a eclosão, aproximadamente no quarto instar, com tamanho e massa semelhantes, foram submetidas a um jejum de 3 horas para limpeza do trato intestinal. Em seguida, foram pesadas novamente em uma balança analítica e individualizadas em placas de Petri de 60x15 mm para

acompanhamento de seu desenvolvimento. Para cada tratamento e estágio, utilizou-se 20 indivíduos (totalizando 120 lagartas em 6 tratamentos).

Após as primeiras 24 horas do experimento de indução prévia em folhas de soja do item anterior 3.3.3, as lagartas de *S. frugiperda* individualizadas foram alimentadas com folhas novas inteiras destacadas das plantas, tanto previamente induzidas quanto não induzidas (controle), durante todo o período larval. Optou-se por usar folíolos inteiros para padronizar uma área média para cada tratamento.

Diariamente, os excrementos eram removidos, as folhas substituídas, e algodão levemente umedecido com água destilada era adicionado. A alimentação foi interrompida quando as lagartas pararam de consumir o tecido vegetal, indicando o início da fase de pré-pupa. As pupas permaneceram nas placas de petri com umidade proporcionada (borrifamento cuidadosamente de água destilada na tampa da placa) até a emergência dos adultos.

Para cada tratamento, foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: peso ganho das lagartas no sexto dia após início do experimento, peso e sexagem de pupas com 24 horas de idade, razão sexual e a biomassa do adulto. Após o período pré-pupal, as pupas obtidas foram pesadas em uma balança de precisão e separadas por sexo.

A sexagem foi realizada com o auxílio de um microscópio (Labomed, iV5000, CZM6). Para fazer a correção das massas das pupas, a razão sexual foi calculada, pois a fêmea possui pupa maior que o macho. Essa razão foi obtida dividindo-se o número de fêmeas pelo total de indivíduos (machos + fêmeas)¹⁹².

Para determinar a biomassa do adulto, foi obtido o peso fresco dos adultos nas primeiras 24 horas de emergência. Os adultos foram então guardados em papel manteiga, congelados a -20 °C. Em seguida, foram secos em uma estufa

de circulação de ar a 45°C por 72 horas e pesados novamente em uma balança analítica.

Além dos parâmetros dos insetos, avaliamos também a área foliar consumida. Os folíolos foram fotografados antes e após 24 horas de consumo. A captura das imagens foi realizada com um smartphone, utilizando a resolução máxima e sem flash. O smartphone foi apoiado em um tripé comum e posicionado verticalmente, a uma distância média de 30 centímetros da mesa.

Na mesa, foi fixado um bloco de calibração impresso fornecido pela empresa PETIOLE, onde o foco da câmera foi ajustado e as folhas de soja foram posicionadas. A medição da área foliar foi feita através do aplicativo móvel gratuito Petiole PRO, baixado da *Play Store*, que exibiu a medida da área foliar em centímetros quadrados (cm²) com base nas folhas capturadas na foto.

3.3.5 - Análises Estatísticas

Todas as análises foram desenvolvidas com auxílio de diferentes pacotes do software R, versão 4.3.3 (R Core Team; 2024)¹⁹³, em colaboração com o professor Dr. André Rangel Nascimento (Departamento de Biologia/UFSCAR). Realizamos análises de variância para testar se há diferença entre a biomassa e área foliar consumida por *Spodoptera frugiperda*.

O experimento foi desenvolvido em forma de dois blocos de tratamentos: com e sem indução prévia de metabólitos da soja através do estímulo de herbivoria de imaturos de *S. frugiperda*; três estágios de desenvolvimento de soja, VC, V2 e V5. Para todos os testes foram verificados a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro Wilk e a homoscedasticidade das variâncias através do teste de Levene encontrado no pacote car¹⁹⁴.

Quando os pressupostos das análises foram verificados com os dados brutos, optamos por aplicar a análise de variância de dois fatores (*two way* ANOVA). Após verificação, ao observar que a distribuição dos resíduos não seguiu o padrão de normalidade e/ou de homoscedasticidade, aplicamos uma transformação de ranqueamento nos dados para se assegurar a ocorrência dos pressupostos da ANOVA ¹⁹⁵.

Se após a transformação, a normalidade e ou a homoscedasticidade não foram observadas, um teste não paramétrico de Kruskal Wallis de um fator foi aplicado separadamente para cada um dos blocos de tratamentos, indução do metabolismo e para os diferentes estágios de desenvolvimento da soja.

Os testes *poshoc* de Tukey para dados paramétricos, de Dunn para dados não paramétricos, foram calculados para se averiguar a ocorrência das interações par-a-par e as interações entre os diferentes blocos hierárquicos de tratamento.

Como variáveis respostas, especificamente testamos: peso úmido de lagarta aproximadamente no sexto da lagarta após início do experimento, peso úmido da pupa, peso seco da mariposa e área foliar total consumida durante o desenvolvimento dos imaturos.

Uma segunda série de ANOVAs de dois fatores, similar ao descrito acima, foi desenvolvida para averiguar se as diferenças encontradas não tiveram influência do dimorfismo sexual dos indivíduos de *S. frugiperda* estudados. Os valores de todos os testes estatísticos encontram-se no Apêndice (A.10 a A.18).

3. 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

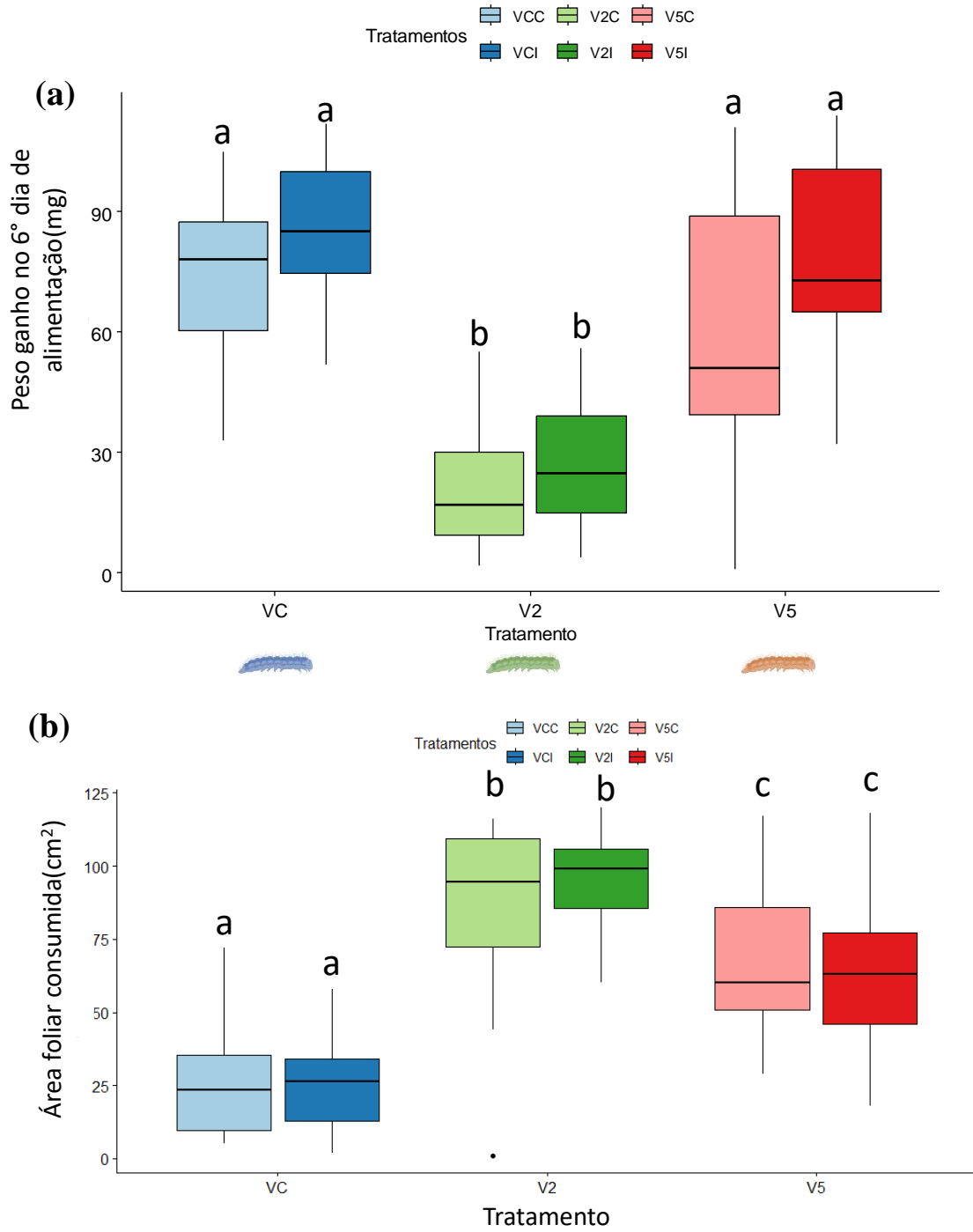
3. 4. 1 – Biologia das Lagartas de *Spodoptera frugiperda* e Consumo Foliar

A fim de avaliar a influência do estágio de desenvolvimento da planta e da indução prévia em soja sobre o desenvolvimento da lagarta *S. frugiperda*, analisamos os seguintes parâmetros: peso das lagartas, peso das pupas e peso dos adultos. Para isso, empregamos análises univariadas, abrangendo métodos paramétricos e não paramétricos.

O ganho de peso das lagartas no sexto dia de alimentação com folhas de soja previamente induzidas foi significativamente influenciado pelo estágio da planta. Entretanto, não foi observada interação significativa entre os tratamentos de controle e a indução prévia. As lagartas alimentadas com folhas de plantas no estágio V2 apresentaram menor peso corporal ($p \leq 0,05$) em comparação com aquelas alimentadas com plantas nos estágios VC e V5. Por outro lado, o peso larval das lagartas que consumiram plantas nos estágios VC e V5 foi maior e não apresentou diferença significativa entre esses dois estágios (FIGURA 3.3 (a)).

Em relação ao consumo foliar, também observou-se uma diferença significativa entre os estágios avaliados (FIGURA 3.3 (b)). As lagartas apresentaram maior consumo no estágio V2, enquanto os estágios VC e V5 o consumo foi menor para folhas desses dois estágios. Além disso, de acordo com as anotações e observações diárias, o tempo de desenvolvimento larval foi prolongado em 1,6 dias para as lagartas que se alimentaram de folhas no estágio V2, totalizando 13,6 dias. Em contrapartida, as lagartas alimentadas com folhas dos estágios VC e V5 apresentaram tempos de desenvolvimento semelhantes, com uma duração média de 12 dias.

FIGURA 3. 3 - Peso ganho das lagartas no sexto dia de alimentação com folhas de soja previamente induzidas dos estágios VC, V2 e V5 (a). Área foliar consumida das lagartas alimentadas com folhas de soja previamente induzidas dos estágios VC, V2 e V5 (b). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre e dentro dos tratamentos.



Diante desses resultados, o estágio V2 destacou-se por impactar significativamente a fase larval, reduzindo a capacidade do inseto de converter a folhagem ingerida em massa corporal. Essa redução pode estar associada a um mecanismo compensatório das lagartas, que ajustam seu comportamento alimentar para superar condições nutricionais adversas^{184,196}.

Provavelmente, essa inadequação esteja relacionada à presença de um ou mais inibidores de digestão ou à produção de metabólitos de defesa pelas plantas, que prejudicam o desenvolvimento larval^{26,197,198}. Em resposta, as lagartas necessitaram consumir maior quantidade de planta no estágio V2 para atender às suas demandas metabólicas para chegar à fase de pupa e posterior reprodução.

BORTOLI et al. (2005)¹⁹⁹, ao estudar a biologia de *A. gemmatalis* em soja e amendoim, observaram que lagartas alimentadas com folhas de amendoim apresentaram um período larval mais longo em comparação às alimentadas com soja. No entanto, apesar do maior tempo de alimentação, essas lagartas não apresentaram os maiores pesos.

De forma semelhante, PIUBELLI et al. (2005)¹⁰ investigaram a capacidade de assimilação alimentar de *A. gemmatalis* e constataram que o peso dos insetos não estava relacionado ao tempo de alimentação ou à quantidade consumida, mas à eficiência de assimilação do alimento. Assim, alimentos consumidos em menor quantidade, mas com maior facilidade de absorção, podem resultar em um aumento significativo na massa corporal.

Além disso, SOUZA et al. (2014)¹¹⁹ e WILLE et al. (2017)¹⁹⁰ analisaram diferentes genótipos de soja e relataram fortes efeitos de resistência do tipo antibiose nas plantas, que impactaram negativamente o peso larval de *Spodoptera eridania* e *Chrysodeixis includens*, respectivamente. De forma consistente, PERUCA et al. (2018)¹⁹⁸ observaram que genótipos de soja danificados por herbivoria também influenciaram na redução do peso das lagartas de *S. frugiperda*.

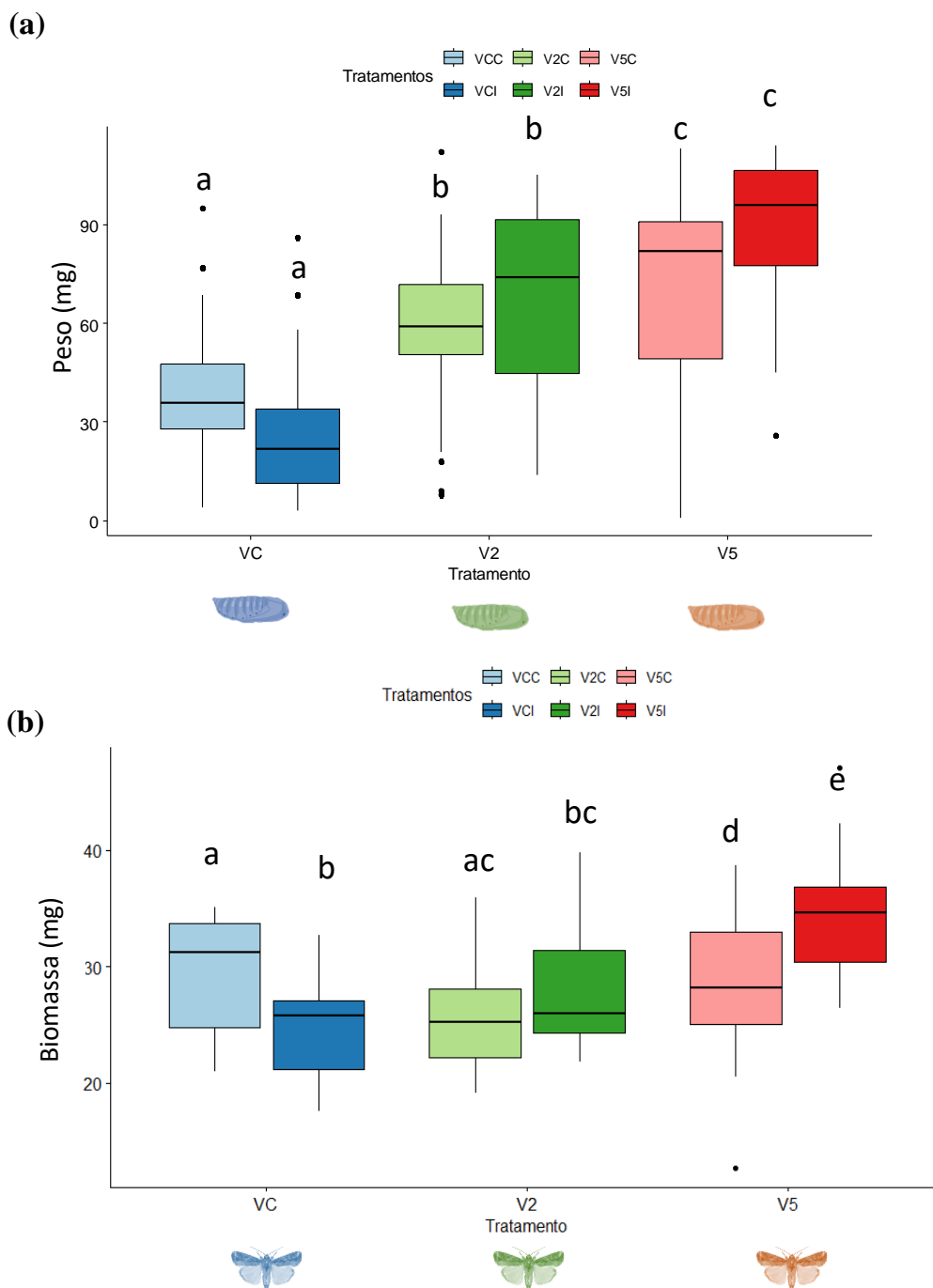
Esses efeitos, como o atraso no crescimento e a diminuição no ganho de peso das lagartas, tornam os insetos, em ambientes naturais, mais suscetíveis a fatores de mortalidade, como predação e infecção por patógenos²⁰⁰⁻²⁰².

Na fase pupal, os pesos das pupas diferiram significativamente entre os estágios de desenvolvimento da soja ($p \leq 0,05$) (FIGURA 3.4 (a)). Pupas de lagartas que se alimentaram de plantas no estágio VC apresentaram menor peso médio em comparação aos demais estágios avaliados. A indução em folhas de VC pode ter contribuído adicionalmente para a redução do peso das pupas em relação às folhas controle de VC, embora essa diferença não tenha sido significativa. Observando o peso pupal de lagartas que consumiram plantas nos estágios V2 e V5, os resultados mostraram um efeito oposto: as pupas apresentaram maior peso, e a indução prévia pode ter influenciado positivamente esse aumento.

Já em relação à biomassa dos adultos, os estágios VC e V2 mostraram maior influência sobre esse parâmetro biológico do inseto (FIGURA 3.4 (b)). Contudo, apenas a indução nas folhas de VC impactou significativamente na redução do peso das mariposas.

Adicionalmente, testes de razão sexual foram conduzidos para verificar se as variações nos pesos das lagartas, pupas e adultos estavam associadas à proporção de machos e fêmeas. Os resultados indicaram que tais diferenças não estavam relacionadas a esse parâmetro (Apêndice A.14).

FIGURA 3. 4 - Peso das pupas de lagartas alimentadas com folhas de soja previamente induzidas dos estágios VC, V2 e V5 (a). Biomassa dos adultos de lagartas alimentadas com folhas de soja previamente induzidas dos estágios VC, V2 e V5 (b). Letra diferente indica diferença significativa entre e dentro dos tratamentos.



Como observado, *S. frugiperda* que consumiram folhas de VC apresentaram maior massa larval, mas menor massa pupal e biomassa do adulto. Esses resultados podem ser atribuídos à redução na qualidade ou assimilação de nutrientes pelas lagartas durante o período larval, supostamente acumulando mais água do que energia ou biomassa.

Essa diferença é perdida durante a metamorfose, provavelmente devido à presença de inibidores de proteína ou metabólitos de defesa provenientes da soja. Esses compostos podem reduzir a biodisponibilidade de aminoácidos e prejudicar a síntese de proteínas essenciais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto^{119,184}.

No que se refere à influência da indução de defesas de planta na biologia do inseto, é plausível que compostos tóxicos, inicialmente presentes em baixa concentração no órgão vegetal, aumentem sob ataque de herbívoros. Conseqüentemente, esses compostos podem ter um impacto mais expressivo no peso das pupas e mariposas^{73,198}.

Esse mecanismo pode representar uma possível estratégia de defesa ou resistência da planta. Por exemplo, AGUIAR et al. (2022)¹³⁰ identificaram que a resistência constitutiva de determinadas variedades de soja a *Spodoptera cosmioides* pode estar associada aos níveis de lipídeos e isoflavonas presentes nas folhas. Complementarmente, BOIÇA JÚNIOR et al. (2022)⁷⁴ investigaram fenólicos, taninos, fibras e ligninas em folhas, vagens e grãos de cultivares de soja, observando que esses compostos estão correlacionados com a resistência a *Cydia virescens*.

PERUCA et al. (2018)¹⁹⁸ relataram que a herbivoria em plantas de soja induziu a produção de substâncias fenólicas, resultando em efeitos prejudiciais ao desenvolvimento de *S. frugiperda*. De forma similar, BENTIVENHA et al. (2018)²⁰ destacaram que a resistência de vários cultivares

de soja contra o percevejo *Piezodorus guildinii* está associada aos flavonoides rutina e genisteína.

Diferentes estudos mostram que esses efeitos afetam diversos parâmetros biológicos dos insetos. Por exemplo, ONGARATTO et al. (2021)¹⁸⁴ analisaram genótipos resistentes de soja e observaram redução no número de ovos postos por *A. gemmatilis* em cultivares como 'IAC 24', 'IAC 17', 'IAC 100' e 'IAC 19'. FAVETTI et al. (2015)²⁶ avaliaram a biologia de *S. eridania* em diferentes cultivares de soja e relataram variações na longevidade das fêmeas, no número e na duração do estágio do ovo.

Da mesma forma, SPECHT et al. (2016)²⁰³ estudaram o potencial reprodutivo de *S. eridania* e encontraram diferenças na fertilidade dos ovos e na longevidade dos adultos. Além disso, MENDONÇA et al. (2019)²⁷ demonstraram que inibidores de protease de plantas de soja podem causar atrasos no desenvolvimento larval e redução do peso pré-pupal de *A. gemmatilis*.

Curiosamente, lagartas alimentadas com folhas no estágio V2 apresentaram menor peso na fase larval, mas as pupas resultantes exibiram maior biomassa. Esse fenômeno pode ser resultado de um mecanismo de adaptação do inseto a condições adversas, por meio de uma estratégia compensatória que redireciona recursos energéticos para o acúmulo de lipídios e proteínas, priorizando a formação de reservas essenciais e favorecendo o desenvolvimento de uma pupa mais robusta ^{123,204–206}.

No capítulo anterior, analisamos a indução de metabólitos em folhas de diferentes idades e estágios da soja BRS 284 após o dano causado pela *S. frugiperda*. Observamos que os metabolitos mais induzidos, pertencem, predominantemente, ao grupo das oxilipinas, seguidos pelos terpenos. As oxilipinas constituem um amplo grupo de ácidos graxos oxidados e seus conjugados, derivados principalmente de ácidos graxos poliinsaturados, como ácido linolênico e ácido linoleico.

A importância das oxilipinas na defesa contra herbívoros foi evidenciada por YUAN et al. (2023)⁸⁶, que realizaram um ensaio de alimentação com lagartas de *S. frugiperda* utilizando uma dieta artificial enriquecida com 9,10-KODA, um derivado de oxilipina. Os resultados revelaram que esse composto apresentou atividade inseticida moderada, retardando significativamente o crescimento das lagartas em comparação com aquelas alimentadas com uma dieta sem adição de 9,10-KODA.

Adicionalmente, evidências na literatura destacam que metabólitos relacionados à biossíntese do ácido linolênico têm demonstrado atividade como fitoalexinas em outras culturas, como o milho. Esses compostos foram capazes de suprimir o crescimento de fungos e herbívoros, incluindo *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Helicoverpa zea*²⁰⁷⁻²⁰⁹.

Baseando-nos nesses resultados, verificamos que os estágios VC e V2 apresentaram uma resposta metabólica mais robusta ao estresse, enquanto o estágio V5 demonstrou ser menos responsivo à herbivoria, considerando seu perfil metabólico. Os estágios VC e V2, que mais impactaram o desenvolvimento de *S. frugiperda*, foram os mesmos que exibiram maior resposta de indução metabólica.

Essa relação pode estar ligada ao estágio de desenvolvimento da planta, uma vez que VC e V2 correspondem a fases iniciais e críticas para o crescimento e o desempenho da soja ao longo de seu ciclo de vida. Nessas etapas, as plantas parecem priorizar estratégias de defesa mais robustas, como a produção de metabólitos tóxicos e a indução de respostas defensivas em reação à herbivoria. Essa dinâmica pode configurar estratégia importante de resistência da soja.

Dessa forma, os estágios VC e V2 demonstraram resistência do tipo antibiose sobre os parâmetros biológicos de *S. frugiperda*, interferindo no desenvolvimento do inseto em distintas etapas do ciclo. Em contrapartida, o

estágio V5 da soja e a indução prévia de herbivoria impactaram menos nas fases de desenvolvimento do inseto.

Com base no cenário observado, sugere-se que o estágio V5 priorize uma estratégia de tolerância em vez de antibiose, uma vez que se mostrou mais suscetível ao ataque de *S. frugiperda*, permitindo o desenvolvimento adequado da praga sem alterações significativas em seu ciclo. Por estar próximo da transição para o estágio reprodutivo, o estágio V5 pode apresentar uma realocação metabólica que favorece os processos reprodutivos em detrimento das defesas^{64,178}. No entanto, para comprovar essa hipótese, seria necessário avaliar o impacto da herbivoria na aptidão da planta em cada estágio, medindo parâmetros como biomassa, quantidade e viabilidade das sementes após o ataque em cada fase.

Portanto, a indução prévia parece ter pouca influência na biologia da *S. frugiperda*, sendo o estágio da planta o principal fator determinante. Isso pode indicar que essa cultivar não apresenta muitas defesas induzidas ou que, ao retirar as folhas da planta e oferecê-las separadamente em uma placa de Petri, os resultados foram influenciados. Isso pode ter ocorrido porque todas as folhas estavam induzidas de maneira semelhante ou porque a retirada das folhas interrompeu a comunicação com o restante da planta.

Outra hipótese é que a resposta sistêmica de indução pode ser mais pronunciada em folhas mais distantes do local do dano, como nas folhas mais velhas. No entanto, devido à limitação de órgãos vegetais mais velhos no estágio VC, como os cotilédones (que são menores e mais espessos), não foi possível avaliar sob esse aspecto.

Outros fatores, como o grande número de plantas e insetos envolvidos, além da gestão do tempo de indução, também representaram desafios que limitaram a análise. Estudos futuros podem considerar abordagens alternativas, como a análise de folhas mais velhas e das folhas distantes

especialmente, ou a avaliação da indução diretamente na planta intacta, a fim de proporcionar uma compreensão mais aprofundada desse processo.

Os resultados apresentados destacam a relevância de entender as interações entre diferentes estágios de desenvolvimento da planta de soja, a indução de defesas químicas e seus efeitos na biologia de insetos-praga, como *S. frugiperda*.

3.5 - CONCLUSÕES

O desenvolvimento de *S. frugiperda* é fortemente influenciado pelo estágio de desenvolvimento da planta, enquanto a indução prévia tendo pouco efeito sobre a lagarta. Embora os diferentes estágios e indução não tenham causado mortalidade nas lagartas, eles exerceram efeitos significativos em todo ciclo de vida deste inseto.

Os estágios VC e V2 demonstraram ter um impacto expressivo no desenvolvimento de *S. frugiperda*: no estágio VC, houve redução significativa no peso das pupas e dos adultos, enquanto no estágio V2, a massa larval e do adulto foi significativamente reduzida. Por outro lado, o estágio V5 mostrou-se mais suscetível, resultando em maior massa das lagartas, pupas e adultos em comparação aos outros grupos testados.

Em síntese, a indução prévia parece ter uma influência limitada na biologia de *S. frugiperda*, com o estágio da planta sendo o fator mais determinante. Isso sugere que esta cultivar pode não apresentar defesas induzidas de maneira significativa. Outra possibilidade é que a resposta de indução tenha sido mais pronunciada em folhas distantes do local do dano, como nas folhas mais velhas.

Esses resultados reforçam a importância do conhecimento sobre os estágios de desenvolvimento da planta em que a expressão dos mecanismos de resistência por antibiose é mais pronunciada. Tal informação é essencial para aprimorar as estratégias de manejo integrado de pragas, auxiliando na determinação do momento ideal para intervenções e na redução da dependência de produtos químicos, promovendo práticas agrícolas mais sustentáveis.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresentou avanços significativos no entendimento das respostas metabólicas de soja (*Glycine max*) frente à herbivoria por *Spodoptera frugiperda*. A aplicação da abordagem metabolômica não direcionada permitiu determinar e anotar uma diversidade de metabólitos pertencentes a diferentes classes químicas, fornecendo uma visão abrangente das alterações metabólicas pela herbivoria nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta (VC, V2 e V5).

Os resultados evidenciam que a planta adota estratégias específicas de alocação de recursos, priorizando a defesa em fases críticas do seu ciclo de vida. Entre os estágios vegetativos analisados, VC e V2 destacaram-se como os mais responsivos ao estresse causado pela herbivoria, apresentando alterações metabólicas expressivas. Esses estágios também exerceram maior impacto no desenvolvimento de *S. frugiperda*, com reduções significativas nos pesos larval, pupal e no adulto. Em contrapartida, o estágio V5 parece ser mais suscetível, apresentando menor capacidade de indução metabólica e permitindo o desenvolvimento mais favorável das lagartas.

A análise detalhada da dinâmica de indução e alocação de metabólitos primários e secundários em resposta à herbivoria reforça a importância de estratégias baseadas no manejo integrado de pragas. Os achados deste trabalho destacam a relevância de considerar os estágios fenológicos da planta na formulação de práticas de controle, contribuindo para a redução do uso de produtos químicos e promovendo uma agricultura mais eficiente e sustentável.

Essas descobertas ampliam o conhecimento sobre as interações planta-inseto e oferecem subsídios valiosos para o desenvolvimento de estratégias que equilibrem produtividade agrícola e sustentabilidade ambiental.

CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIA

1. Yun, D. Y., Kang, Y. G., Kim, M., Kim, D., Kim, E. H., Hong, Y. S. “Metabotyping of different soybean genotypes and distinct metabolism in their seeds and leaves”. *Food Chem* **330**, 127198 (2020).
2. Michereff, M. F. F., Borges, M., Laumann, R. A., Daniel, D., do Lago, C. L., Blassioli-Moraes, M. C. “The influence of resistant soybean cultivars on the biological development of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)”. *J Plant Interact* **14**, 544–551 (2019).
3. Colletti, A., Attrovio, A., Boffa, L., Mantegna, S., Cravotto, G. “Valorisation of By-Products from Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Processing”. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 2129 **25**, 2129 (2020).
4. Feng, Z., Ding, C., Li, W., Wang, D., Cui, D. “Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress”. *Food Chem* **310**, 125914 (2020).
5. CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de Safra Brasileira de Grãos. “Primeiro levantamento da safra 2023/24 traz uma estimativa de produção de 317,5 milhões de toneladas”. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5211-primeiro-levantamento-da-safra-2023-24-traz-uma-estimativa-de-producao-de-317-5-milhoes-de-toneladas>> (2024).
6. Kerchev, P. I., Fenton, B., Foyer, C. H., Hancock, R. D. “Plant responses to insect herbivory: Interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways”. *Plant Cell Environ* **35**, 441-453 (2012).
7. Wang, Y., Wang, H., Ma, Y., Yang, W., Yang, Q., Yu, D. “Identification of soybean herbivory-regulated genes and a transgenic investigation of their potential in insect resistance”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **123**, 321-340 (2015).
8. Barros, E. M., Torres, J. B., Ruberson, J. R., Oliveira, M. D. “Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton”. *Entomol Exp Appl* **137**, 237–245 (2010).
9. Piubelli, G. C., Moscardi, F., Hoffmann-campo, C. B. “Interactions among insect-resistant soybean genotypes extracts with populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) susceptible and resistant to its nucleopolyhedrovirus”. **81**, 861–871 (2009).

10. Piubelli, G. C., Hoffmann-Campo, C. B., Moscardi, F., Miyakubo, S. H., Neves De Oliveira, M. C. “Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*?”. *J Chem Ecol* **31**, 1509–1525 (2005).
11. War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H. C. “Mechanisms of plant defense against insect herbivores”. *Plant Signal Behav* **7**, 1306–1320 (2012).
12. Ratnaparkhe, M. B., Singh, R. J., Doyle, J. J. “Glycine.” *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Legume Crops and Forages* 83-116 (2011). doi:10.1007/978-3-642-14387-8_5
13. Tejo, D. P., Fernandes, C. H. S., Buratto, J. S. “Soja: fenologia, morfologia e fatores que interferem na produtividade”, Revista Científica Eletrônica da XIX da FAEF. **35**, n.1. (2019).
14. Wille, P. E. “Subsídios para o manejo integrado de *Chrysodeixis includens* (walker) (Lepidoptera: Noctuidae) em soja para as regiões do planalto Sul e Meio Oeste de Santa Catarina. (2016).
15. Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T., Pennington, J. S. “Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill”. *Crop Sci* **11**, 929–931 (1971).
16. Souza, H. B. S. Tipos e graus de resistência de genótipos de soja a *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae)”. (2011).
17. Ferreira, S. C. de C., Leite, R. M. V. B. de C., Oliveira, F. A. de. “XXX Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil Promoção Realização”. EMBRAPA (2008). Disponível em:<www.cnpso.embrapa.br>
18. Hirakuri, M. M. “Avaliação dos impactos de tecnologias geradas pela Embrapa”. EMBRAPA (2019).
19. Boregas, K. G. B., Mendes, S. M., Waquil, J. M., Fernandes, G. W. “Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos”. *Bragantia* **72**, 61–70 (2013).
20. Bentivenha, J. P. F., Canassa, V. F., Baldin, E. L. L., Borguini, M. G., Lima, G. P. P., Lourenção, A. L. “Role of the rutin and genistein flavonoids in soybean resistance to *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae)”. *Arthropod Plant Interact* **12**, 311–320 (2018).
21. Romero, B., Dillon, F. M., Zavala, J. A. “Different soybean cultivars respond differentially to damage in a herbivore-specific manner and

- decreas herbivore performance”. *Arthropod Plant Interact* **14**, 89–99 (2020).
22. Bel, Y., Zack, M., Narva, K., Escriche, B. “Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ea toxin, and Cry1Ac and Cry1Fa competition analyses in *Anticarsia gemmatalis* and *Chrysodeixis includens*”. *Scientific Reports* **2019 9:1 9**, 1–7 (2019).
 23. Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R. J., Dourado, P. M., Crivellari, A., Carvalho, R. A., Willse, A., Martinelli, S., Head, G. P. “Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil”. *Pest Manag Sci* **72**, 1727–1736 (2016).
 24. Chung, S. H., Felton, G. W. “Specificity of induced resistance in tomato against specialist lepidopteran and coleopteran species”. *J Chem Ecol* **37**, 378–386 (2011).
 25. Gong, B., Zhang, G. “Interactions between plants and herbivores: A review of plant defense”. *Acta Ecologica Sinica* **34**, 325–336 (2014).
 26. Favetti, B. M., Butnariu, A. R., Foerster, L. A. “Biology and reproductive capacity of *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera, Noctuidae) in different soybean cultivars”. *Rev Bras Entomol* **59**, 89-95 (2015).
 27. Mendonça, E. G., de Almeida Barros, R., Cordeiro, G., da Silva, C. R., Campos, W. G., de Oliveira, J. A., de Almeida Oliveira, M. G. “Larval development and proteolytic activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to different soybean protease inhibitors”. *Arch Insect Biochem Physiol* **103**, (2020).
 28. De Freitas Bueno, R. C. O., De Freitas Bueno, A., Moscardi, F., Postali Parra, J. R., Hoffmann-Campo, C. B. “Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions”. *Pest Manag Sci* **67**, 170–174 (2011).
 29. Bernardi, O., Sorgatto, R. J., Barbosa, A. D., Domingues, F. A., Dourado, P. M., Carvalho, R. A., Martinelli, S., Head, G. P., Omoto, C. “Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein”. *Crop Protection* **58**, 33–40 (2014).
 30. Gordy, J. W., Leonard, B. R., Blouin, D., Davis, J. A., Stout, M. J. “Comparative Effectiveness of Potential Elicitors of Plant Resistance against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in Four Crop Plants”. *PLoS One* **10**, (2015).

31. Formentini, A. C., Sosa-Gómez, D. R., de Paula-Moraes, S. V., de Barros, N. M., Specht, A. “Lepidoptera (Insecta) associated with soybean in Argentina, Brazil, Chile and Uruguay”. *Ciencia Rural* **45**, 2113–2120 (2015).
32. Cruz, I., Figueiredo, M. de L. C., Silva, R. B. da, Silva, I. F, Paula, C. de Souza, Foster, J. E. “Using Sex Pheromone Traps in the Decision-Making Process for Pesticide Application against Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda* [Smith] Lepidoptera: Noctuidae) Larvae in Maize”. *International Journal of Pest Management* **530**, 83–90 (2012).
33. Montezano, D. G., Specht, A., Ricardo Sosa-Gómez, D., Roque-Specht, V. F., Carlos Sousa-Silva, J., Ricardo, D., Carlos, J., de, S. V. “Host Plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas”. *African Entomology* **26**, 286–300 (2018).
34. Capinera, J. L. “Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)”. *Introduction and Distribution*. (1999). at <<http://creatures.ifas.ufl.edu>>
35. Early, R., González-Moreno, P., Murphy, S. T., Day, R. “Forecasting the global extent of invasion of the cereal pest *Spodoptera frugiperda*, the fall armyworm”. *NeoBiota* **40**, 25–50 (2018).
36. Barros, E. M., Torres, J. B., Bueno, A. F. “Oviposition, Development, and Reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Fed on Different Hosts of Economic Importance”. *Neotrop Entomol* **39**, 996–1001 (2010).
37. Kenis, M., Benelli, G., Biondi, A., Calatayud, P.-A., Day, R., Desneux, N., Harrison, R. D., Kriticos, D., Rwomushana, I., van den Berg, J., Verheggen, F., Zhang, Y.-J., Koku Agboyi, L., Besmer Ahissou, R., Ba, M. N., Bernal, J., de Freitas Bueno, A., Carrière, Y., Andrade Carvalho, G., Chen, X.-X., Cicero, L., du Plessis, H., Early, R., Fallet, P., M Fiaboe, K. K., Firake, D. M., Goergen, G., Groot, A. T., C Guedes, R. N., Gupta, A., Hu, G., Huang, F., Jaber, L. R., Malo, E. A., McCarthy, C. B., Meagher, R. L., Mohamed, S., Mota Sanchez, D., Nagoshi, R. N., Nègre, N., Niassy, S., Ota, N., Nyamukondiwa, C., Omoto, C., Reddy Palli, S., Pavela, R., Ramirez-Romero, R., Rojas, J. C., Subramanian, S., Tabashnik, B. E., Tek Tay, W., Gabriel Virla, E., Wang, S., Williams, T., Zang, L.-S., Zhang, L., Wu, K., Generalis, E. “Invasiveness, biology, ecology, and management of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*”. *Entomologia Generalis* (2022).

38. Wan, J., Huang, C., LI, C. You, Zhou, H. xu, Ren, Y. lin, Li, Z. Yuan, Xing, L. Sheng, Zhang, B., Qiao, X., Liu, B., Liu, C. Hui, Xi, Y., Liu, W. Xue, Wang, W. Kai, Qian, W. Qiang, Mckirdy, S., Wan, F. Hao. “Biology, invasion and management of the agricultural invader: Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)”. *J Integr Agric* **20**, 646–663 (2021).
39. Ayra-Pardo, C., Borrás-Hidalgo, O. “Fall Armyworm (FAW; Lepidoptera: Noctuidae): Moth oviposition and crop protection”. *Olfactory Concepts of Insect Control-Alternative to insecticides* 93-116 (2019).
40. Cruz, I. “A lagarta-do-cartucho na cultura do milho”. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS (1995).
41. Bora, D., Montezano, G., Specht, A., Sosa-Gó, D. R., Ferreira Roque-Specht, V., Monteiro De Barros, N. “Immature stages of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae): developmental parameters and host plants”. *J. Insect Sci* **14**, (2014).
42. Mello Da Silva, D., De Freitas Bueno, A., Andrade, K., Dos, C., Stecca, S., Oliveira, P. M., Neves, J., Neves De Oliveira, M. C. “Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on”. *Sci. Agric. v* **74**, 18-31 (2016).
43. Rojas, J. C., Kolomiets, M. V., Bernal, J. S. “Nonsensical choices? Fall armyworm moths choose seemingly best or worst hosts for their larvae, but neonate larvae make their own choices”. *PLoS One* **13** (2018).
44. Cook, D. R., Leonard, B. R., Gore, J. “Field and laboratory performance of novel insecticides against armyworms (Lepidoptera: Noctuidae)”. *Florida Entomol.* 87: 433-439 (2004).
45. Leigh, T. F., Roach, S. H., Watson, T. F. “Biology and ecology of important insect and mite pests of cotton”. (1996).
46. Peruca, R. D., Coelho, R. G., da Silva, G. G., Pistori, H., Ravaglia, L. M., Roel, A. R., Alcantara, G. B. ‘Impacts of soybean-induced defenses on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) development”. *Arthropod Plant Interact* **12**, 257-266 (2018).
47. Godoy, D. N., Pretto, V. E., Weschenfelder, M. A. G., de Almeida, P. G., Wendt, A. de F., Palharini, R. B., Reis, A. C., Horikoshi, R. J., Dourado, P. M., Martinelli, S., Head, G. P. , Bernardi, O. “Managing *spodoptera* species (Lepidoptera: Noctuidae) found in Brazilian soybean fields with *Bt* Soybean and Insecticides”. *Agronomy* **12**, 2864 (2022).

48. Aoyama, E. M., Labinas, A. M. “Características estruturais das plantas contra a herbivoria por insetos”. *Enciclopédia Biosfera* **8**, 365-386 (2012).
49. Gatehouse, J. A. “Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction”. *New Phytologist* **156**, 145-169 (2002).
50. Ferry, N., Edwards, M. G., Gatehouse, J. A., Gatehouse, A. M. R. “Plant-insect interactions: Molecular approaches to insect resistance”. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 155–161 (2004).
51. Nishida, R. “Chemical ecology of insect-plant interactions: ecological significance of plant secondary metabolites”. *Biosci Biotechnol Biochem* **78**, 1-13 (2014).
52. Erb, M., Reymond, P. “Molecular interactions between plants and insect herbivores”. *Annu Rev Plant Biol* **70**, 527-557 (2019).
53. Isah, T. “Stress and defense responses in plant secondary metabolites production”. *Biol Res* **52**, 39 (2019).
54. Singh, S., Kaur, I., Kariyat, R. “The multifunctional roles of polyphenols in plant-herbivore interactions”. *Int J Mol Sci* **22**, 1442 (2021).
55. Hanley, M. E., Lamont, B. B., Fairbanks, M. M., Rafferty, C. M. “Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence”. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* **8**, 157–178 (2007).
56. Woodard, A. M., Ervin, G. N., Marsico, T. D. “Host plant defense signaling in response to a coevolved herbivore combats introduced herbivore attack”. *Ecol Evol* **2**, 1056–1064 (2012).
57. Vilela, A. A., Torezan-Silingardi, H. M., Del-Claro, K. “Conditional outcomes in ant–plant-herbivore interactions influenced by sequential flowering”. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **209**, 359–366 (2014).
58. Alba, J. M., Glas, J. J., Schimmel, B. C. J., Kant, M. R. “Avoidance and suppression of plant defenses by herbivores and pathogens”. *J Plant Interact* **6**, 221–227 (2011).
59. Lopes, A. P. S., Diniz, I. R., Moraes, M. C. B., Borges, M., Laumann, R. A. “Defesas induzidas por herbivoria e interações específicas no sistema tritrófico soja-percevejos-parasitoides de ovos”. *Pesqui Agropecu Bras* **47**, 875–878 (2012).
60. Aljbory, Z., Chen, M. “Indirect plant defense against insect herbivores: a review”. *Insect Sci* **25**, 2–23 (2018).
61. War, A. R., Taggar, G. K., Hussain, B., Taggar, M. S., Nair, R. M., Sharma, H. C. “Special Issue: Using non-model systems to explore plant-

- pollinator and plant-herbivore interactions: Plant defence against herbivory and insect adaptations”. *AoB Plants* **10** (2018).
62. Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., Bak, S. “Plant defense against insect herbivores”. *Int J Mol Sci* **14**, (2013).
 63. Yang, J., Ma, C., Jia, R., Zhang, H., Zhao, Y., Yue, H., Li, H., Jiang, X. “Different responses of two maize cultivars to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infestation provide insights into their differences in resistance”. *Front Plant Sci* **14**, 1065891 (2023).
 64. Cipollini, D., Walters, D., Voelckel, C. “Costs of Resistance in Plants: From Theory to Evidence”. *Annual Plant Reviews online* **47**, 263-307 (2017).
 65. Agrawal, A. A., Petschenka, G., Bingham, R. A., Weber, M. G., Rasmann, S. “Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant–herbivore interactions”. *New Phytologist* **194**, 28-45 (2012).
 66. Gols, R. “Direct and indirect chemical defences against insects in a multitrophic framework”. *Plant Cell Environ* **37**, 1741-1752 (2014).
 67. Zhou, S., Lou, Y., Tzin, V., Jander, G. “Alteration of plant primary metabolism in response to insect herbivory”. **169**, 1488-1498 (2015).
 68. Boege, K., Marquis, R. J. “Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants”. *Trends Ecol Evol* **20**, 441-448 (2005).
 69. Pichersky, E., Lewinsohn, E. “Convergent evolution in plant specialized metabolism”. *Annu Rev Plant Biol* **62**, 549–566 (2011).
 70. Costa, J. O. “Perfil químico e dinâmica espacial e temporal de flavonoides de soja [*Glycine max* (L.) Merr.]”. (2021).
 71. Hoffmann-Campo, C. B., Harborne, J. B., McCaffery, A. R. “Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth”. *Entomol Exp Appl* **98**, 181–194 (2001).
 72. Silva, T. R. F. B., Almeida, A. C. de S., Moura, T. de L., da Silva, A. R., Freitas, S. de S., Jesus, F. G. Efeito do flavonoide rutina na biologia de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Sci Agron* **38**, 165–170 (2016).
 73. Bortoli, S. A. De, Murata, A. T., Vacari, A. M., Bortoli, C. P. De, Ramalho, D. G. “Herbivoria em soja: efeito na composição química das folhas e na biologia da lagarta da soja e do percevejo verde pequeno”. *Comunicata Scientiae* **3**, 1921-98 (2012).
 74. Boiça Júnior, A. L., Eduardo, W. I., de Souza, B. H. S., de Moraes, R. F. O., Louvandini, H., Barbosa, J. C., Stout, M. J. “Protocol for assessing

- soybean antibiosis to *Chloridea virescens*". *Entomol Exp Appl* **170**, 689–699 (2022).
75. Rostás, M., Eggert, K. "Ontogenetic and spatio-temporal patterns of induced volatiles in *Glycine max* in the light of the optimal defence hypothesis". *Chemoecology* **18**, 29-38 (2008).
 76. Kim, S.-Y., Kim, S. Y., Lee, S. M., Lee, D. Y., Shin, B. K., Kang, D. J., Choi, H.-K., Kim, Y.-S. "Discrimination of cultivated regions of soybeans (*Glycine max*) based on multivariate data analysis of volatile metabolite Profiles". *Molecules* **25**, 763 (2020).
 77. Strapasson, P., Pinto-Zevallos, D. M., Zarbin, P. H. G. "Soybean (*Glycine max*) plants genetically modified to express resistance to glyphosate: can they modify airborne signals in tritrophic interactions?" *Chemoecology* **26**, 7–14 (2016).
 78. Song, J., Lee, G., Jung, J., Moon, J.-K., Kim, S.-G. "Effect of soybean volatiles on the behavior of the bean bug, *Riptortus pedestris*". *J Chem Ecol* **48**, 207–218 (2022).
 79. Strapasson, P., Pinto-Zevallos, D. M., Da Silva Gomes, S. M., Zarbin, P. H. G. "Volatile organic compounds induced by herbivory of the soybean looper *Chrysodeixis includens* in transgenic glyphosate-resistant soybean and the behavioral effect on the parasitoid, *Meteorus rubens*". *J Chem Ecol* **42**, 806–813 (2016).
 80. Strapasson, P., Pinto-Zevallos, D. M., Zarbin, P. H. G. "Soybean (*Glycine max*) plants genetically modified to express resistance to glyphosate: can they modify airborne signals in tritrophic interactions?" *Chemoecology* **26**, 7–14 (2016).
 81. Wan, N.-F., Deng, J.-Y., Huang, K.-H., Ji, X.-Y., Zhang, H., Jiang, J.-X., Li, B. "Nucleopolyhedrovirus infection enhances plant defences by increasing plant volatile diversity". *Biocontrol Sci Technol* **27**, 1292–1307 (2017).
 82. Pilon, A. M., Campos, W. G., Silva, C. R., Cordeiro, G., Silva, C. R., Oliveira, M. G. A. "Protease inhibitory, insecticidal and deterrent effects of the trypsin-inhibitor benzamidine on the velvetbean caterpillar in soybean". *An Acad Bras Cienc* **90**, 3475–3482 (2018).
 83. Paixão, G. P., Lourenção, A. L., Silva, C. R., Mendonça, E. G., Silva, P. L., Oliveira, J. A., Zanuncio, J. C., Oliveira, M. G. A. "Biochemical responses of *anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars

- sprayed with the protease inhibitor berenil”. *J Agric Food Chem* **61**, 8034–8038 (2013).
84. Patarroyo-Vargas, A. M., Merino-Cabrera, Y. B., Zanuncio, J. C., Rocha, F., Campos, W. G., de Almeida Oliveira, M. G. “Kinetic characterization of *Anticarsia gemmatalis* digestive serine- proteases and the inhibitory effect of synthetic peptides”. *Protein Pept Lett* **24**, (2017).
 85. Babenko, L. M., Shcherbatiuk, M. M., Skaterna, T. D., Kosakivska, I. V. “Lipoxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance”. *Ukr Biochem J* **89**, 5–21 (2017).
 86. Yuan, P., Borrego, E., Park, Y. S., Gorman, Z., Huang, P. C., Tolley, J., Christensen, S. A., Blanford, J., Kilaru, A., Meeley, R., Koiwa, H., Vidal, S., Huffaker, A., Schmelz, E., Kolomiets, M. V. “9,10-KODA, an α -ketol produced by the tonoplast-localized 9-lipoxygenase ZmLOX5, plays a signaling role in maize defense against insect herbivory”. *Mol Plant* **16**, 1283–1303 (2023).
 87. Felton, G. W., Bi, J. L., Summers, C. B., Mueller, A. J., Duffey, S. S. “Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory”. *J Chem Ecol* **20**, 651–666 (1994).
 88. Singh, P., Arif, Y., Mischczuk, E., Bajguz, A., Hayat, S. “Specific roles of lipoxygenases in development and responses to stress in plants”. *Plants* **11**, 979 (2022).
 89. Kanwal, B., Tanwir, S., Ahmad, F., Ahmad, J. N. “Jasmonic acid and salicylic acid improved resistance against *Spodoptera frugiperda* infestation in maize by modulating growth and regulating redox homeostasis”. *Sci Rep* **14**, (2024).
 90. Kumari, M., Yagnik, K. N., Gupta, V., Singh, I. K., Gupta, R., Verma, P. K., Singh, A. “Metabolomics-driven investigation of plant defense response against pest and pathogen attack”. *Physiol Plant* **176**, e14270 (2024).
 91. Kang, W., Zhu, X., Wang, Y., Chen, L., Duan, Y. “Transcriptomic and metabolomic analyses reveal that bacteria promote plant defense during infection of soybean cyst nematode in soybean”. *BMC Plant Biol* **18**, 1–14 (2018).
 92. Chaudhary, J., Deshmukh, R., Mir, Z. A., Bhat, J. A. “Metabolomics: an emerging technology for soybean improvement”. In: *Khoobchandani, M., Saxena, A. (eds) Biotechnology Products in Everyday Life. EcoProduction. Springer, Cham* (2019).

92. Allwood, J. W., Ellis, D. I., Goodacre, R. “Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions”. *Physiol Plant* **132**, 117–135 (2008).
94. Kellogg, J., Kang, S. “Metabolomics, an essential tool in exploring and harnessing microbial chemical ecology”. *Phytobiomes J* **4**, 195–210 (2020).
95. Sharma, K., Sarma, S., Bohra, A., Mitra, A., Sharma, N. K., Kumar, A., Sharma, K., Sarma, S., Bohra, A., Mitra, A., Sharma, N. K., Kumar, A. “Plant metabolomics: an emerging technology for crop improvement”. *New Visions in Plant Science* (2018).
97. Allwood, J. W., Williams, A., Uthe, H., van Dam, N. M., Luis, L. A. J., Grant, M. R., Pétriacq, P. “Unravelling plant responses to stress-the importance of targeted and untargeted metabolomics”. *Metabolites* **11**, (2021).
98. David, A., Rostkowski, P. “Analytical techniques in metabolomics”. *Environmental Metabolomics: Applications in field and laboratory studies to understand from exposome to metabolome* 35-64 (2020).
99. Gao, H., Zhou, Q., Yang, L., Zhang, K., Ma, Y., Xu, Z. Q. “Metabolomics analysis identifies metabolites associated with systemic acquired resistance in Arabidopsis”. *PeerJ* **8**, e10047 (2020).
100. Castro-Moretti, F. R., Gentzel, I. N., Mackey, D., Alonso, A. P. “Metabolomics as an emerging tool for the study of plant–pathogen interactions”. *Metabolites* **10**, 52 (2020).
101. Hazrati, H., Kudsk, P., Ding, L., Uthe, H., Fomsgaard, I. S. “Integrated LC-MS and GC-MS-Based metabolomics reveal the effects of plant competition on the rye metabolome”. *J Agric Food Chem* **70**, 3056–3066 (2022).
102. Zhang, N., Tan, W., Luo, G., Pu, T., Wang, J., Zhang, X., Song, Y. “Untargeted metabolite profiling of camellia tetracocca’s response to an *Empoasca onukii* attack using GC-MS and LC-MS”. *Agronomy* **13**, 791 (2023).
103. Oh, M., Park, S., Kim, H., Choi, G. J., Kim, S. H. “Application of UPLC-QTOF-MS based untargeted metabolomics in identification of metabolites induced in pathogen-infected rice”. *Plants 2021, Vol. 10, Page 213* **10**, 213 (2021).
104. Aszyk, J., Byliński, H., Namieśnik, J., Kot-Wasik, A. “Main strategies, analytical trends and challenges in LC-MS and ambient mass spectrometry-

- based metabolomics”. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **108**, 278–295 (2018).
105. Razzaq, A., Wishart, D. S., Wani, S. H., Hameed, M. K., Mubin, M., Saleem, F. “Advances in metabolomics-driven diagnostic breeding and crop improvement”. *Metabolites* **12**, 511 (2022).
 106. Jansen, J. J., Allwood, J. W., Marsden-Edwards, E., van der Putten, W. H., Goodacre, R., van Dam, N. M. “Metabolomic analysis of the interaction between plants and herbivores”. *Metabolomics* **5**, 150–161 (2009).
 107. Zhu, L., Zhou, Y., Li, X., Zhao, J., Guo, N., Xing, H. “Metabolomics analysis of soybean hypocotyls in response to *phytophthora sojae* infection”. *Front Plant Sci* **871**, 374061 (2018).
 108. Yousefi-Taemeh, M., Lin, J., Ifa, D. R., Parrott, W., Kovinich, N. “Metabolomics differences of *Glycine max* QTLs resistant to soybean looper”. *Metabolites* **11**, 710 (2021).
 109. Prochaska, T. J., Donze-Reiner, T., Marchi-Werle, L., Palmer, N. A., Hunt, T. E., Sarath, G., Heng-Moss, T. “Transcriptional responses of tolerant and susceptible soybeans to soybean aphid (*Aphis glycines* Matsumura) herbivory”. *Arthropod Plant Interact* **9**, 347–359 (2015).
 110. Enders, L., Bickel, R., Brisson, J., Heng-Moss, T., Siegfried, B., Zera, A., Miller, N. “Soybean aphid (Hemiptera: Aphididae) response to soybean plant defense: stress levels, tradeoffs, and cross-virulence”. *Environ Entomol* **43**, 47–57 (2014).
 111. Li, Y., Zou, J., Li, M., Bilgin, D. D., Vodkin, L. O., Hartman, G. L., Clough, S. J. “Soybean defense responses to the soybean aphid”. *New Phytologist* **179**, 185–195 (2008).
 112. Underwood, N. C. “The timing of induced resistance and induced susceptibility in the soybean-Mexican bean beetle system”. *Oecologia* **114**, 376–381 (1998).
 113. Adigun, O. A., Pham, T. H., Grapov, D., Nadeem, M., Jewell, L. E., Cheema, M., Galagedara, L., Thomas, R. “Phyto-oxylin mediated plant immune response to colonization and infection in the soybean-*Phytophthora sojae* pathosystem”. *Front Plant Sci* **14**, 1141823 (2023).
 114. Sanchez-Acos, C., Kai, M., Svatoš, A., Gershenzon, J., Kunert, G. “Untargeted metabolomics approach reveals differences in host plant chemistry before and after infestation with different pea aphid host races”. *Front Plant Sci* **10**, 1–13 (2019).

115. Bragagnolo, F. S., Funari, C. S., Ibáñez, E., Cifuentes, A. “Metabolomics as a tool to study underused soy parts: In search of bioactive compounds”. *Foods* **10**, 1308 (2021).
116. Chen, X., Richter, A. R., Stout, M. J., Davis, J. A. “Effects of induced plant resistance on soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean”. *Arthropod Plant Interact* **12**, 543–551 (2018).
117. Dillon, F. M., Chludil, H. D., Zavala, J. A. “Solar UV-B radiation modulates chemical defenses against *Anticarsia gemmatalis* larvae in leaves of field-grown soybean”. *Phytochemistry* **141**, 27–36 (2017).
118. Ren, Y., Li, Y., Ju, Y., Zhang, W., Wang, Y. “Insect cuticle and insecticide development”. *Arch Insect Biochem Physiol* **114**, e22057 (2023).
119. MacHado, E. P., Garlet, C. G., Weschenfelder, M. A. G., Führ, F. M., Godoy, D. N., Pretto, V. E., Contini, R. E., Franco, C. R., Omoto, C., Bernardi, O. “Interspecific variation in susceptibility to insecticides by lepidopteran pests of soybean, cotton, and maize crops from Brazil”. *J Econ Entomol* **115**, 305–312 (2022).
120. Souza, B. H. S., Silva, A. G., Janini, J. C., Boica Júnior, A. L. “Antibiosis in soybean genotypes and the resistance levels to *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae)”. *Neotrop Entomol* **43**, 582–587 (2014).
121. Wari, D., Aboshi, T., Shinya, T., Galis, I. “Integrated view of plant metabolic defense with particular focus on chewing herbivores”. *J Integr Plant Biol* **64**, 449–475 (2022).
122. Xavier, S. A., Martins, D. C., Fantin, L. H., Canteri, M. G. “Older leaf tissues in younger plants are more susceptible to soybean rust”. *Acta Sci Agron* **39**, 17–24 (2017).
123. Picanço, B. B. M., Silva, B. N., Rodrigues, F. A. “Soybean leaf age influences the infection process of *Phakopsora pachyrhizi*”. *Physiol Mol Plant Pathol* **127**, 102069 (2023).
124. Souza, B. H. S., Costa, E. N., Ribeiro, Z. A., Perlatti, B., Cruz, M. C. P., Forim, M. R., Júnior, A. L. B., Stout, M. J. “Soybean leaf age and plant stage influence expression of resistance to velvetbean caterpillar and fall armyworm”. *Chemoecology* **31**, 377–390 (2021).
125. Reynolds, G. W., Smith, C. M. “Effects of leaf position, leaf wounding, and plant age of two soybean genotypes on soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) growth”. *Environ Entomol* **14**, 475–478 (1985).

126. Souza, B. “Fatores e mecanismos que influenciam a resistência em soja a *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)”. *Aleph* (2014).
127. Steuer, R. “Review: On the analysis and interpretation of correlations in metabolomic data”. *Brief Bioinform* **7**, 151–158 (2006).
128. Morgenthal, K., Weckwerth, W., Steuer, R. “Metabolomic networks in plants: Transitions from pattern recognition to biological interpretation”. *Biosystems* **83**, 108–117 (2006).
129. MACEL, M., Van DAM, N. M., KEURENTJES, J. J. B. “Metabolomics: the chemistry between ecology and genetics”. *Mol Ecol Resour* **10**, 583–593 (2010).
130. Yun, D.-Y., Kang, Y.-G., Kim, E.-H., Kim, M., Park, N.-H., Choi, H.-T., Go, G. H., Lee, J. H., Park, J. S., Hong, Y.-S. “Metabolomics approach for understanding geographical dependence of soybean leaf metabolome”. *Food Research International* **106**, 842–852 (2018).
131. Aguiar, M. C. S., Mueller de Freitas, M., de Freitas, C. A., Boiça Júnior, A. L., Carneiro, R. L., da Silva, M. F. das G. F., Fernandes, J. B., Forim, M. R. “Exploring chemical diversity in *Glycine max* cultivars: A multivariate approach in the search for bioactive compounds against *Spodoptera cosmioides*”. *Front Plant Sci* **13**, (2022).
132. Murakami, S., Nakata, R., Aboshi, T., Yoshinaga, N., Teraishi, M., Okumoto, Y., Ishihara, A., Morisaka, H., Huffaker, A., Schmelz, E., Mori, N. “Insect-induced daidzein, formononetin and their conjugates in soybean leaves”. *Metabolites* **4**, 532–546 (2014).
133. Gómez, J. D., Vital, C. E., Oliveira, M. G. A., Ramos, H. J. O. “Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)”. *PLoS One* **13** (2018).
134. Gómez, J. D., Pinheiro, V. J. M., Silva, J. C., Romero, J. V., Meriño-Cabrera, Y., Coutinho, F. S., Lourenção, A. L., Serrão, J. E., Vital, C. E., Fontes, E. P. B., Oliveira, M. G. A., Ramos, H. J. O. “Leaf metabolic profiles of two soybean genotypes differentially affect the survival and the digestibility of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars”. *Plant Physiology and Biochemistry* **155**, 196–212 (2020).
135. Jeschke, V., Gershenzon, J., Vassão, D. G. “A mode of action of glucosinolate-derived isothiocyanates: Detoxification depletes glutathione

- and cysteine levels with ramifications on protein metabolism in *Spodoptera littoralis*". *Insect Biochem Mol Biol* **71**, 37–48 (2016).
136. Höcker, O., Flottmann, D., Schmidt, T. C., Neusüß, C. "Non-targeted LC-MS and CE-MS for biomarker discovery in bioreactors: Influence of separation, mass spectrometry and data processing tools". *Science of The Total Environment* **798**, 149012 (2021).
 137. Mallmann, L. P., O. Rios, A., Rodrigues, E. "MS-FINDER and SIRIUS for phenolic compound identification from high-resolution mass spectrometry data". *Food Research International* **163**, 112315 (2023).
 138. Dührkop, K., Scheubert, K., Böcker, S. "Molecular formula identification with SIRIUS". *Metabolites* **3**, 506-516 (2013).
 139. Cipollini, D., Walters, D., Voelckel, C. "Costs of resistance in plants: From theory to evidence" *Annual Plant Reviews Online* 263-307 (2018).
 140. Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., Mysore, K. S. "Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense". *Front Plant Sci* **5**, 17 (2014).
 141. Rosati, R. G., Lario, L. D., Hourcade, M. E., Cervigni, G. D. L., Luque, A. G., Scandiani, M. M., Spampinato, C. P. "Primary metabolism changes triggered in soybean leaves by *Fusarium tucumaniae* infection". *Plant Science* **274**, 91–100 (2018).
 142. Silva, E., Belinato, J. R., Porto, C., Nunes, E., Guimarães, F., Meyer, M. C., Pilau, E. J. "Soybean metabolomics based in mass spectrometry: decoding the plant's signaling and defense responses under biotic stress". *J Agric Food Chem* **69**, 7257–7267 (2021).
 140. Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. "Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms". *Annu Rev Plant Biol* **57**, 675-709 (2006).
 143. Kachroo, P., Venugopal, S. C., Navarre, D. A., Lapchyk, L., Kachroo, A. "Role of salicylic acid and fatty acid desaturation pathways in ssi2-mediated signaling". *Plant Physiol* **139**, 1717–1735 (2005).
 144. Kachroo, A., Kachroo, P. "Fatty acid-derived signals in plant defense". *Annu Rev Phytopathol* **47**, 153-76 (2009).
 145. Park, S.-Y., Lim, S.-H., Ha, S.-H., Yeo, Y., Park, W. T., Kwon, D. Y., Park, S. U., Kim, J. K. "Metabolite profiling approach reveals the interface of primary and secondary metabolism in colored cauliflowers (*Brassica oleracea* L. ssp. botrytis)". *J Agric Food Chem* **61**, 6999-7007 (2013).

146. He, M., Ding, N. Z. “Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response”. *Front Plant Sci* **11**, 562785 (2020).
147. Howe, G. A., Major, I. T., Koo, A. J. “Modularity in jasmonate signaling for multistress resilience”. *Annu Rev Plant Biol* **69**, 387-415 (2018).
148. Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., Solano, R. “Redundancy and specificity in jasmonate signalling”. *Curr Opin Plant Biol* **33**, 147-156 (2016).
149. Song, S., Huang, H., Wang, J., Liu, B., Qi, T., Xie, D. “MYC5 is involved in jasmonate-regulated plant growth, leaf senescence and defense responses”. *Plant Cell Physiol* **58**, 1752-1763 (2017).
150. Svyatyna, K., Riemann, M. “Light-dependent regulation of the jasmonate pathway”. *Protoplasma* **249**, 137-145 (2012).
151. Schilmiller, A. L., Howe, G. A. “Systemic signaling in the wound response”. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 369-377 (2005).
152. Zhang, Y. F., Zhou, H. Y., Tang, Y. L., Luo, Y. M., Zhang, Z. Y. “Hydrogen peroxide regulated salicylic acid– and jasmonic acid-dependent systemic defenses in tomato seedlings”. *Food Science and Technology* **42**, (2021).
153. Pearce, G., Ryan, C. A. “Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene”. *J Biol Chem* **278**, 30044–30050 (2003).
154. Yoshinaga, N., Ishikawa, C., Seidl-Adams, I., Bosak, E., Aboshi, T., Tumlinson, J. H., Mori, N. “N-(18-hydroxylinolenoyl)-l-glutamine: A newly discovered analog of volicitin in *Manduca sexta* and its elicitor activity in plants. *J Chem Ecol* **40**, 484-490 (2014).
155. Turlings, T. C. J., Alborn, H. T., Loughrin, J. H., Tumlinson, J. H. “Volicitin, an elicitor of maize volatiles in oral secretion of *Spodoptera exigua*: Isolation and bioactivity”. *J Chem Ecol* **26**, 189-202 (2000).
156. Lincoln Taiz, E. Z. I. M. M. A. M. “Fisiologia e desenvolvimento vegetal”. *Brasil. Artemed.* 6ed. (2017).
157. Sumayo, M. S., Kwon, D. K., Ghim, S. Y. “Linoleic acid-induced expression of defense genes and enzymes in tobacco”. *J Plant Physiol* **171**, 1757-1762 (2014).
158. Kunishima, M., Yamauchi, Y., Mizutani, M., Kuse, M., Takikawa, H., Sugimoto, Y. “Identification of (Z)-3:(E)-2-hexenal isomerases essential to

- the production of the leaf aldehyde in plants”. *J Biol Chem* **291**, 14023 (2016).
159. Fall, R., Karl, T., Hansel, A., Jordan, A., Lindinger, W. “Volatile organic compounds emitted after leaf wounding: On-line analysis by proton-transfer-reaction mass spectrometry”. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* **104**, 15963-15974 (1999).
 160. Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., Takabayashi, J. “Volatile C6-aldehydes and allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*”. *Plant Cell Physiol* **46**, 1093–1102 (2005).
 161. Shiojiri, K., Karban, R. “Vascular systemic induced resistance for *Artemisia cana* and volatile communication for *Artemisia douglasiana*”. *The American Midland Naturalist* **159**, 468-477 (2008).
 162. Zhou, Y. Y., Luo, S. H., Yi, T. S., Li, C. H., Luo, Q., Hua, J., Liu, Y., Li, S. H. “Secondary metabolites from Glycine soja and their growth inhibitory effect against *Spodoptera litura*”. *J Agric Food Chem* **59**, 6004-6010 (2011).
 163. Aguiar, M. C. S. “Potencial dos compostos orgânicos voláteis como estimulantes vegetais: uma investigação em diferentes cultivares de tomate” (2024).
 164. Meldau, S., Erb, M., Baldwin, I. T. “Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns”. *Ann Bot* **110**, 1503-1514 (2012).
 165. Schmidt, E., Ryabchenko, B., Wanner, J., Jäger, W., Jirovetz, L. “Cytotoxic active constituents of essential oils of *Curcuma longa* and *Curcuma zanthorrhiza*. *Nat Prod Commun* **10**, 139-141 (2015).
 166. Tavares, W. de S., de Sousa Freitas, S., Graziotti, G. H., Parente, L. M. L., Lião, L. M., Zanuncio, J. C. “Ar-turmerone from *Curcuma longa* (Zingiberaceae) rhizomes and effects on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)”. *Ind Crops Prod* **46**, 158-164 (2013).
 167. Gao, Y. J., Fu, W. J., Liu, J., Chen, Y. J., Dai, G. H. “Morphological changes of *Podosphaera xanthii* and induced biochemical defenses of cucumber after treated by (+)-(S)-ar-turmerone”. *Physiol Mol Plant Pathol* **112**, 101524 (2020).
 168. He, L.-M., Cui, K., Ma, D.-C., Shen, R.-P., Huang, X.-P., Jiang, J.-G., Mu, W., Liu, F. “Activity, translocation, and persistence of isopyrazam for controlling cucumber powdery mildew”. *Plant Dis* **101**, 1139-1144 (2017).

169. Cheng, A. X., Lou, Y. G., Mao, Y. B., Lu, S., Wang, L. J., Chen, X. Y. “Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions”. *J Integr Plant Biol* **49**, 179-186 (2007).
170. D’Alessandro, M., Turlings, T. C. J. “In situ modification of herbivore-induced plant odors: a novel approach to study the attractiveness of volatile organic compounds to parasitic wasps”. *Chem Senses* **30**, 739-753 (2005).
171. Gfeller, V., Huber, M., Förster, C., Huang, W., Köllner, T. G., Erb, M. “Root volatiles in plant-plant interactions I: High root sesquiterpene release is associated with increased germination and growth of plant neighbours”. *Plant Cell Environ* **42**, 1950-1963 (2019).
172. Marklová, E. “Where does indolylacrylic acid come from?”. *Amino Acids* **17**, 401-413 (1999).
173. Van Meulebroek, L., Bussche, J. Vanden, Steppe, K., Vanhaecke, L. “Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution orbitrap mass spectrometry for metabolomic profiling of the endogenous phytohormonal status of the tomato plant”. *J Chromatogr A* **1260**, 67-80 (2012).
174. Boiça Júnior, A. L., Souza, B. H. S., Ribeiro, Z. A., Moraes, R. F. O., Eduardo, W. I., Nogueira, L. “A defesa das plantas ao ataque dos insetos”. *Tópicos em Entomologia Agrícola VII* 161-179 (2015).
175. Park, Y. J., Lee, J. S., Park, S., Kim, Y. J., Mani, V., Lee, K., Kwon, S. J., Park, S. U., Kim, J. K. Metabolite changes in soybean (*Glycine max*) leaves during the entire growth period”. *ACS Omega* **8**, 41718-41727 (2023).
176. Koch, K. “Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development”. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 235-246 (2004).
177. de Lima Toledo, C. A., Oliveira, M. D., da Silva Ponce, F., Aires, E. S., Seabra Júnior, S., Lima, G. P. P., de Oliveira, R. C. “Does the physiological trade-off between reproduction and defense affect the physiological and biochemical parameters of tomato plants infested with *Bemisia tabaci* MED and MEAM1?”. *Arthropod Plant Interact* **16**, 495–503 (2022).
178. Pezzola, E., Mancuso, S., Karban, R. “Precipitation affects plant communication and defense”. *Ecology* **98**, 1693–1699 (2017).
179. Peña, V. “Comparação do perfil de metabólitos secundários de cultivares de soja”. (2021).

180. Mithofer, A., Boland, W. “Plant defense against herbivores: Chemical aspects”. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 431-450 (2012).
181. Tareq, F. S., Kotha, R. R., Natarajan, S., Sun, J., Luthria, D. L. “An untargeted metabolomics approach to study the variation between wild and cultivated soybeans”. *Molecules* **28**, 5507 (2023).
182. Souza, B. H. S., Silva, A. G., Janini, J. C., Boica Júnior, A. L. “Antibiosis in soybean genotypes and the resistance levels to *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae)”. *Neotrop Entomol* **43**, 582-587 (2014).
183. Coelho, M., Godoy, A. F., Baptista, Y. A., Bentivenha, J. P. F., Lourenção, A. L., Baldin, E. L. L., Catchot, A. L. “Assessing soybean genotypes for resistance to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)”. *J Econ Entomol* **113**, 471-481 (2020).
184. Ongaratto, S., Silveira, C. M., Santos, M. C., Gorri, J. E. R., Sartori, M. M. P., Hunt, T. E., Lourenção, A. L., Baldin, E. L. L. “Resistance of soybean genotypes to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae): Antixenosis and antibiosis characterization”. *J Econ Entomol* **114**, 2571-2580 (2021).
185. de Queiroz, E. B., da Silva, F. C., Junior, C. B., Araújo, M. S., Hirose, E., de Jesus, F. G. “Antixenosis in soybean to *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) mediated by leaf color and trichome density”. *Phytoparasitica* **48**, 813-821 (2020).
186. Queiroz, E. B. de, Miranda, D. de S., Silva, F. C. da, Borella Junior, C., Almeida, A. C. de S., Hirose, E., Jesus, F. G. de. “Antibiosis in soybean genotypes to *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae)”. *Rev Bras Entomol* **64**, (2020).
187. Schlick-Souza, E. C., Baldin, E. L. L., Morando, R., Lourenção, A. L. “Antixenosis to *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) among soybean genotypes”. *Bragantia* **77**, 124-133 (2017).
188. Baldin, E. L. L., Stamm, M. D., Bentivenha, J. P. F., Koch, K. G., Heng-Moss, T. M., Hunt, T. E. “Feeding Behavior of *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) on soybeans exhibiting antibiosis, antixenosis, and tolerance resistance”. *Florida Entomologist* **101**, 223-228 (2018).
189. Boica Junior, A. L., Souza, B. H. S. D., Costa, E. N., Ribeiro, Z. A., Stout, M. J. “Factors influencing expression of antixenosis in soybean to *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)”. *J Econ Entomol* **108**, 317-325 (2015).
190. Wille, P. E., Pereira, B. A., Wille, C. L., Restelatto, S. S., Boff, M. I. C., Franco, C. R. “Natural resistance of soybean cultivars to the soybean

- looper larva *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)”. *Pesqui Agropecu Bras* **52**, 18-25 (2017).
191. Moraes, F. R. “Técnicas de avaliação do desempenho alimentar e de oviposição, categorias e mecanismos de resistência de genótipos de soja à *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: noctuidae)”. *Câmpus De Jaboticabal* (2017).
 192. Santos, L. M., Redaelli, L. R., Diefenbach, L. M., Efrom, C. F. “Larval and pupal stage of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in sweet and field corn genotypes”. *Brazilian Journal of Biology* **63**, 627-633 (2003).
 193. Chambers, J. “R: The R Project for Statistical Computing”.
 194. Fox, J., Weisberg, S. “An R Companion to Applied Regression +16,000 citations”. *Thousand Oaks CA: Sage*. 2016 (2019).
 195. Conover, W. J., Iman, R. L. “Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics”. *American Statistician* **35**, 124-128 (1981).
 196. Martinez, S. S., Van Emden, H. F. “Redução do crescimento, deformidades e mortalidade de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) causadas por *Azadiractina*”. *Neotrop Entomol* **30**, 113-125 (2001).
 197. Costa, E. N., de Souza, B. H. S., Eduardo, W. I., de Moraes, R. F. O., Ribeiro, Z. A., Júnior, A. L. B. “Effects of peanut cultivars and neem oil on the feeding preference, growth and mortality of fall armyworm and velvet bean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae)”. *Phytoparasitica* **50**, 1059-1073 (2022).
 198. Peruca, R. D., Coelho, R. G., da Silva, G. G., Pistori, H., Ravaglia, L. M., Roel, A. R., Alcantara, G. B. “Impacts of soybean-induced defenses on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) development”. *Arthropod Plant Interact* **12**, 257-266 (2018).
 199. De Bortoli, S. A., S Dória, H. O., M S Albergaria, N. M., Murata, A. T., Vescove, H. V. “Aspectos biológicos e nutricionais de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja, amendoim e dieta artificial”. *Boi. San. Veg. Plagas* **31**, 171-178 (2005).
 200. Garvey, M., Costanza, K., Grimmell, S., Elder, B. D. “Examining the effects of induced plant defenses on *Spodoptera frugiperda* performance”. *Applied Sciences (Switzerland)* **12**, 3907 (2022).

201. Vinha, F. B., Rojas, L. A. C., Ramos Sales, C., Monteiro Lima, N. S., Nascimento, J. Do, De Carvalho, L. A. L., Lemos, E. G. D. M. “Negative effects on the development of *Chrysodeixis includens* and *Spodoptera cosmioides* fed by peanut plants inoculated with entomopathogenic fungi”. *Frontiers in Fungal Biology* **3**, 968528 (2023).
202. Shikano, I. “Evolutionary ecology of multitrophic interactions between plants, insect herbivores and entomopathogens”. *J Chem Ecol* **43**, 586-598 (2017).
203. Specht, A., Montezano, D. G., Sosa-Gómez, D. R., Paula-Moraes, S. V., Roque-Specht, V. F., Barros, N. M. “Reproductive potential of *Spodoptera eridania* (Stoll) (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory: effect of multiple couples and the size”. *Brazilian Journal of Biology* **76**, 526-530 (2016).
204. Burghardt, F., Proksch, P., Fiedler, K. “Flavonoid sequestration by the common blue butterfly *Polyommatus icarus*: quantitative intraspecific variation in relation to larval hostplant, sex and body size”. *Biochem Syst Ecol* **29**, 875–889 (2001).
205. Burghardt, F., Knüttel, H., Becker, M., Fiedler, K. “Flavonoid wing pigments increase attractiveness of female common blue (*Polyommatus icarus*) butterflies to mate-searching males”. *Naturwissenschaften* **87**, 304-307 (2000).
206. Després, L., David, J.-P., Gallet, C. “The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals”. *Trends Ecol Evol* **22**, 298-307 (2007).
207. Augustine, S. M., Bhati, K. K., Berg-Falloure, K. M., Kolomiets, M. V. “Ketols emerge as potent oxylipin signals regulating diverse physiological processes in plants”. *Plants* **12**, 2088 (2023).
208. Wasternack, C., Feussner, I. “The Oxylipin pathways: Biochemistry and function”. *Annu Rev Plant Biol* **69**, 363-386 (2018).
209. Christensen, S. A., Nemchenko, A., Borrego, E., Murray, I., Sobhy, I. S., Bosak, L., Deblasio, S., Erb, M., Robert, C. A. M., Vaughn, K. A., Herrfurth, C., Tumlinson, J., Feussner, I., Jackson, D., Turlings, T. C. J., Engelberth, J., Nansen, C., Meeley, R., Kolomiets, M. V. “The maize lipoxygenase, ZmLOX10, mediates green leaf volatile, jasmonate and herbivore-induced plant volatile production for defense against insect attack”. *The Plant Journal* **74**, 59-73 (2013).

APÊNDICE

TABELA A.1 - Dieta mínima de farinha de feijão branco para lepidoptera.

Receita	1	2	3	5	10
Farinha de feijão branco	25 g	50 g	75 g	125 g	250 g
Ácido ascórbico	0.45 g	0.9 g	1.35 g	2.25 g	4.5 g
Ácido benzóico	0.25 g	0.5 g	0.75 g	1.25 g	2.5 g
Água	25 + 80 (mL)	50 + 160 (mL)	75 + 240 (mL)	125 + 400 (mL)	250 + 800 (mL)
Ágar	2.4 g	4.8 g	7.2 g	12 g	24 g
Formaldeído 3.7%	0.2 mL	0.4 mL	0.6 mL	1 mL	2 mL
Solução de vitaminas (Vitagold)	0.9 mL	1.8 mL	2.7 mL	4.5 mL	9 mL

TABELA A.2 - Principais parâmetros usados nas etapas do pré-processamento dos arquivos mzXML no software MZmine, versão 3.9.0.

Etapas	Parâmetros
Crop filter	Tr: 1-16,5 min <i>m/z</i> : 50-1300 Polarity: + (RPLC-ESI(+)-MS)
Mass Detection (MS1)	Mass detector: centroid MS level: 1 Noise level: 8E2
Mass Detection (MS2)	Mass detector: centroid MS level: 2 Noise level: 3E2
ADAP Chromatogram Builder	Min group size in # of scans: 4 Group intensity threshold: 8E2 and 3E2 (MS1 noise level) Min highest intensity: 24E ² -6E ³ (three times MS1 noise level) Scan to scan accuracy (<i>m/z</i>): 0,005-10 ppm
Local minimum feature resolver	Chromatographic threshold: 80 Minimum relative height: 0 Minimum search range RT: 0,1 Minimum absolute height: 8E2 – 2E3 Min ratio peak top: 2 Peak duration range: 0-2 Min of data point: 4 <i>m/z</i> tolerance: 0,0010 - 5.0 ppm
13C isotope filter	RT tolerance:0.030 Maximum charge: 2 Representative isotope: most intense.
Join aligner	<i>m/z</i> tolerance: 0,0010 - 5.0 ppm Weith for <i>m/z</i> : 3 Tr tolerance: 0,100 (absolute) Weith RT: 1 Mobility weight: 1.000
Filtering	Minimum features in a row (abs or %): 2 Never remove feature with MS2 scan: checked.
Gap-Filling	Intensity tolerance: 20.0% <i>m/z</i> tolerance: 0,0010 - 5.0 ppm RT tolerance: 0.100 min (absolute) Minimum data points: 2

FIGURA A.1 - Cromatograma de intensidade total dos íons detectados na amostra de Controle de Qualidade (QC).

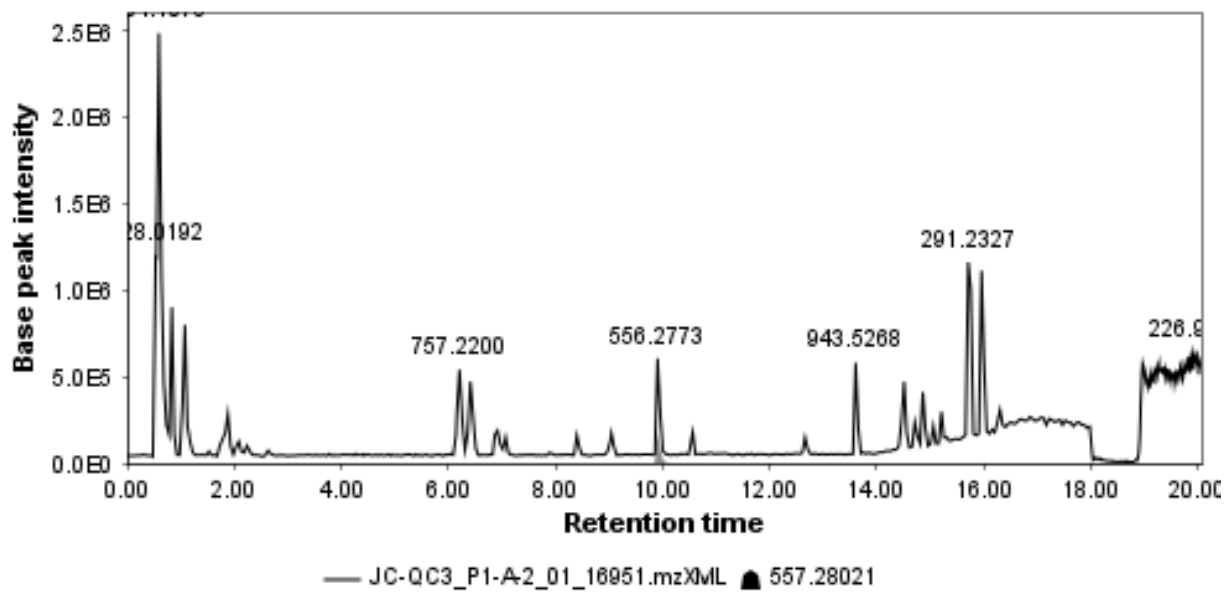


TABELA A.3 - Anotação química dos principais compostos com abundância média significativa identificados pelo mapa de calor entre os estágios (VC, V2 e V5) e tratamentos da soja.

ID	Presumível Metabólito de Soja	Taxonomia Química	TR	[M+H] ⁺ Teórico	[M+H] ⁺ Experimental	Fórmula Molecular	Aduto	Erro (ppm)
ID_ 5846	Metil 9,11,13,15-octadecatetraenoato	Ácidos graxos e derivados	15.73	291.2324	291.2323	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	[M+H] ⁺	0.39
ID_ 3335	Ácido 13-hidroxi-9-metoxi-10-oxo-11-octadecenoico	Ácidos graxos e derivados	13.91	365.2304	365.2297	C ₁₉ H ₃₄ O ₅	[M+Na] ⁺	1.88
ID_ 6105	Ácido octadeca-3,6,9,12,15-pentaenoico	Ácidos graxos e derivados	15.97	275.2011	275.2005	C ₁₈ H ₂₇ O ₂	[M+H] ⁺	2.26
ID_ 6103	Ácido 2-(5-hidroxi-4-metil-pent-3-enil)-6,10-dimetil-undeca-2,6,10-trienoico	Ácidos graxos e derivados	15.97	307.2273	307.2271	C ₁₉ H ₃₁ O ₃	[M+H] ⁺	0.53
ID_ 6106	4-(4-etenil-4,7-dimetilocta-1,6-dien-2-il)fenol	Benzoides	15.97	257.1905	257.1898	C ₁₈ H ₂₄ O	[M+H] ⁺	2.84
ID_ 6118	8,8-dihidroxi-trans-neoxantina	Ácidos orgânicos e derivados	15.97	635.4289	635.4279	C ₃₈ H ₆₀ O ₆	[M+H] ⁺	1.59
ID_ 6116	Muuroala-4,10(14)-dien -3-ona	Terpenoides	15.98	219.1749	219.1743	C ₁₅ H ₂₃ O	[M+H] ⁺	2.90
ID_ 6109	Ácido heptadeca-8,11-dienoico	Ácidos graxos e derivados	15.97	289.2143	289.2161	C ₁₇ H ₃₀ O ₂	[M+Na] ⁺	-6.11
ID_ 6102	Ácido havardico F	Terpenoides	15.97	329.2093	329.2088	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	[M+Na] ⁺	1.58
ID_ 2703	NA		13.18		564.3376			
ID_ 6448	Ácido 2-pentilnonanoico	Ácidos graxos e derivados	16.28	251.1987	251.2003	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	[M+Na] ⁺	-6.18
ID_ 3703	Ácido octadeca-8,10,12,14,16-pentaenoico	Ácidos graxos e derivados	14.23	275.2005	275.2003	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	[M+H] ⁺	0.56
ID_ 6450	5alfa-androstan-17alfa-ol-3-ona	Esteroides	16.28	291.2324	291.2317	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	[M+H] ⁺	2.24
ID_ 5264	Metil tetradecano-1,5,9,13-tetracarbaldeído	Ácidos graxos e derivados	15.21	347.2198	347.2194	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	[M+Na] ⁺	1.18
ID_ 3284	Dimetil 8-oxopentadecano-1,15-dicarboxilato	Ácidos graxos e derivados	13.88	360.275	360.2743	C ₁₉ H ₃₄ O ₅	[M+H ₃ N+H] ⁺	1.89
ID_ 5250	Ácido octadeca-10,14,16-trien-12-inoico	Ácidos graxos e derivados	15.20	257.1892	257.1897	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	[M-H ₂ O+H] ⁺	-1.87

ID_ 5233	Ácido 2,16-dimetilidenoheptadecanodioico	Ácidos graxos e derivados	15.20	342.2644	342.2640	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	[M+H ₃ N+H] ⁺	1.29
ID_ 5276	Metil 3,12-dihidroxihexadecanoato	Ácidos graxos e derivados	15.21	325.2358	325.2371	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	[M+H] ⁺	-4.04
ID_ 3301	Ácido 2,2,14,14-tetrametil-8-oxopentadecanodioico	Ácidos graxos e derivados	13.89	325.2355	325.2370	C ₁₉ H ₃₄ O ₅	[M-H ₂ O+H] ⁺	-4.64
ID_ 3278	Metil 8-(4-oxo-5-(pent-2-en-1-il)ciclopent-2-en-1-il)octanoato	Ácidos graxos e derivados	13.87	307.2273	307.2266	C ₁₉ H ₃₁ O ₃	[M+H] ⁺	2.31
ID_ 4327	Dimetil 9-oxooctadecanodioato	Ácidos graxos e derivados	14.59	374.2906	374.2900	C ₂₀ H ₃₆ O ₅	[M+H ₃ N+H] ⁺	1.52
ID_ 4337	Ácido 7-[5-hidroxi-2-[3-hidroxiocetil]-3-oxociclopentil]heptanoico	Ácidos graxos e derivados	14.59	379.246	379.2454	C ₂₀ H ₃₆ O ₅	[M+Na] ⁺	1.68
ID_ 5083	Ácido 2-decilpent-2-enedioico	Ácidos graxos e derivados	15.07	235.1689	235.1690	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	[M-H ₄ O ₂ +H] ⁺	-0.49
ID_ 4372	Ácido tridecanodioico	Ácidos graxos e derivados	14.61	227.1638	227.1641	C ₁₃ H ₂₄ O ₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	-1.12
ID_ 5271	Ácido 2,6-hexadecadiinoico	Ácidos graxos e derivados	15.20	249.1855	249.1847	C ₁₆ H ₂₄ O ₂	[M+H] ⁺	3.27
ID_ 5239	Ácido 9-oxooctadeca-10,12,15-trienoico	Ácidos graxos e derivados	15.20	275.2006	275.2005	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	[M-H ₂ O+H] ⁺	0.49
ID_ 5277	Ácido 2-prop-1-en-2-ildecanoico	Ácidos graxos e derivados	15.21	235.1674	235.1691	C ₁₃ H ₂₄ O ₂	[M+Na] ⁺	-7.31
ID_ 5260	Diéster de betulina	Terpenoides	15.21	671.4518	671.4488	C ₄₀ H ₆₂ O ₈	[M+H] ⁺	4.50
ID_ 5252	Metil octadeca-9,12,15-trien-6-inoato	Ácidos graxos e derivados	15.20	289.2168	289.2162	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	[M+H] ⁺	2.21
ID_ 5284	3-hidroxitetradecanoico	Ácidos graxos e derivados	15.21	267.1936	267.1953	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	[M+Na] ⁺	-6.42
ID_ 3338	Ácido 3-hidroxi-12-metiltridecanoico	Ácidos graxos e derivados	13.91	267.1936	267.1952	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	[M+Na] ⁺	-6.15
ID_ 4333	Ácido 12-hidroxihexadeca-8,10,14-trienoico	Ácidos graxos e derivados	14.58	281.2111	281.2109	C ₁₇ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	0.54
ID_ 5386	Ácido 13-oxo-9,11-octadecadienoico	Ácidos graxos e derivados	15.31	317.2093	317.2086	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	[M+Na] ⁺	2.25
ID_ 5374	Ácido 9-oxooctadeca-10,12-dienoico	Ácidos graxos e derivados	15.30	277.2165	277.2161	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	[M-H ₂ O+H] ⁺	1.46
ID_ 4803	17-hidroxiandrost-1-en-3-ona	Esteroides	14.87	289.2168	289.2160	C ₁₉ H ₂₉ O ₂	[M+H] ⁺	2.65
ID_ 3045	NA		13.67		173.1171			

ID_ 3310	Ácido 3,7-dietilnonanodioico	Ácidos graxos e derivados	13.89	227.1648	227.1640	C ₁₃ H ₂₄ O ₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	3.57
ID_ 4815	Colelenato de metila	Ácidos graxos e derivados	14.88	307.2273	307.2266	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	2.26
ID_ 5565	Metil 11,12-dihidroxiocetadeca-9-ienoato	Ácidos graxos e derivados	15.47	344.2801	344.2792	C ₁₉ H ₃₄ O ₄	[M+H ₃ N+H] ⁺	2.64
ID_ 5404	Ácido 8,11,12-tri-hidroxiocetadec-9-enoico	Ácidos graxos e derivados	15.32	295.2268	295.2266	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	[M-CH ₄ O+H] ⁺	0.55
ID_ 4528	Ácido 8-[2-(3-hidroxi-pent-1-en-1-il)-5-oxociclopent-3-en-1-il]octanoico	Ácidos graxos e derivados	14.71	309.2066	309.2059	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	2.17
ID_ 4531	Ácido 9,14-dioxo-10,12-octadecadienoico	Ácidos graxos e derivados	14.70	326.2331	326.2326	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	[M+Na] ⁺	1.46
ID_ 5173	Heptadeca-1,6,11,16-tetraeno-9-ona	Ácidos graxos e derivados	15.14	279.2324	279.2316	C ₁₈ H ₃₄ O	[M+CH ₄ O+H] ⁺	2.91
ID_ 266	Ácido isoferúlico	Ácidos cinâmicos e derivados	1.70	177.0546	177.0544	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	1.38
ID_ 1158	Derivado de Kaempferol	Flavonoides	6.20	287.0552	287.0547	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺	1.72
ID_ 1154	Kaempferol 3-rutinosídeo-7-glicosídeo	Flavonoides	6.20	757.2191	757.2191			0.02
ID_ 1367	Derivado de Kaempferol	Flavonoides	7.06	287.0556	287.0547	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺	3.18
ID_ 1229	Kaempferol 3-laminaribiosídeo-7-rhamnosídeo	Flavonoides	6.41	757.2191	757.2190	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	[M+H] ⁺	0.17
ID_ 1521	Kaempferol-3-glicosídeo-7-ramnosídeo	Flavonoides	8.40	596.1692	596.1691	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	0.21
ID_ 1532	Kaempferol-3-glicosídeo-7-ramnosídeo	Flavonoides	8.41	595.1663	595.1660	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	0.54
ID_ 692	Ácido cumárico	Cumarinas e derivados	3.43	147.0435	147.0437	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H ₂ O+H] ⁺	-1.18
ID_ 363	Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilprop-2-enoico	Ácidos cinâmicos e derivados	2.01	177.0544	177.0543	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	0.32
ID_ 528	3-(3,4-metilenodioxifenil)propenal	Ácidos cinâmicos e derivados	2.62	177.0545	177.0544	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	0.84
ID_ 712	Ácido cis-ferúlico	Ácidos cinâmicos e derivados	3.53	177.0545	177.0543	C ₁₀ H ₁₀ O ₆	[M-H ₂ O+H] ⁺	0.86
ID_ 3025	Metil 5-[[4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-3-[(3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il)oxi]oxan-2-il]oxi]-3,4-dihidroxi-6-[[9-hidroxi-4,11-bis(hidroximetil)-	Terpenoides	13.64	1117.577	1117.5774	C ₅₅ H ₉₀ O ₂₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	-0.12

ID_ 3173	4,6,6,8,11,14-hexametil-10-[(3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il)oxi]-1,2,3,4,5,6,6,7,8,9,10,11,12,14-icosahidropicen-3-il]oxi } oxano-2-carboxilato Metil 6-[-9-hidroxi-4-(hidroximetil)-4,6,8,11,14-hexametil-11-[-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oximetil]-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,14-tetradecahidropicen-3-il]oxi]-5-[(4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-3-[-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxioxan-2-il]oxi-3,4-dihidroxioxano-2-carboxilato 2-[(5-{[4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-3-[(3,4,5-trihidroxioxan-2-il)oxi]oxan-2-il]oxi}-2-{ [8,9-dihidroxi-8-(hidroximetil)-4,4,6,6,,11,14-he ptametil-1,2,3,4,4,5,6,6,7,8,8,9,10,11,12,12,14,14-icosahidropicen-3-il]oxi }-4-hidroxioxan-3-il]oxi]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol 6-[9-hidroxi-4,11-bis(hidroximetil)-4,6,6,8,11,14-hexametil-10,3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,12,14,14-tetradecahidropicen-3-il]oxi]-5-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-3-[3,4,5-tri-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxioxan-2-il]oxi-3,4-dihidroxioxano-2-carboxílico	Terpenoides	13.79	1117.578	1117.5773	C ₅₅ H ₉₀ O ₂₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	0.42
ID_ 3022	6-[9-hidroxi-4,11-bis(hidroximetil)-4,6,6,8,11,14-hexametil-10,3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,12,14,14-icosahidropicen-3-il]oxi }-4-hidroxioxan-3-il]oxi]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol	Terpenoides	13.64	1085.5508	1085.5507	C ₅₅ H ₉₀ O ₂₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	0.12
ID_ 3018	6-[9-hidroxi-4,11-bis(hidroximetil)-4,6,6,8,11,14-hexametil-10,3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,12,14,14-tetradecahidropicen-3-il]oxi]-5-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-3-[3,4,5-tri-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxioxan-2-il]oxi-3,4-dihidroxioxano-2-carboxílico	Terpenoides	13.64	1085.5510	1085.5515	C ₅₅ H ₉₀ O ₂₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	-0.42
ID_ 5266	Turmerona	Terpenoides	15.21	217.1592	217.1583	C ₁₅ H ₂₀ O	[M+H] ⁺	4.00

NA= não anotado

TABELA A.4 - Anotação química dos compostos que apresentaram os maiores valores de VIP Score nas folhas de soja no estágio de desenvolvimento VC e tratamento.

ID	Presumível Metabólito de Soja	Taxonomia Química	TR	[M+H] ⁺ Teórico	[M+H] ⁺ Experimental	Fórmula Molecular	Aduto	Erro (ppm)	VIP Score
ID_ 5153	Ácido 18-metoxi-18-oxooctadec-9-enoico	Ácidos graxos e derivados	15.11	344.2801	344.2786	C ₁₉ H ₃₄ O ₄	[M+H ₃ N+H] ⁺	4.46	1.58
ID_ 5569	Metil 13-oxooctadeca-9,11-dienoato	Ácidos graxos e derivados	15.47	309.2430	309.2419	C ₁₉ H ₃₃ O ₃	[M+H] ⁺	3.45	1.58
ID_ 5565	Metil 11,12-dihidroxi octadeca-9-ienoato	Ácidos graxos e derivados	15.47	344.2801	344.2792	C ₁₉ H ₃₄ O ₄	[M+H ₃ N+H] ⁺	2.64	1.57
ID_ 5610	Tridecano-4,7,10-triona	Ácidos graxos e derivados	15.50	227.1647	227.1640	C ₁₃ H ₂₅ O ₃	[M+H] ⁺	2.89	1.56
ID_ 5599	Ácido nonadec-9-enedioico	Ácidos graxos e derivados	15.49	349.2355	349.2345	C ₁₉ H ₃₄ O ₄	[M+Na] ⁺	2.79	1.56

ID_ 3820	Ácido 13-oxo-9,11-octadecadienoico	Ácidos graxos e derivados	14.28	295.2273	295.2258	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	[M+H] ⁺	5.00	1.56
ID_ 5147	Metil 12-oxo-9-octadecinoato	Ácidos graxos e derivados	15.11	309.2425	309.2415	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	[M+H] ⁺	3.25	1.54
ID_ 6103	Ácido 2-(5-hidroxi-4-metil-pent-3-enil)-6,10-dimetil-undeca-2,6,10-trienoico	Ácidos graxos e derivados	15.97	307.2273	307.2271	C ₁₉ H ₃₁ O ₃	[M+H] ⁺	0.53	1.52
ID_ 4710	Ácido 7,16-dioxodocosanodioico	Ácidos graxos e derivados	14.82	381.262	381.2611	C ₂₂ H ₃₈ O ₆	[M+H] ⁺	2.40	1.52
ID_ 3552	Metil 14-(3-etiloxiran-2-il)tetradeca-9,12-dienoato	Ácidos graxos e derivados	14.07	309.243	309.2420	C ₁₉ H ₃₃ O ₃	[M+H] ⁺	3.39	1.51
ID_ 6102	Ácido havardico F	Terpenoides	15.97	329.2093	329.2088	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	[M+Na] ⁺	1.58	1.51
ID_ 6105	Ácido octadeca-3,6,9,12,15-pentaenoico	Ácidos graxos e derivados	15.97	275.2011	275.2005	C ₁₈ H ₂₇ O ₂	[M+H] ⁺	2.26	1.51
ID_ 5825	Hexadeca-6,11-dien-3-ona	Terpenoides	15.72	259.2038	259.2052	C ₁₆ H ₂₈ O	[M+Na] ⁺	-5.29	1.50
ID_ 3338	Ácido 3-hidroxi-12-metiltridecanoico	Ácidos graxos e derivados	13.91	267.1936	267.1952	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	[M+Na] ⁺	-6.15	1.50
ID_ 6116	Muurola-4,10(14)-dien -3-ona	Terpenoides	15.98	219.1749	219.1743	C ₁₅ H ₂₃ O	[M+H] ⁺	2.90	1.50
ID_ 4720	Ácido 9-oxocáprico	Ácidos graxos e derivados	14.83	187.1334	187.1327	C ₁₀ H ₁₉ O ₃	[M+H] ⁺	3.56	1.50
ID_ 3080	Ácido 9-oxooctadeca-10,12,15-trienoico	Ácidos graxos e derivados	13.69	293.2117	293.2106	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	[M+H] ⁺	3.64	1.50
ID_ 5846	Metil 9,10-dihidroxiocetadeca-11,13,15-trienoato	Ácidos graxos e derivados	15.73	291.2324	291.2323	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	[M+H] ⁺	0.39	1.49
ID_ 3543	N-acetil-2,4,10,17-Tetrahidroxiheptadecilamina	Ácidos graxos e derivados	14.07	362.2906	362.2896	C ₁₉ H ₄₀ NO ₅	[M+H] ⁺	2.69	1.48
ID_ 5468	NA	NA	15.38		351.2499	C ₁₉ H ₃₆ O ₄	[M+Na] ⁺		1.48
ID_ 619	3,4-5-5-dihidroxi-4-(hidroximetil)oxolan-2-il]oxi-3,4-dihidroxi-6-(2-metil-4-oxopiran-3-il)oxioxan-2-il] ácido metoxi]-3-hidroxi-3-metil-5-oxopentanoico	Carboidratos e derivados	3.12	565.1769	565.1760	C ₂₃ H ₃₃ O ₁₆	[M+H] ⁺	1.57	1.47
ID_ 3071	2,3,4,4,5,6,7,8-octahidro-3-hidroxi-4-metil-7-(1-metilenoilnaftalenocarboxaldeído)	Terpenoides	13.68	235.1698	235.1690	C ₁₅ H ₂₃ O ₂	[M+H] ⁺	3.33	1.47
ID_ 5475	Metil 12,13-dihidroxiocetadec-9-enoato	Ácidos graxos e derivados	15.38	329.2692	329.2683	C ₁₉ H ₃₇ O ₄	[M+H] ⁺	2.86	1.46
ID_ 4697	N-acetil-3,5,11,18-Tetrahidroxiocetadecil-2-amina	Ácidos graxos e derivados	14.82	376.3063	376.3057	C ₂₀ H ₄₂ NO ₅	[M+H] ⁺	1.67	1.46

NA= não anotado

TABELA A.5: Anotação química dos compostos induzidos, identificados pelo *volcano*, nas folhas jovens e velhas de soja no estágio VC.

ID	Presumível Metabólito de Soja	Taxonomia Química	TR	[M+H] ⁺ Teórico	[M+H] ⁺ Experimental	Fórmula Molecular	Aduto	Erro (ppm)	log2(FC)
Folha Jovem									
ID_ 3703	Ácido octadeca-8,10,12,14,16-pentaenoico	Ácidos graxos e derivados	14.23	275.2005	275.2003	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	[M+H] ⁺	0.56	109.88
ID_ 3699	Ácido 9-oxooctadeca-10,12,15-trienoico	Ácidos graxos e derivados	14.23	293.2111	293.2108	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	0.95	78.48
ID_ 4481	Heptadec-2-eno-1,5-diol	Ácidos graxos e derivados	14.70	288.2889	288.2898	C ₁₇ H ₃₆ O ₂	[M+H ₂ O+H] ⁺	-3.02	12.31
ID_ 4231	2-aminoheptadecano-1,3-diol	Ácidos graxos e derivados	14.54	288.2903	288.2895	C ₁₇ H ₃₈ NO ₂	[M+H] ⁺	2.68	11.80
ID_ 2472	Ácido 2,9-dimetildecandioico	Ácidos graxos e derivados	12.62	213.1485	213.1483	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	0.89	11.64
ID_ 2473	Ácido 9-oxooctadeca-10,12,15-trienoico	Ácidos graxos e derivados	12.63	275.2005	275.2002	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	[M-H ₂ O+H] ⁺	1.17	11.63
ID_ 4758	NA		14.85		289.2929				11.32
ID_ 4521	Pentadec-2-en-1-ol	Ácidos graxos e derivados	14.71	244.2625	244.2633	C ₁₅ H ₃₂ O	[M+H ₂ O+H] ⁺	-3.40	8.25
ID_ 2471	NA	Ácidos graxos e derivados	12.63		351.2139				8.24
ID_ 4895	Ácido (hidroximetil)hexadecanoico	Ácidos graxos e derivados	14.93	304.2819	304.2844	C ₁₇ H ₃₆ O ₃	[M+H ₂ O+H] ⁺	-8.36	7.80
ID_ 5983	Ácido 9-metiloctadecanoico	Ácidos graxos e derivados	15.84	316.3216	316.3208	C ₁₉ H ₄₂ O ₂	[M+H ₃ N+H] ⁺	2.46	7.74
ID_ 4872	Pentadec-5-en-1-ol	Ácidos graxos e derivados	14.92	244.2624	244.2634	C ₁₅ H ₃₂ O	[M+H ₂ O+H] ⁺	-3.90	7.54
ID_ 4746	NA	Ácidos graxos e derivados	14.84		288.2898				7.09
ID_ 2465	Ácido 9,10,13-trihidroxiocetadeca-11,15-dienoico	Ácidos graxos e derivados	12.61	346.2582	346.2586	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	[M+H ₂ O+H] ⁺	-1.09	6.47
ID_ 6435	Ácido 1-tetradecil-5-oxopirrolidina-3-carboxílico	Ácidos orgânicos e derivados	16.28	326.2695	326.2689	C ₁₉ H ₃₆ NO ₃	[M+H] ⁺	1.92	5.78
ID_ 6450	5alfa-androstan-17alfa-ol-3-ona	Esteroides	16.28	291.2324	291.2317	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	[M+H] ⁺	2.24	5.47
ID_ 2940	Metil deca-2,4,8-trienoato	Ácidos graxos e derivados	13.54	181.1229	181.1221	C ₁₁ H ₁₇ O ₂	[M+H] ⁺	4.40	4.67
ID_ 1396	Malonil-D-triptofano	Aminoácidos e derivados	7.17	291.0981	291.0972	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	3.05	4.23
ID_ 3706	Ácido 9-hidroxi-10-oxo-12,15-octadecadienoico	Ácidos graxos e derivados	14.22	333.2042	333.2035	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	[M+Na] ⁺	2.10	4.05
ID_ 3042	Ácido 9-oxodecanoico	Ácidos graxos e derivados	13.66	187.1334	187.1327	C ₁₀ H ₁₉ O ₃	[M+H] ⁺	3.70	3.87
ID_ 3239	Ácido 4-oxo-octadeca-9,11,13,15-tetraenoico	Ácidos graxos e derivados	13.84	291.196	291.1953	C ₁₈ H ₂₇ O ₃	[M+H] ⁺	2.51	3.83
ID_ 3048	Ácido 9,9-dihidroxinonanoico	Ácidos graxos e derivados	13.67	155.1067	155.1064	C ₉ H ₁₈ O ₄	[M-H ₄ O ₂ +H] ⁺	2.20	3.41
ID_ 3056	Ácido 8,11-dihidroxiocetadeca-9,12,15-trienoico	Ácidos graxos e derivados	13.67	275.2006	275.2003	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	[M-H ₄ O ₂ +H] ⁺	0.94	3.21
ID_ 2840	Ácido 3-oxo-9-octadecenodioico	Ácidos graxos e derivados	13.41	309.2052	309.2058	C ₁₈ H ₃₀ O ₅	[M-H ₂ O+H] ⁺	-1.81	3.10

ID_ 3222	Ácido 8-[2-(3-hidroxipent-1-en-1-il)-5-oxociclopent-3-en-1-il]octanoico	Ácidos graxos e derivados	13.83	309.2066	309.2057	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	2.88	3.03
ID_ 3071	2,3,4,4,5,6,7,8-octahidro-3-hidroxi-4-metil-7-metilenoilnaftalenocarboxaldeído	Terpenoides	13.68	235.1698	235.1690	C ₁₅ H ₂₃ O ₂	[M+H] ⁺	3.33	2.92
ID_ 5375	Ácido 9-oxo-10,12-octadecadienoico	Ácidos graxos e derivados	15.31	295.2273	295.2263	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	[M+H] ⁺	3.30	2.82
ID_ 6459	Ácido 12-oxo-9-octadecinoico	Ácidos graxos e derivados	16.28	277.2156	277.2162	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	[M-H ₂ O+H] ⁺	-2.17	2.73
ID_ 3326	Ácido 8-hidroxihexadecanodioico	Ácidos graxos e derivados	13.90	325.1991	325.2009	C ₁₆ H ₃₀ O ₅	[M+Na] ⁺	-5.51	2.60
ID_ 5048	NA	Ácidos graxos e derivados	15.04		253.1797				2.56
ID_ 1611	NA	Carboidratos e derivados	8.89		366.1756				2.53
ID_ 3510	Ácido 9-hexadecinoico	Ácidos graxos e derivados	14.04	275.1987	275.2003	C ₁₆ H ₂₈ O ₂	[M+Na] ⁺	-5.91	2.48
ID_ 3646	Ácido 9,16-dioxooctadeca-10,12,14-trienoico	Ácidos graxos e derivados	14.16	307.1909	307.1903	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	[M+H] ⁺	1.97	2.47
ID_ 2287	Ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoico	Ácidos fenólicos	12.13	177.0542	177.0544	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	-0.99	2.42

Folha Velha

ID_ 5375	Ácido 9-oxo-10,12-octadecadienoico	Ácidos graxos e derivados	15.31	295.2273	295.2263	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	[M+H] ⁺	3.30	8.41
ID_ 4231	2-aminoheptadecano-1,3-diol	Ácidos graxos e derivados	14.54	288.2903	288.2895	C ₁₇ H ₃₈ NO ₂	[M+H] ⁺	2.68	6.68
ID_ 6326	Ácido nonadecílico	Ácidos graxos e derivados	16.18	316.3216	316.3209	C ₁₆ H ₃₈ O ₂	[M+H ₃ N+H] ⁺	2.11	6.27
ID_ 4872	Pentadec-5-en-1-ol	Ácidos graxos e derivados	14.92	244.2624	244.2634	C ₁₅ H ₃₂ O	[M+H ₂ O+H] ⁺	-3.90	5.93
ID_ 4481	Heptadec-2-eno-1,5-diol	Ácidos graxos e derivados	14.70	288.2889	288.2898	C ₁₇ H ₃₆ O ₂	[M+H ₂ O+H] ⁺	-3.02	5.84
ID_ 4521	Pentadec-2-en-1-ol	Ácidos graxos e derivados	14.71	244.2625	244.2633	C ₁₅ H ₃₂ O	[M+H ₂ O+H] ⁺	-3.40	5.68
ID_ 4895	Ácido (hidroximetil)hexadecanoico	Ácidos graxos e derivados	14.93	304.2838	304.2844	C ₁₇ H ₃₆ O ₃	[M+H ₂ O+H] ⁺	-2.11	5.26
ID_ 6450	5alfa-androstan-17alfa-ol-3-ona	Esteroides	16.28	291.2324	291.2317	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	[M+H] ⁺	2.24	5.08
ID_ 6347	Heptadecanal	Ácidos graxos e derivados	16.22	272.2953	272.2945	C ₁₇ H ₃₈ O	[M+H ₃ N+H] ⁺	2.82	5.05
ID_ 5174	Ácido linolênico	Ácidos graxos e derivados	15.15	298.2735	298.2740	C ₁₈ H ₃₃ O ₃	[M+H ₂ O+H] ⁺	-1.56	4.54
ID_ 6453	NA	Ácidos graxos e derivados	16.28		259.2052				4.30
ID_ 6448	Ácido 2-pentilnonanoico	Ácidos graxos e derivados	16.28	251.1987	251.2003	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	[M+Na] ⁺	-6.18	4.15
ID_ 6435	Ácido 1-tetradecil-5-oxopirrolidina-3-carboxílico	Ácidos orgânicos e derivados	16.28	326.2695	326.2689	C ₁₉ H ₃₆ NO ₃	[M+H] ⁺	1.92	4.08
ID_ 5825	1-[4-(4-butilciclohexil)fenil]etanona	Terpenoides	15.72	259.2062	259.2052	C ₁₈ H ₂₇ O	[M+H] ⁺	3.97	3.99
ID_ 5846	Metil 9,11,13,15-octadecatetraenoato	Ácidos graxos e derivados	15.73	291.2324	291.2323	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	[M+H] ⁺	0.39	3.84
ID_ 3703	Ácido octadeca-8,10,12,14,16-pentaenoico	Ácidos graxos e derivados	14.23	275.2005	275.2003	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	0.56	3.77
ID_ 6116	Muuroala-4,10(14)-dien-3-ona	Terpenoides	15.98	219.1749	219.1743	C ₁₅ H ₂₃ O	[M+H] ⁺	2.90	3.67
ID_ 5875	NA		15.73		332.2276	C ₁₂ H ₃₁ N ₅ O ₄	[M+Na] ⁺		3.05

ID_ 2022	Daidzeína	Flavonoides	11.12	255.0657	255.0649	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	[M+H] ⁺	3.15	3.04
ID_ 5853	Ácido 10,12-14-oxononadeca-10,12-dienoico	Ácidos graxos e derivados	15.73	331.2249	331.2243	C ₁₉ H ₃₂ O ₃	[M+Na] ⁺	1.71	2.89
ID_ 5387	Ácido linoléico	Ácidos graxos e derivados	15.32	298.272	298.2739	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	[M+H ₂ O+H] ⁺	-6.43	2.85
ID_ 1396	Malonil-D-triptofano	Aminoácidos e derivados	7.17	291.0981	291.0972	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	3.05	2.79
ID_ 6102	Ácido havardico F	Terpenoides	15.97	329.2093	329.2088	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	[M+Na] ⁺	1.58	2.74
ID_ 6103	Ácido 2-(5-hidroxi-4-metil-pent-3-enil)-6,10-dimetil-undeca-2,6,10-trienoico	Ácidos graxos e derivados	15.97	307.2273	307.2271	C ₁₉ H ₃₁ O ₃	[M+H] ⁺	0.53	2.64
ID_ 6105	Ácido octadeca-3,6,9,12,15-pentaenoico	Ácidos graxos e derivados	15.97	275.2011	275.2005	C ₁₈ H ₂₇ O ₂	[M+H] ⁺	2.26	2.54
ID_ 5384	4-hidroxitestosterona	Esteroides	15.31	323.2222	323.2215	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	[M+H ₂ O+H] ⁺	2.14	2.53

NA= não anotado

TABELA A.6 – Anotação química dos compostos que apresentaram os maiores valores de VIP Score nas folhas de soja no estágio de desenvolvimento V2 e tratamento.

ID	Presumível Metabólito de Soja	Taxonomia Química	TR	[M+H] ⁺ Teórico	[M+H] ⁺ Experimental	Fórmula Molecular	Aduto	Erro (ppm)	VIP Score
ID_ 5067	Estra-2,5(10)-dien-17-ona	Esteroides	15.07	257.1905	257.1896	C ₁₈ H ₂₄ O	[M+H] ⁺	3.65	1.95
ID_ 3152	[2-hidroxi-3-[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxipropil]octadeca-6,9,12,15-tetraenoato	Ácidos graxos e derivados	13.77	513.3064	513.3055	C ₂₇ H ₄₅ O ₉	[M+H] ⁺	1.77	1.90
ID_ 5276	Metil 8-[3-(hidroxioceta-2,5-dien-1-il)oxiran-2-il]octanoato	Ácidos graxos e derivados	15.21	325.2379	325.2371	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	[M+H] ⁺	2.42	1.90
ID_ 1452	3,4-metilenodioxicinamaldeído	Ácidos cinâmicos e derivados	7.83	177.0549	177.0543	C ₁₀ H ₉ O ₃	[M+H] ⁺	3.39	1.78
ID_ 3175	Ácido 12,14-di-hidroxi-13-(metoxicarbonil)-3,5,7-trimetiltetradeca-2,4-dienoico	Ácidos graxos e derivados	13.80	339.2165	339.2164	C ₁₉ H ₃₂ O ₆	[M-HO ₂ +H] ⁺	0.27	1.78
ID_ 3019	Pisumsaponina I	Terpenoides	13.64	1046.5536	1046.5586	C ₅₁ H ₈₀ O ₂₁	[M+H ₃ N+H] ⁺	-4.81	1.78
ID_ 1037	N-malonil-D-fenilalanina	Aminoácidos e derivados	5.63	252.0872	252.0864	C ₁₂ H ₁₃ NO ₅	[M+H] ⁺	3.37	1.78

ID_ 443	Ácido ferúlico	Ácidos cinâmicos e derivados	2.24	177.0542	177.0544	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-HO ₂ +H] ⁺	-0.96	1.76
ID_ 6171	Octadecadiene-1,18-diol	Ácidos graxos e derivados	16.02	305.2457	305.2471	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	[M+Na] ⁺	-4.54	1.74
ID_ 1789	Ácido 2-[[2-[[2-[(2-amino-3-fenilpropanoil)amino]-3-metilbutanoil]amino]-3-(4-hidroxifenil)propanoil]amino]-3-fenilpropanoico	Aminoácidos e derivados	9.91	557.2798	557.2800	C ₃₂ H ₃₈ N ₄ O ₆	[M-HO ₂ +H] ⁺	-0.41	1.73
ID_ 1463	Glicilfenilalanileucilglicina	Aminoácidos e derivados	7.88	393.2138	393.2132	C ₁₉ H ₂₈ N ₄ O ₅	[M+H] ⁺	1.50	1.72
ID_ 5068	Ácido 2,16-dimetilidenoheptadecanodioico	Ácidos graxos e derivados	15.07	289.2152	289.2161	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	[M-H ₄ O ₂ +H] ⁺	-3.01	1.72
ID_ 4815	Colenato de metila	Ácidos graxos e derivados	14.88	307.2273	307.2266	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	2.26	1.71
ID_ 1111	2-oxo-4-(2,6,6-trimetilciclohexen-1-il)butanal	Terpenoides	6.04	209.1542	209.1533	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	[M+H] ⁺	4.31	1.70
ID_ 4821	Metil 8-[3-(1-hidroxioceta-2,5-dien-1-il)oxiran-2-il]octanoato	Ácidos graxos e derivados	14.88	342.2644	342.2639	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	[M+H ₃ N+H] ⁺	1.52	1.70
ID_ 744	Metil cafeato	Ácidos cinâmicos e derivados	3.80	177.0542	177.0543	C ₁₀ H ₈ O ₄	[M-HO ₂ +H] ⁺	-0.73	1.70
ID_ 554	N,N'-[4-(2-Fenil-hidrazinilideno)-4H-pirazol-3,5-diil]diacetamida	Aminoácidos e derivados	2.73	319.1513	319.1509	C ₁₃ H ₁₄ N ₆ O ₂	[M-CH ₄ O+H] ⁺	1.11	1.69
ID_ 5058	Ácido 8-hidroxioceta-11,17-dien-9-inoico	Ácidos graxos e derivados	15.06	293.2117	293.2111	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	2.14	1.69
ID_ 1281	6-[[6-[6-(2-etil-4,5-dihidroxi-6-metiloxan-3-il)oxi-4,5-dihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il)oxi-4,5-dihidroxi-2-metiloxan-3-il]amino]-4-(hidroximetil)ciclohex-4-eno-1,2,3-triol	Carboidratos e derivados	6.60	624.2852	624.2858	C ₂₇ H ₄₇ NO ₁₆	[M-H ₂ O+H] ⁺	-0.97	1.68
ID_ 4225	3-[3-(deciloxi)-2-hidroxipropoxi]propano-1,2-diol	Ácidos graxos e derivados	14.53	324.275	324.2746	C ₁₆ H ₃₄ O ₅	[M+H ₃ N+H] ⁺	1.37	1.65
ID_ 6384	Ácido 3-hidroxiicosa-8,11,14,17-tetraenoico	Ácidos graxos e derivados	16.24	321.243	321.2418	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	[M+H] ⁺	3.71	1.64
ID_ 4372	Ácido 2,8-dietilnonanodioico	Ácidos graxos e derivados	14.61	227.1638	227.1641	C ₁₃ H ₂₄ O ₄	[M-HO ₂ +H] ⁺	-1.12	1.63
ID_ 779	Ácido tuberônico-β-D-glicosídeo	Ácidos graxos e derivados	4.00	406.2077	406.2068	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	[M+H ₃ N+H] ⁺	2.16	1.63
ID_ 5266	Turmerona	Terpenoides	15.21	217.1592	217.1583	C ₁₅ H ₂₀ O	[M+H] ⁺	4.00	1.62

TABELA A.7 – Anotação química dos compostos induzidos, identificados pelo *volcano*, nas folhas jovens e velhas de soja no estágio V2.

ID	Presumível Metabólito de Soja	Taxonomia Química	TR	[M+H] ⁺ Teórico	[M+H] ⁺ Experimental	Fórmula Molecular	Aduto	Erro (ppm)	log2(FC)
Folha Jovem									
ID_ 1611	NA	Carboidratos e derivados	8.89		366.1756				35.15
ID_ 5640	3,6-octadecadiinoato de metila	Ácidos graxos e derivados	15.54	291.2324	291.2316	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	2.62	31.91
ID_ 325	Ácido indol 3-acrílico	Alcaloide	1.86	188.0703	188.0708	C ₁₁ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	-2.42	30.75
ID_ 152	3,4-dihidroxiifeniletlenoglicol	Ácidos orgânicos e derivados	1.32	171.0652	171.0648	C ₈ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	2.12	7.81
ID_ 3699	Ácido 12-hidroxiioctadec-9-enoico	Ácidos graxos e derivados	14.23	293.2112	293.2108	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	[M-H ₄ O ₂ +H] ⁺	1.29	5.13
ID_ 3288	Ácido 8-hidroxiioctadeca-9,11-diinoico	Ácidos graxos e derivados	13.89	275.2006	275.2003	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	[M-H ₂ O+H] ⁺	0.99	3.69
ID_ 5047	Curlone	Terpenoides	15.05	219.1749	219.1742	C ₁₅ H ₂₂ O	[M+H] ⁺	3.18	3.15
ID_ 1635	Hexoato de etila	Ácidos graxos e derivados	9.01	183.0785	183.0779	C ₆ H ₁₆ O ₂	[M+K] ⁺	3.30	2.87
ID_ 4333	Ácido 12-hidroxiheptadeca-8,10,14-trienoico	Ácidos graxos e derivados	14.58	281.2111	281.2109	C ₁₇ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	0.54	2.86
ID_ 1463	Glicilfenilalanileucilglicina	Aminoácidos e derivados	7.88	393.2138	393.2132	C ₁₉ H ₂₉ N ₄ O ₅	[M+H] ⁺	1.50	2.76
ID_ 6101	Ácido 5-hidroxi-4-metilpent-3-enil-6,10-dimetilundeca-2,6,10-trienoico	Ácidos graxos e derivados	15.97	324.2539	324.2535	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	[M+H ₃ N+H] ⁺	1.15	2.64
ID_ 5284	3-hidroxitetradecanoico	Ácidos graxos e derivados	15.21	267.1936	267.1953	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	[M+Na] ⁺	-6.42	2.46
ID_ 6131	8-hidroxi-1-feniloctan-3-ona	Ácidos orgânicos e derivados	15.98	203.1428	203.1423	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	[M-H ₂ O+H] ⁺	2.31	2.40
ID_ 5266	Turmerona	Terpenoides	15.21	217.1592	217.1583	C ₁₅ H ₂₀ O	[M+H] ⁺	4.00	2.22
ID_ 5893	Ácido 16-hidroxiheptadec-2-enoico	Ácidos graxos e derivados	15.76	307.2249	307.2264	C ₁₇ H ₃₂ O ₃	[M+Na] ⁺	-4.93	2.18

ID_ 5239	Ácido 9-oxooctadeca-10,12,15-trienoico	Ácidos graxos e derivados	15.20	275.2006	275.2005	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	[M-H ₂ O+H] ⁺	0.49	2.15
Folha Velha									
ID_ 325	Ácido indol 3-acrílico	Alcaloide	1.86	188.0703	188.0708	C ₁₁ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	-2.42	11.47
ID_ 5277	Ácido 2-prop-1-en-2-ildecanoico	Ácidos graxos e derivados	15.21	235.1674	235.1691	C ₁₃ H ₂₄ O ₂	[M+Na] ⁺	-7.31	3.89
ID_ 3545	ácido smaditerpênico C	Terpenoides	14.07	323.2222	323.2214	C ₁₉ H ₃₁ O ₄	[M+H] ⁺	2.33	3.87
ID_ 1635	Hexoato de etila	Ácidos graxos e derivados	9.01	183.0785	183.0779	C ₆ H ₁₆ O ₂	[M+K] ⁺	3.30	3.70
ID_ 328	Triptofano	Alcaloide	1.86	205.0977	205.0972	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	2.24	3.18
ID_ 6131	8-hidroxi-1-feniloctan-3-ona	Ácidos orgânicos e derivados	15.98	203.1428	203.1423	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	[M-H ₂ O+H] ⁺	2.31	2.78
ID_ 6118	8,8-dihidroxi-trans-neoxantina	Ácidos orgânicos e derivados	15.97	635.4289	635.4279	C ₃₈ H ₆₀ O ₆	[M+H] ⁺	1.59	2.71
ID_ 3338	Ácido 3-hidroxi-12-metiltridecanoico	Ácidos graxos e derivados	13.91	267.1936	267.1952	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	[M+Na] ⁺	-6.15	2.64
ID_ 5266	Turmerona	Terpenoides	15.21	217.1592	217.1583	C ₁₅ H ₂₀ O	[M+H] ⁺	4.00	2.57
ID_ 4333	Ácido 12-hidroxiheptadeca-8,10,14-trienoico	Ácidos graxos e derivados	14.58	281.2111	281.2109	C ₁₇ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	0.54	2.57
ID_ 5271	Ácido 2,6-hexadecadiinoico	Ácidos graxos e derivados	15.20	249.1855	249.1847	C ₁₆ H ₂₄ O ₂	[M+H] ⁺	3.27	2.46
ID_ 5260	Diéster de betulina	Terpenoides	15.21	671.4518	671.4488	C ₄₀ H ₆₂ O ₈	[M+H] ⁺	4.50	2.44
ID_ 5284	3-hidroxitetradecanoico	Ácidos graxos e derivados	15.21	267.1936	267.1953	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	[M+Na] ⁺	-6.42	2.42
ID_ 2465	Ácido 9,10,13-trihidroxiocetadeca-11,15-dienoico	Ácidos graxos e derivados	12.61	346.2582	346.2586	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	[M+H ₂ O+H] ⁺	-1.09	2.35
ID_ 6116	Muuro-la-4,10(14)-dien -3-ona	Terpenoides	15.98	219.1749	219.1743	C ₁₅ H ₂₃ O	[M+H] ⁺	2.90	2.34

NA= não anotado

TABELA A.8 - Anotação química dos compostos que apresentaram os maiores valores de VIP Score nas folhas de soja no estágio de desenvolvimento V5 e tratamento.

ID	Presumível Metabólito de Soja	Taxonomia Química	TR	[M+H] ⁺ Teórico	[M+H] ⁺ Experimental	Fórmula Molecular	Aduto	Erro (ppm)	VIP Score
ID_ 217	Ácido 2,3,4-trihidroxi-5-([3-(4-hidroxifenil)prop-2-enoil]oxi)hexanodioico	Ácidos cinâmicos e derivados	1.54	374.1087	374.1077	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀	[M+H ₃ N+H] ⁺	2.55	1.40
ID_ 1209	7-(hidroximetil)-4-([3,4,5-trihidroxi-6-([3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi)metil]oxan-2-il]oxi)metil-ciclopenta[c]piran-1-il 3-metilbutanoato	Carboidratos e derivados	6.39	624.2867	624.2860	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₅	[M+H ₃ N+H] ⁺	1.12	1.40
ID_ 619	Ácido 5-[[5-[3,4-dihidroxi-4-(hidroximetil)tetra-hidrofuran-2-il]oxi-3,4-dihidroxi-6-(2-metil-4-oxo-piran-3-il)oxi-tetrahidropiran-2-il]metoxi]-3-hidroxi-3-metil-5-oxo-pentanoico	Carboidratos e derivados	3.12	565.1769	565.1760	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	1.57	1.40
ID_ 916	NA	Terpenoides	4.74		209.1533				1.40
ID_ 1280	2-butil-4-metoxi-6,6-dimetilciclohexa-2,4-dien-1-ona	Terpenoides	6.60	209.1542	209.1533	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	[M+H] ⁺	4.29	1.39
ID_ 1111	2-oxo-4-(2,6,6-trimetilciclohexen-1-il)butanal	Terpenoides	6.04	209.1542	209.1533	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	[M+H] ⁺	4.31	1.39
ID_ 1281	6-[[6-[6-(2-etil-4,5-dihidroxi-6-metiloxan-3-il)oxi-4,5-dihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-4,5-dihidroxi-2-metiloxan-3-il]amino]-4-(hidroximetil)ciclohex-4-eno-1,2,3-triol	Carboidratos e derivados	6.60	624.2852	624.2858	C ₂₇ H ₄₇ NO ₁₆	[M-H ₂ O+H] ⁺	-0.97	1.39
ID_ 883	5-hidroxi-1,3-dimetil-2-(3-oxobutil)ciclohex-2-eno-1-carbaldeído	Terpenoides	4.54	207.1372	207.1376	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	[M-H ₂ O+H] ⁺	-1.93	1.38
ID_ 1211	6,10-dimetilundeca-5,9-dieno-2,8-diona	Terpenoides	6.39	209.1542	209.1534	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	[M+H] ⁺	3.88	1.38
ID_ 1254	Ácido 2-[4-butan-2-il]fenil]propanoico	Terpenoides	6.46	189.1275	189.1270	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	[M-H ₂ O+H] ⁺	2.47	1.38
ID_ 289	Ácido 1-[3-(4-hidroxifenil)prop-2-enoiloxi]propano-1,2,3-tricarboxílico	Ácidos cinâmicos e derivados	1.77	339.0716	339.0707	C ₁₅ H ₁₄ O ₉	[M+H] ⁺	2.74	1.38
ID_ 875	4-(2,4-dimetoxifenil)-3-metilbutan-2-ol	Benzoide	4.52	225.1485	225.1476	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	[M+H] ⁺	3.86	1.37
ID_ 791	NA		4.02		209.1533				1.37

ID_ 1074	4-[4-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-il]but-3-eno-2,2-diol	Terpenoides	5.85	209.1542	209.1533	C ₁₃ H ₂₂ O ₃	[M-H ₂ O+H] ⁺	4.47	1.36
ID_ 1868	NA		10.30		589.2487				1.36
ID_ 2162	NA	Carboidratos e derivados	11.78		623.8004				1.36
ID_ 1906	2-[2-amino-3-3,4,5-tri-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxipropoxi]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol	Carboidratos e derivados	10.52	457.205	457.2066	C ₂₀ H ₃₄ O ₁₀	[M+Na] ⁺	-3.46	1.36
ID_ 2449	3,4,5-trihidroxi-6-[4,5,6-trihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxioxan-2-il]metil heptadecanoato	Ácidos graxos e derivados	12.60	595.3694	595.3684	C ₂₉ H ₅₄ O ₁₂	[M+H] ⁺	1.75	1.35
ID_ 799	1-(3-hidroxi-2,6,6-trimetil-ciclohexa-1,3-dien-1-il)but-2-en-1-ona	Terpenoides	4.04	207.1385	207.1377	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	[M+H] ⁺	4.10	1.35
ID_ 215	Cafeoil C1-glucuronídeo	Ácidos cinâmicos e derivados	1.53	357.0822	357.0812	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀	[M+H] ⁺	2.90	1.35
ID_ 288	2-(2-oxoetenil)benzaldeído	Benzoide	1.77	147.0442	147.0438	C ₉ H ₆ O ₂	[M+H] ⁺	2.82	1.35
ID_ 218	Cumarina	Cumarinas e derivados	1.54	147.0436	147.0437	C ₉ H ₈ O ₂	[M+H] ⁺	-0.86	1.35
ID_ 293	Ácido cafeíco 4- <i>O</i> -glucuronídeo	Ácidos cinâmicos e derivados	1.77	357.0822	357.0813	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀	[M+H] ⁺	2.64	1.35
ID_ 2167	Teasaponina A5	Terpenoides	11.78	1245.5878	1245.5881	C ₆₀ H ₉₄ O ₂₈	[M-H ₂ O+H] ⁺	-0.24	1.35
ID_ 287	Ácido cafeíco 4- <i>O</i> -glucuronídeo	Ácidos cinâmicos e derivados	1.7653831	374.1087	374.1077999	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀	[M+H ₃ N+H] ⁺	2.406074921	1.3462

NA= não anotado

TABELA A.9 - Anotação química dos compostos induzidos, identificados pelo *volcano*, na folha jovem da soja no estágio V5.

ID	Presumível Metabólito de Soja	Taxonomia Química	TR	[M+H] ⁺ Teórico	[M+H] ⁺ Experimental	Fórmula Molecular	Aduto	Erro (ppm)	log ₂ (FC)
Folha Jovem									
ID_ 1144	6-O-(beta-1-ramnopiranosil)-D-glicose	Carboidratos e derivados	6.19	309.1172	309.1179	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₀	[M-H ₂ O+H] ⁺	-2.21	4.01
ID_ 4372	Ácido tridecanodioico	Ácidos graxos e derivados	14.61	227.1638	227.1641	C ₁₃ H ₂₄ O ₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	-1.12	0.34
ID_ 3943	Ácido 9-oxooctadeca-10,12,15-trienoico	Ácidos graxos e derivados	14.37	275.2006	275.2004	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	[M-H ₂ O+H] ⁺	0.84	0.43
ID_ 5189	Ácido 16-hidroxihexadecanoico	Ácidos graxos e derivados	15.15	251.1996	251.2002	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	[M-H ₂ O+H] ⁺	-2.28	0.47
ID_ 4564	Ácido 3-hidroxi-10-metil-6-fenilmetoxiundecanoico	Ácidos graxos e derivados	14.73	305.2111	305.2110	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	0.45	0.48

TABELA A.10 - Teste de Kruskal Wallis comparando os pesos das lagartas quando alimentadas com folhas de soja de plantas nos estágios de desenvolvimento (VC, V2 e V5).

	Estágio	n1	n2	Estatística	p	p.adj	p.adj.signif
VC	V2	38	38	-7.28	3.36E-13	1.01E-12	****
VC	V5	38	38	-1.37	1.72E-1	1.72E-1	ns
V2	V5	38	38	5.91	3.38E-9	6.76E-9	****

ns= não significante.

TABELA A.11 - Teste de Kruskal Wallis comparando os pesos das lagartas quando alimentadas com folhas controle (sem herbivoria) e induzida (com herbivoria) entre os estágios de desenvolvimento (VC, V2 e V5) da soja.

grupo1	grupo2	n1	n2	Estatística	p	p.adj	p.adj.signif
VCC	VCI	19	19	1.12	2.62E-01	1 e+0	ns
VCC	V2C	19	19	-4.9	9.56E-07	1.15E-05	****
VCC	V2I	19	19	-4.27	1.93E-05	1.93E-04	***
VCC	V5C	19	19	-1.33	1.85E-01	9.26E-01	ns
VCC	V5I	19	19	0.513	6.08E-01	1 e+0	ns
VCI	V2C	19	19	-6.02	1.72E-09	2.58E-08	****
VCI	V2I	19	19	-5.39	6.90E-08	8.97E-07	****
VCI	V5C	19	19	-2.45	1.44E-02	1.01E-01	ns
VCI	V5I	19	19	-0.609	5.43E-01	1 e+0	ns
V2C	V2I	19	19	0.628	5.30E-01	1 e+0	ns
V2C	V5C	19	19	3.58	3.50E-04	3.15E-03	**
V2C	V5I	19	19	5.41	6.18E-08	8.65E-07	****
V2I	V5C	19	19	2.95	3.21E-03	2.57E-02	*
V2I	V5I	19	19	4.79	1.71E-06	1.88E-05	****
V5C	V5I	19	19	1.84	6.61E-02	3.96E-01	ns

ns= não significante.

TABELA A.12: Teste de ANOVA para os pesos das pupas.

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Estágio	38959	2	26.521	4.27E-10
Tratamento	743	1	1.0113	0.31683

Estágio: Tratamento 4422 2 3.0101 0.05344

TABELA A.13 - Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para os pesos das pupas.

	Contrast	Estimate	SE	Df	t.ratio	p.value
VC	C - I	12.1	8.79	108	1.374	0.1724
V2	C - I	-10.3	8.79	108	-1.176	0.2421
V5	C - I	-17.1	8.79	108	-1.939	0.0551

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t-value	Pr(> t)	
V2 - VC	29	6.218	4.664	<1e-04	***
V5 - VC	44.618	6.218	7.176	<1e-04	***
V5 - V2	15.618	6.218	2.512	0.0356	*

TABELA A.14 - Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) inter e intra estágios da razão sexual para os pesos das pupas.

Estágio	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VC	F - M	1.67	8.86	108	0.188	0.8511
V2	F - M	-19.04	8.9	108	-2.14	0.0346
V5	F - M	-10.44	10.41	108	-1.003	0.3179

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
V2 - VC	28.042	6.278	4.467	<1e-04 ***
V5 - VC	41.915	6.833	6.134	<1e-04 ***
V5 - V2	13.873	6.845	2.027	0.11

TABELA A.15 - Teste de ANOVA para os pesos secos dos adultos.

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Estágio	0.0005142	2	8.6691	0.0003660 ***
Tratamento	0.00002891	1	0.9748	0.326195
Estágio: Tratamento	0.00049797	2	8.3953	0.0004603 ***
Residual	0.00260985	88		

TABELA A.16 - Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para os pesos secos dos adultos

	Contrast	Estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VC	CL - I	0.00459	0.00184	88	2.493	0.0145
V2	CL - I	-0.00305	0.00199	88	-1.53	0.1295
V5	CL - I	-0.00632	0.00208	88	-3.034	0.0032

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
V2 - VC	0.000268	0.001357	0.197	0.97872
V5 - VC	0.004514	0.001391	3.246	0.00468 **
V5 - V2	0.004246	0.001442	2.945	0.01139 *

TABELA A.17 - Teste de ANOVA para o consumo foliar

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Estádio	86634	2	87.775	<2e-16 ***
Tratamento	0	1	0.0006	0.9804
Estádio:Tratamento	1097	2	1.111	0.3328
Residual	56259	114		

TABELA A.18 - Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para o consumo foliar

	Contrast	Estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VC	C - I	1.15	7.02	114	0.164	0.8703
V2	C - I	-8.05	7.02	114	-1.146	0.2542
V5	C - I	6.6	7.02	114	0.94	0.3495

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
V2 - VC	65.45	4.967	13.176	< 1e-06 ***
V5 - VC	38.725	4.967	7.796	< 1e-06 ***
V5 - V2	-26.725	4.967	-5.38	1.11e-06 ***