



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIEL DE AMORIM BARBOSA

**HERBIVORIA DE *Anticarsia gemmatalis* E *Chrysodeixis
includens* EM SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA PARA
TOLERÂNCIA A SECA**

DANIEL DE AMORIM BARBOSA

**HERBIVORIA DE *Anticarsia gemmatalis* E *Chrysodeixis
includens* EM SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA PARA
TOLERÂNCIA A SECA**

Defesa de Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno.
Coorientadora: Dra. Renata Fuganti Pagliarini.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Barbosa, Daniel de Amorim.

Herbivoria de *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* em soja convencional e geneticamente modificada / Daniel de Amorim Barbosa. - Londrina, 2018.
61 f. : il.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.

Coorientador: Renata Fuganti Pagliarini.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Herbivoria - Tese. 2. lagarta-da-soja - Tese. 3. lagarta-falsa-medideira - Tese. 4. AREB - Tese. I. Lima Nepomuceno, Alexandre . II. Fuganti Pagliarini, Renata . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

DANIEL DE AMORIM BARBOSA

**HERBIVORIA DE *Anticarsia gemmatalis* E *Chrysodeixis includens*
EM SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA PARA TOLERÂNCIA A
SECA**

Defesa de Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Liliane Marcia Mertz Henning
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA-Soja

Dr. Samuel Roggia
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA-Soja

Londrina, 22 de fevereiro de 2018.

*Dedico este Trabalho a Deus, que com sua infinita bondade me
concedeu graças inimagináveis.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina e à Embrapa Soja por me proporcionarem o espaço, a experiência e as condições necessárias para a realização deste trabalho;

À CAPES pelo suporte financeiro;

Ao JIRCAS e às demais parcerias japonesas, pela oportunidade de trabalhar neste projeto e contribuir nesse amplo ramo da genética vegetal;

Ao Laboratório de Entomologia da Embrapa Soja, por ceder o ambiente de trabalho com as Lagartas;

Ao laboratório de Tecnologia de Sementes e Grãos da EMBRAPA soja pelo auxílio nas análises de lignina.

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, por ter me concedido a oportunidade de ser seu orientado, e pelos ensinamentos científicos;

À minha amiga e co-orientadora Dra. Renata Fuganti Pagliarini, pelas correções, amizade e gentileza em sempre estar disposta a ajudar;

À minha amiga MSc. Silvana Regina Rockenbach Marin, que tanto me ajudou possibilitando que este trabalho fosse feito, sem ela não seria possível e;

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, principalmente à Mayla Molinari, que tanto me ajudou nesta caminhada.

À Dra. Silvia Sofia e demais pela estrutura administrativa do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UEL, pela boa vontade e auxílio;

Agradeço a minha mãe, Rosângela, que esteve ao meu lado independentemente de minhas escolhas, apoiando-me e viabilizando minha caminhada;

Ao meu companheiro, Luciano, por me ensinar a ser uma pessoa melhor e me apoiar em todos os momentos;

À minha irmã, Michele, com quem posso contar em qualquer situação;

Aos meus amigos Do Bonde, pela maravilhosa amizade e apoio eterno e;

À todos os professores que conheci nessa jornada, obrigado pelos ensinamentos.

Barbosa, Daniel de Amorim. **Herbivoria de *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* em soja geneticamente modificada para tolerância a seca.** 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2017.

RESUMO

A sojicultura é a atividade agrícola de maior importância no Brasil em virtude de sua escala de produção e dos valores que movimenta na economia nacional. Entretanto, lavouras do grão são frequentemente assoladas por diversos fatores abióticos sendo o déficit hídrico um dos principais e também bióticos, como o ataque de insetos-praga, que prejudicam o crescimento e o desenvolvimento das plantas e a produtividade final da cultura. Considerando que em muitos casos há uma resposta cruzada (*Crosstalk*) entre os diferentes tipos de estresse, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros de herbivoria para as lagartas desfolhadoras da soja *Chrysodeixis includens* e *Anticarsia gemmatalis*, nas linhagens de soja 1Ea2939 e 1Ea15 GMs com o gene *AtAREB1* para tolerância a seca, e na sua isolinha, a cultivar convencional BR 16. O teor de lignina, a expressão do transgene e de alguns genes relacionados a via de biossíntese da lignina também foram analisados. Lagartas de terceiro instar foram utilizadas para avaliar o desenvolvimento, o consumo foliar e o peso das pupas. Para cada instar, foram utilizadas 50 placas, contendo folhas da cultivar BR 16 e dos eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15, que foram trocadas diariamente. Os resultados indicaram maior consumo diário foliar da cultivar BR 16, seguido da linhagem GM 1Ea2939 para *Anticarsia gemmatalis*. Para as lagartas de *Chrysodeixis includens* não houve diferenças estatísticas no consumo foliar total, porém o menor consumo diário foi registrado para o evento GM 1Ea15. Não houve diferenças estatísticas no desenvolvimento de lagartas de *Anticarsia gemmatalis*, no entanto, um menor tempo de desenvolvimento foi registrado para as lagartas que consumiram folhas da linhagem GM para 1Ea15. Lagartas de *Chrysodeixis includens* apresentaram, no entanto, um período de desenvolvimento mais longo quando consumiram folhas das linhagens GMs. Não foi encontrada diferença estatística significativa para o peso das lagartas de ambas as espécies analisadas, entretanto, para pupas, valores menores foram registrados para as que consumiram folhas da linhagem GM 1Ea15. Também não houve diferença quando o consumo foliar entre machos e fêmeas. Uma maior taxa de mortalidade, por deficiência na troca de instar, foi registrada para as lagartas que consumiram folhas da linhagem GM 1Ea15. O teor de lignina foi maior nas folhas das linhagens GMs quando comparado a cultivar convencional BR 16. A expressão do transgene *AtAREB1A* foi maior no evento 1Ea2939 se comparado ao evento 1Ea15. Os genes relacionados à biossíntese de lignina foram *up*-regulados no evento GM 1Ea15. Os dados obtidos sugerem que o evento 1Ea15 apresentou resultados promissores para o controle das lagartas desfolhadoras em razão de uma maior concentração de lignina nas folhas que pode ter dificultado a alimentação das lagartas e que provavelmente algum composto possa ser sintetizado neste evento que provoque a morte prematura das lagartas, no entanto, novos estudos para comprovar esta hipótese precisam ser realizados.

Palavras-chaves: Herbivoria. Lagarta-da-soja. Lagarta-falsa-medideira. *Glycine max* L. Merrill. AREB.

Barbosa, Daniel de Amorim. **Herbivory of *Anticarsia gemmatalis* and *Chrysodeixis includens* in genetically modified soybean for drought tolerance.** 2017. 61 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, 2017.

ABSTRACT

Soybean crop is the agricultural activity of major importance in Brazil due to its production and the values that moves national economy, participating actively in the GDP (gross domestic product) of agribusiness. However, grain crops are often plagued by numerous abiotic factors such as water deficit and also biotic, such as pest insects, which act throughout the crop cycle, hampering the development of plants and crop final productivity. Considering the importance of biotic factors in soybean and the advantage of offering to the producer, more than one characteristic of interest in the same lineage, the objective of this work was to evaluate herbivory parameters for soybean defoliation caterpillars *Anticarsia gemmatalis* and *Chrysodeixis includens*, in GM soybean lines for drought tolerance 1Ea2939 and 1Ea15 and in their isoline, the conventional cultivar BR 16. Lignin content, transgene *AtAREB1A* expression and the expression of genes evolved in the lignin biosynthesis pathway were also analyzed. Third instar larvae were used to evaluate daily leaves consumption, the development of caterpillars, pupae weight and sexing. For each instar, 50 plaques were used; containing leaves from BR 16 cultivar and from the GM events 1Ea2939 and 1Ea15, which were changed daily. Results showed a higher daily leaves consumption of the conventional cultivar BR 16 followed by the GM line 1Ea2939, for *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. No significant differences were identified to daily leaves consumption for *Chrysodeixis includens* caterpillars; however, a lower consumption was registered for GM event 1Ea15. There were no statistical differences in the development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars; nevertheless, a shorter development time was recorded for caterpillars that consumed leaves from the GM lineage 1Ea15. Caterpillars from *Chrysodeixis includens* showed, though, a longer development period when they consumed leaves of the GM strains. The weight recorded for the caterpillars did not present significant statistical difference for the different soybean leaves offered, whether they came from GM lines or not and there were also no differences in consumption for males or females. A higher mortality rate, due to difficulties in the exchange of instar, was recorded for caterpillars that ate up leaves from GM line 1Ea15. Lignin content was higher in leaves from GM lines when compared to conventional cultivar BR 16. The expression of the transgene *AtAREB1A* was higher in GM line 1Ea2939 when compared to line 1Ea15. Genes related to lignin synthesis pathway were up regulated in event 1Ea15. Data obtained here suggested that GM line 1Ea15 showed promising results to control foliage-feeding caterpillars, due to the higher concentration of lignin in leaves, which may have hampered caterpillar's feeding and also that, probably some compound could be synthesized in GM line 1Ea15 that causes the premature death of caterpillars; however, new studies to prove this hypothesis and possibly to identify and quantify such compounds need to be conducted.

Keyword: Herbivory. Soybean caterpillar. False-gauge. *Glycine max* L. Merrill. AREB.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de desenvolvimento da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. O ciclo se inicia quando a lagarta-da-soja na fase adulta (mariposa) oviposita durante a noite ovos individualizados que eclodem aproximadamente em três dias. Nesta fase larval, que passa por seis ínstares, as lagartas se alimentam de folha. Após o último ínstar larval, a lagarta entra na fase de pré-pupa. A seguir, a lagarta constrói uma câmara pupal, sob folhas secas na superfície do solo ou, mais frequentemente, até dois centímetros de profundidade. Dessas pupas emergem as mariposas, que acasalam na primeira noite após a emergência, iniciando a oviposição três a quatro dias depois, sendo que o pico de postura ocorre ao redor do quinto dia de vida do adulto. Fonte: Reid (1975); Silva et al. (2012); Moscardi et al. (2012).....23
- Figura 2.** Lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*). Fonte: Barbosa, D.A. (2017)23
- Figura 3.** Injúria causados na cultura da soja pela lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. Até o terceiro ínstar o consumo foliar é muito pequeno, pois as lagartas, ainda muito pequenas, não conseguem sequer perfurar as folhas, alimentando-se apenas dos tecidos mais tenros. Do quarto ao sexto ínstar, as lagartas consomem mais de 95% do total da área foliar, que varia de 100 a 120 cm² para cada lagarta. Fonte: Celoto, F. J. (2008).24
- Figura 4.** Ciclo de desenvolvimento de *Chrysodeixis includens*. O ciclo se inicia com a oviposição, pela fêmea de aproximadamente 700 ovos. O desenvolvimento embrionário se completa em torno de 2,5 dias, e as lagartas que eclodem. A fase larval dura cerca de 20 dias, e depois do último ínstar larval, a lagarta se transforma em pupa, que ocorre sob uma teia, em geral na face abaxial das folhas. O período pupal dura de 7 a 9 dias até a emergência dos adultos que são mariposas com 35 mm de envergadura de asas. A longevidade dos adultos é de aproximadamente de 15 dias e o acasalamento ocorre, habitualmente, entre 22h e 4h, reiniciando o ciclo. Fonte: Reid e Greene (1973); Vásquez (1988); Moscardi et al. (2012).26
- Figura 5.** Lagarta-falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) emergindo da exúvia do instar anterior. Fonte: Barbosa, D. A. (2017).....26
- Figura 6.** Injúria causada pela lagarta *Chrysodeixis includens* em folhas de soja. No primeiro e segundo ínstar, as lagartas apenas raspam as folhas, enquanto, a partir do terceiro ínstar, as lagartas conseguem a perfurar as folhas, consumindo o parênquima foliar e deixando as nervuras centrais e laterais intactas, proporcionando aspecto característico de folhas rendilhadas. Fonte: (B) Celoto, F. J. (2010) ; (A) Barbosa, D. A. (2017).27
- Figura 7.** Via da Biossíntese de Lignina. Fonte: Baldoni, A. (2010). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), 4-cumarate-CoA-Ligase (4CL), 4 Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H), Ferulato-5 Hidroxilase (F5H), Hidroxicinamato COA Redutase (CCR), Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), Cafeoil-CoA

	Ometiltransferase(CCoAOMT), Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like (COMT), Hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato transferase (HCT).....	31
Figura 8.	Consumo foliar diário em (cm ²) da Lagarta <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Anticarsia gemmatalis</i> na cultivar convencional de soja BR 16 e nos respectivos eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15. Teste Tukey (p≤0,05). Letras maiúsculas comparam linhagens GMs e cultivar convencional.	47
Figura 9.	Desenvolvimento da Lagarta <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Anticarsia gemmatalis</i> na cultivar convencional de soja BR 16 e nos respectivos eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15. Teste Tukey (p≤0,05). Letras maiúsculas comparam linhagens GM e cultivar convencional.	48
Figura 10.	Peso de pupa (g) das lagartas <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Chrysodeixis includens</i> registrados quando estas foram alimentadas com folhas da cultivar convencional de soja BR 16 e com os eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15. Teste Tukey (p≤0,05). Letras maiúsculas comparam pesos dentro da mesma linhagem GM ou cultivar convencional.	49
Figura 11.	Mortalidade da lagarta <i>Chrysodeixis includens</i> por estrangulamento, na troca de instar. Estas mortes foram registrados quando do consumo de folhas de soja dos eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15, Em A, morte por estrangulamento na região final do corpo da lagarta, e em B, morte por estrangulamento na região intermediária do corpo da lagarta e C morte de <i>Anticarsia gemmatalis</i> na região mediana do corpo. Fonte: Barbosa, D. A. (2017).....	50
Figura 12.	Determinação do Teor de Lignina na Folha na cultivar convencional de soja BR 16 e nos respectivos eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15. Teste Tukey (p≤0,05). Letras maiúsculas comparam Teor dsulte lignina dentro da mesma linhagem GM ou cultivar convencional.	51
Figura 13.	Quantificação da expressão gênica relativa dos genes <i>AtAREB1A</i> , e genes da biossíntese de lignina, Cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD) (Glyma.10G262400), Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like (COMT) (Glyma.06G137100), 4 Coumarato-CoA-ligase (4CL) (Glyma.11G194500), Ferulate 5-hydroxylase (F5H) (Glyma.01G169200), Phenylalanine ammonia lyase (PAL) (Glyma.19G182300), Cinnamoyl Coa Redutase (CCR) (Glyma.19G006900), Cafeoil-CoA Ometiltransferase (CCoAOMT) (Glyma.07G21470), Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H) (Glyma.03G122000) e Hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato transferase (HCT) (Glyma.07G021600) via RT-qPCR. Os valo res inferiores e superiores a 1 representam, respectivamente, genes <i>down</i> e <i>up</i> regulados em relação ao calibrador, a cultivar convencional de soja BR 16.	51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** As sequências de genes e primers utilizados na análise de RT-qPCR da biossíntese de lignina em soja.....46
- Tabela 2.** Mortalidade da lagarta *Chrysodeixes includens* e *Anticarsia gemmatalis* na cultivar de soja BR 16 e nos eventos GMs1Ea2939 e 1Ea15, por motivo aparente.49

LISTA DE SIGLAS

ABA	Ácido Abscisico
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CV	Casa de Vegetação
CO ²	Dióxido de Carbono
EUA	Estados Unidos da América
FT	Fator de Transcrição
GMs	Geneticamente Modificados
OGMs	Organismos Geneticamente Modificado
PGMs	Plantas Geneticamente Modificadas
PIB	Produto Interno Bruto
RT-qPCR	Transcrição Reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase de natureza quantitativa
CAD	Cinnamyl-alcohol dehydrogenase
COMT	Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like
4CL	4 Coumarato-CoA-ligase
F5H	Ferulate 5-hydroxylase
PAL	Phenylalanine ammonia lyase
CCR	Cinnamoyl Coa Redutase
CCoAOMT	Cafeoil-CoA Ometiltransferase
C3H	Hidroxicinamato 3-Hidroxilase
HCT	Hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato transferase

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	A CULTURA DA SOJA E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	17
2.2	ALGUNS PROBLEMAS DA SOJICULTURA	18
2.2.1.	FATOR ABIÓTICO: O DÉFICIT HÍDRICO.....	18
2.2.2	FATOR BIÓTICO: LAGARTAS DESFOLHADORAS.....	21
2.2.2.1	<i>ANTICARSIA GEMMATALIS</i>	21
2.2.2.2	<i>CHRYSODEIXIS INCLUDENS</i>	24
2.2.3	<i>RESISTENCIA DE PLANTAS A INSETOS</i>	27
2.3	BARREIRA FÍSICA DE RESISTÊNCIA: LIGNINA.....	29
3.	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ARTIGO - Análise molecular e de parâmetros de herbivoria de <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Chrysodeixis includens</i> em soja GM com o gene <i>AtAREB1A</i>		
	AtAREB1A	39
1.	INTRODUÇÃO	40
2.	MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1	ENSAIO DE HERBIVORIA	42
2.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIGNINA.....	43
2.3	RT-QPCR.....	44
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
3.	RESULTADOS	47
3.1	CONSUMO FOLIAR.....	47
3.2	DESENVOLVIMENTO.....	47
3.3	PESO DE PUPA	48
3.4	MORTALIDADE	49
3.5	TEOR DE LIGNINA	50

3.6	EXPRESSÃO GÊNICA	51
4.	DISCUSSÃO	52
	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultura originada na Ásia, foi introduzida no Brasil em 1882. O primeiro registro de seu cultivo comercial foi em 1914 (CI SOJA, 2017), mas a partir da década de 70, o grão passou a ocupar milhares de hectares e conquistou posição de destaque na economia nacional. Por ser um grão muito versátil é utilizado na agroindústria, indústria química, de alimentos e mais recentemente foi introduzido como matéria-prima na produção de biodiesel (EMBRAPA, 2017d).

Nos últimos anos, a produção de soja vem crescendo em produtividade e importância na produção brasileira total de grãos (CONAB, 2017), graças aos avanços de novas tecnologias e ao uso de produtos químicos para o controle de pragas. No entanto, ainda assim, o plantio em larga escala (sistema de monocultura) em uma mesma região favorece o aumento da incidência de insetos pragas como a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*, Lepidoptera: Noctuidae) e a falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*), cujo ataque, diminui a área fotossintetizante e, conseqüentemente afeta a produtividade final da soja. Aliado a uma infestação que ocorre naturalmente na lavoura, nos últimos anos, os prejuízos decorrentes da presença de insetos pragas têm aumentado devido principalmente às mudanças climáticas globais, que modificam as temperaturas e os regimes de chuvas, alterando o ciclo biológico dos insetos e o equilíbrio do ecossistema (PRITCHARD; AMTHOR, 2005; GHINI, 2006). E para o futuro próximo, as projeções não são promissoras, ao contrário, segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2017) o aumento da temperatura média do planeta será em torno de 2.5°C nos próximos 100 anos, e em cenários mais pessimistas, o aumento gira em torno de 5°C, o que poderá provocar uma mudança significativa no mapa da agricultura brasileira, gerando uma redução de áreas produtoras e prejuízos econômicos de cerca de R\$ 7,4 bilhões em 2020 e de R\$ 14 bilhões em 2070 (ASSAD; PINTO, 2008). Além das consequências financeiras, os produtores precisarão manter a produção para suprir a demanda mundial por alimentos em ambientes mais severos, exigindo das culturas maior resistência e tolerância aos fatores bióticos e abióticos.

Neste contexto, o desenvolvimento de plantas mais tolerantes às adversidades ambientais tem sido alvo cada vez mais frequente de pesquisas

científicas, e as ferramentas oriundas da biotecnologia poderão ser uma alternativa viável e acessível para o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGMs) (BARBOSA et al., 2012) com resistência a insetos-pragas e tolerância a fatores abióticos como a seca, um fator ambiental que assola as lavouras e que nos últimos anos vêm se aumentando em frequência e intensidade e provocando perdas financeiras significativas.

Buscando alternativas para minimizar os problemas decorrentes do déficit hídrico, linhagens de soja geneticamente modificadas foram obtidas contendo o fator de transcrição ABA-dependente de *Arabidopsis thaliana AtAREB1A* e o Promotor 35s (BARBOSA et al., 2012). Estas plantas foram caracterizadas em condições de casa de vegetação (BARBOSA et al., 2012; MARINHO et al., 2015) e em condições de campo experimental por duas safras consecutivas (FUGANTI-PAGLIARINI et al., 2017) e os resultados foram promissores para tolerância à seca. No entanto, nenhum estudo com fatores bióticos foi realizado.

Assim, considerando-se que linhagens GMs que contenham mais de uma característica favorável a oferecer ao produtor serão provavelmente aceitas com maior facilidade, podendo ser utilizadas em uma gama maior de ambientes, e assim minimizar perdas de produção financeiras em ambientes onde ocorram fatores bióticos como as lagartas desfolhadoras e abióticos como o déficit hídrico combinados ou isolados (VASCONCELOS et al., 2012; MARTINS et al., 2016), e ainda no contexto do cenário climático vindouro, e atendendo à necessidade de cultivares mais adaptadas a fatores bióticos e abióticos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar parâmetros de herbivoria para as linhagens de soja 1Ea2939 e 1Ea15, geneticamente modificada com o fator de transcrição *AtAREB1* para tolerância à seca, e para sua isolinha, a cultivar convencional BR 16 (*background* genético), para as principais lagartas desfolhadoras da soja *A. gemmatalis* e *C. includens*. O nível de expressão do gene *AtAREB1* e de alguns genes conhecidos da via da lignina e os teores de lignina nas folhas, nas linhagens GMs e em seu *background* genético, a cultivar convencional BR 16.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A CULTURA DA SOJA E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma cultura de origem asiática que foi introduzida no Brasil em 1882, pelo professor Gustavo Dutra da Escola de Agronomia da Bahia. O primeiro registro de cultivo comercial no Brasil ocorreu em 1914, no município de Santa Rosa, RS, mas foi somente a partir dos anos de 1940 que ela adquiriu importância econômica. A soja é um grão bastante versátil, considerado fonte de proteínas, fibras, macronutrientes, minerais e outros metabólitos secundários como isoflavonas (SAKAI; KOGISO, 2008). Derivam dele também vários produtos e subprodutos da agroindústria tais como farinha de soja desengordurada para fabricação de produtos alimentícios (barra de cereais, balas, alimentos dietéticos, bebidas à base de soja, proteína texturizada de soja) e usos industriais (adesivos); farelo de soja para produção de ração animal (bovinos, aves, suínos, peixes e animais domésticos); proteína isolada para uso comestível (aditivos de alimentos e produtos análogos da carne) e usos industriais (formador de espuma, fabricação de fibra); na forma de grão para produção de alimentos como molho de soja, queijo de soja, soja torrada, fermentada e através do óleo cru produz-se óleo refinado, lecitina, glicerol, esteróis (antioxidantes) e ácidos graxos usados na indústria farmacêutica, cosmética e também alimentícia (APROSOJA, 2016; EMBRAPA, 2017c). Além disso, a soja se constitui, nos últimos anos, uma alternativa para fabricação de biodiesel, sendo responsável hoje por 80% da produção deste combustível no Brasil (ANP, 2016).

Nas últimas décadas, nosso país teve um crescimento de área plantada com soja de 49%; avanço que se deve principalmente à busca por novas tecnologias, ao manejo correto e à eficiência dos produtores ao utilizar técnicas de plantio direto e o sistema integração-lavoura-pecuária a fim de diminuir o impacto ao meio ambiente (MAPA, 2017). Estas boas práticas, aliadas ao clima favorável em todas as regiões produtoras brasileiras resultaram na safra de 2016/2017, em uma área plantada de 33.914,9 mil hectares, em uma produção de 114.095,8 mil toneladas, 2%, maior que a safra anterior (2015/16) (CONAB, 2017). No cenário mundial, o Brasil figura como segundo produtor, atrás apenas dos EUA o primeiro produtor mundial que atingiu na safra 2016/2107 uma produção de 117,208 milhões de toneladas, em uma área plantada de 33,482 milhões de hectares (EMBRAPA, 2017d).

Como uma importante commodity para o agronegócio nacional, o complexo soja, em 2017, liderou na balança comercial, a pauta das exportações do país com 41.2% sobre o total exportado, com ingresso de mais US\$ 16 bilhões (MAPA, 2017). Cabe ressaltar que o agronegócio como um todo é responsável por cerca de 20% do PIB do Brasil e embora o país seja também exportador mundial de açúcar, café, suco de laranja e carne de frango, e o segundo maior exportador de carne e milho, a soja é a mais economicamente importante commodity agroindustrial produzida e exportada (COLUSSI et al, 2016; VERGARA et al., 2017).

2.2 ALGUNS PROBLEMAS DA SOJICULTURA

2.2.1. Fator Abiótico: O déficit hídrico

Sabe-se que a cultura da soja, como qualquer outra cultura economicamente importante está constantemente exposta a fatores ambientais bióticos e abióticos, que interferem no crescimento e desenvolvimento da planta, afetando sua produtividade e distribuição espacial e, muitas vezes, a qualidade do produto final (BARBOSA et al., 2012). Entre os fatores climáticos que por si só afetam de forma impactante as lavouras, a seca é a condição ambiental que mais interfere na produção do grão podendo levar a perdas de até 80% (FARIAS, 2011).

Apesar dos números positivos da produção brasileira de soja, nos últimos anos devido ao aumento da frequência e intensidade dos períodos de seca, decorrentes principalmente das mudanças climáticas, as perdas na produtividade têm sido recorrentes e expressivas (JICA, 2017; EMBRAPA, 2017b). Em vários estados produtores, os números mostram perdas recorrentes em períodos de seca. Na safra 2004/2005, quando uma rigorosa seca ocorreu, o Rio Grande do Sul sofreu uma queda de 78% na produção (FARIAS et al., 2011). Ainda neste estado, a estiagem levou a uma redução média de 22% na produtividade da safra 2007/2008, gerando prejuízos em torno de R\$ 1,6 bilhão (EMBRAPA, 2017a). Mais recentemente, na safra 2013/14, as perdas econômicas atingiram um valor próximo a R\$ 9.2 bilhões, com base nos dados estimados. Em termos regionais, na safra 2013/2014, a Região Sul foi a mais afetada economicamente, com uma perda estimada em cerca de R\$ 3.6 bilhões. O Paraná, segundo maior estado produtor da oleaginosa, apresentou reduções recordes nesta safra, resultado de uma lavoura afetada pela ausência de chuvas e por altas temperaturas entre janeiro e fevereiro,

fases importantes do desenvolvimento do grão (SEAB, 2016; CONAB, 2014). No Rio Grande do Sul, apesar do forte incremento na área plantada, a má distribuição das chuvas ao longo do ciclo produtivo prejudicou o desenvolvimento da cultura, provocando uma redução de 4% nos níveis de produtividade. Perdas na Região Sudeste também foram registradas. Em Minas Gerais, maior produtor regional, a estiagem associada a altas temperaturas em fases importantes da lavoura provocaram significativas perdas de produtividade, reduzindo-a em 10,7%. No estado de São Paulo, mesmo com o grande incremento da área plantada, as adversidades climáticas provocaram forte redução na produtividade (30,2%). A produção estimada para a Região Sudeste atingiu 5 mil toneladas, representando uma redução de 7,6% (CONAB, 2017). Em números, os valores acumulados em perdas decorrentes de períodos de déficit hídrico nos últimos anos (dados registrados a partir das safras 1976/77 até 2013/2014) alcançam a cifra de US\$ 79,62 bilhões (FERREIRA, 2016).

Cabe ressaltar que os problemas decorrentes do déficit hídrico não são restritos a algumas áreas produtoras, ao contrário, a seca hoje vem sendo considerada um problema global, pois as áreas atingidas estão se expandindo e a expectativa futura é de que nas próximas décadas, aliado ao déficit hídrico, ocorram ainda, aumentos significativos da temperatura média global e da concentração de gases na atmosfera, principalmente dióxido de carbono (CO₂), acarretando em mudanças climáticas por todo o planeta (ASSAD; PINTO, 2008; JAGGARD et al., 2010).

Desta forma, em um futuro próximo, os pesquisadores terão que lidar com estresses bióticos e abióticos mais severos interferindo diretamente na produção, frequentemente em áreas de plantio já sofridas, diminutas e desgastadas. Aliado a este cenário, segundo Malthus a população cresce geometricamente e a produção de alimentos de forma aritmética (ALVES, 2002). Assim, com o aumento da população mundial, que será em torno de 9,8 bilhões de pessoas em 2050, a necessidade do aumento na produção de alimentos tornar-se-á evidente diante das mudanças climáticas, da degradação dos solos e da escassez de água (ONU, 2017).

Várias estratégias podem e devem ser utilizadas para minimizar e reduzir os danos decorrentes de longos períodos de déficit hídrico. Uma delas é o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGMs), através do uso de

ferramentas de biotecnologia. Neste contexto, e visando desenvolver estratégias que diminuam os prejuízos decorrentes do déficit hídrico, a equipe de Biotecnologia da Embrapa Soja vem trabalhando fortemente no desenvolvimento de plantas de soja GM para tolerâncias a seca, através de métodos de transformação de plantas, contendo o fator de transcrição ABA-dependente de *Arabidopsis thaliana* *AtAREB1A*. Estas linhagens GMs foram caracterizadas para tolerância à seca em condições de casa de vegetação (CV) e de campo. Os resultados obtidos foram promissores. Em CV, as linhagens transgênicas tiveram melhor performance em experimentos de sobrevivência e rendimento, e as análises do potencial hídrico revelaram que tais linhagens armazenaram maior quantidade de água no substrato, sugerindo a ativação nas plantas GMs de um mecanismo de evitamento à seca em razão da manutenção das trocas gasosas sob déficit hídrico devido à conservação de água no substrato na condição controle (MARINHO et al., 2015). Em condições de campo, a linhagem GM *AtAREB1A* 1Ea2939 apresentou maior uso intrínseco da água, maior índice de área foliar e maior rendimento em comparação aos demais eventos GMs e cultivares convencionais de soja (FUGANTI-PAGLIARINI et al, 2017). Estes resultados mostraram que a inserção do FT *AtAREB1A* em soja aumentou a tolerância à seca. No entanto, nenhuma caracterização para fatores bióticos, tais como insetos-pragas foi realizada nestes estudos.

Embora essas plantas GMs ainda não tivessem sido caracterizadas em relação aos aspectos bióticos, na safra 2013/2014, pesquisadores que conduziam um experimento em campo, observaram menores injúrias por lagartas desfolhadoras nas parcelas que continham linhagens *AtAREB1A*. Diante destas observações, alguns testes exploratórios foram conduzidos e verificou-se um menor consumo de folhas das linhagens GM contendo a construção *AtAREB1A* em relação a sua respectiva isolinha a cultivar BR 16. Portanto, considerando-se que linhagens GMs que contenham mais de uma característica favorável a oferecer, como a tolerância ao déficit hídrico, serão provavelmente aceitas com maior facilidade pelo produtor, podendo ser utilizadas em uma gama maior de ambientes, e assim minimizar perdas de produção e financeiras em ambientes onde ocorram os fatores bióticos e abióticos combinados ou isolados, este grupo de pesquisadores optou pela condução de estudos com estas linhagens GMs envolvendo fatores bióticos, tais como as lagartas desfolhadoras *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*.

2.2.2 Fator Biótico: Lagartas Desfolhadoras

A cultura soja, desde a semeadura, até a colheita está sujeita ao ataque de pragas, que, pela sua ocorrência, causam danos econômicos significativos à cultura e, conseqüentemente, diminuem o rendimento ou a qualidade do produto final.

Várias espécies de insetos se alimentam de folhas de soja. Entre os artrópodes que causam desfolha direta, as lagartas são importantes e entre elas a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), merece atenção por sua abundância e ocorrência frequente em todas as regiões do país onde a soja é cultivada. Alguns outros noctuídeos, como a lagarta-falsa-medideira, *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]), vem se destacando como desfolhadora, devido as alterações no manejo e na utilização em excesso de agrotóxicos, alterando o equilíbrio do agroecossistema (MOSCARDI et al., 2012).

Altas infestações destes insetos em lavouras de soja podem comprometer o rendimento da cultura (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005). De maneira geral, ao haver redução da área foliar fotossinteticamente ativa, as plantas de soja podem ter sua produtividade comprometida. A intensidade da desfolha varia de acordo com a taxa de consumo foliar e tempo de alimentação do inseto desfolhador. É importante salientar que a soja tem grande capacidade de se recuperar de níveis representativos de desfolha sem qualquer redução de produtividade, principalmente quando esta ocorre na fase vegetativa da cultura ou em anos de adequada intensidade e regularidade pluviométrica. No entanto, quando não são manejados corretamente, os insetos que atacam folhas podem causar níveis de desfolhamento além da capacidade de tolerância da planta e, assim, provocar danos representativos à lavoura (MOSCARDI et al., 2012).

2.2.2.1 *Anticarsia gemmatalis*

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, é uma espécie de ocorrência tropical e subtropical e restrita ao continente americano, sendo importante em várias culturas, principalmente na soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Entretanto, a dinâmica populacional e a bioecologia podem variar consideravelmente nas

diferentes regiões onde ocorrem, devido às diferenças na temperatura e nutrição dos insetos (MILANO, 2008).

Aproximadamente três dias depois da oviposição, as lagartas (fase larval) eclodem e a partir deste momento passam a se alimentar da folha (SOSA-GÓMEZ et al., 2010). A fase larval passa por seis instares, e as lagartas apresentam cor verde. As lagartas maiores que 15 mm são encontradas nas formas verde claro ou escuro, e apresentam linhas longitudinais brancas no dorso (Figura 1). No terceiro ínstar (estágio de desenvolvimento), as lagartas já perfuram as folhas, mas deixam as nervuras centrais e laterais intactas (Figura 2).

Após seis ínstars larvais, as lagartas transformam-se em pupas, que apresentam coloração marrom. Dessas pupas emergem as mariposas. Contudo, elas sempre apresentam uma linha diagonal de cor marrom unindo as pontas do primeiro par de asas, facilitando seu reconhecimento (Figura 1) (SOSA-GÓMEZ et al., 2010).

Ao longo do dia, as mariposas são encontradas sob a vegetação natural, ao final do dia elas iniciam voos curtos localizando parceiros para o acasalamento ou plantas para oviposição (HEATH et al., 1988; LEPPLA et al., 1987).

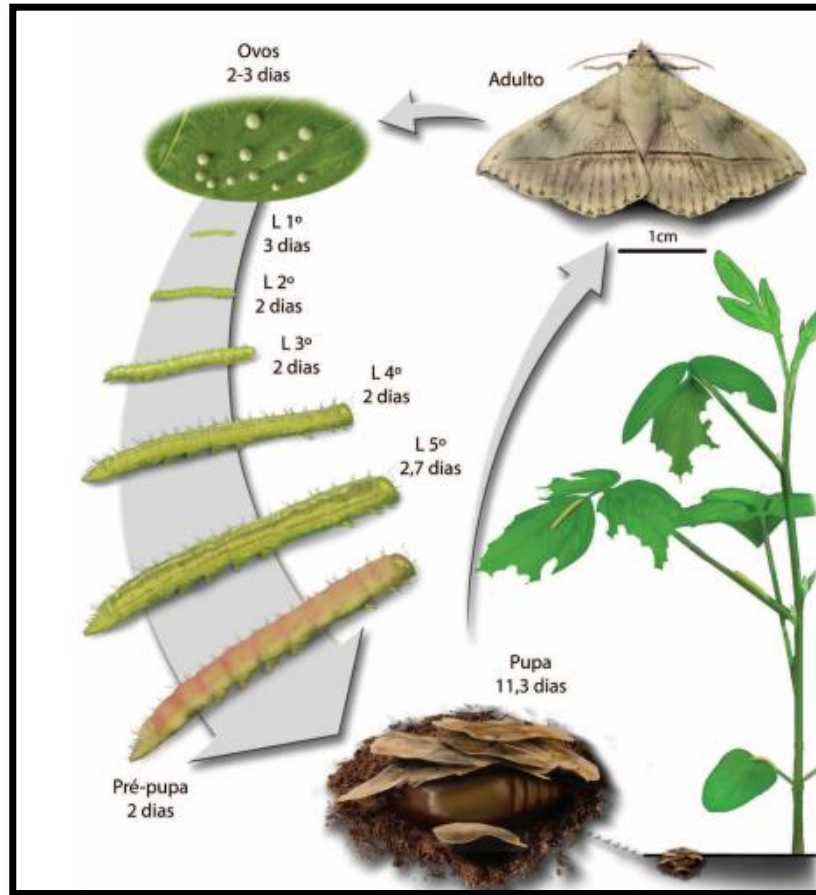


Figura 1. Desenvolvimento da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis*. O ciclo se inicia quando a lagarta na fase adulta (mariposa) oviposita durante a noite ovos que eclodem aproximadamente em três dias. A fase larval, passa por seis ínstar, e neste período as lagartas se alimentam de folha. Após o último ínstar larval, a fase de pré- pupa se inicia, pela construção de uma câmara pupal, sob folhas secas na superfície do solo ou, mais frequentemente, até dois centímetros de profundidade. Dessas pupas emergem as mariposas, que acasalam na primeira noite após a emergência, iniciando a oviposição três a quatro dias depois. O pico de postura ocorre em torno do quinto dia de vida do adulto. Fonte: Reid (1975); Silva et al. (2012); Moscardi et al. (2012).



Figura 2. Lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*). Fonte: Barbosa, D.A. (2017)

Com relação ao seu ataque em lavouras de soja, até o terceiro ínstar o consumo foliar é muito pequeno, pois as lagartas, ainda muito pequenas, não conseguem sequer perfurar as folhas, alimentando-se apenas dos tecidos mais tenros. Do quarto ao sexto ínstar, as lagartas consomem mais de 95% do total da área foliar de toda a fase larval, que varia de 100 a 120 cm² para cada lagarta. Na fase adulta, a *Anticarsia gemmatalis* não causa danos à cultura. Em altas populações, se essas lagartas não forem controladas, podem provocar até 100% de desfolha, que, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, ocasionam reduções significativas na produtividade da lavoura que podem chegar à perda total da lavoura de soja (Figura 3) (SOSA-GÓMEZ et al., 2014).



Figura 3. Injúrias causadas na cultura da soja pela lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. Até o terceiro ínstar o consumo foliar é muito pequeno, pois as lagartas, ainda muito pequenas, não conseguem sequer perfurar as folhas, alimentando-se apenas dos tecidos mais tenros. Do quarto ao sexto ínstar, as lagartas consomem mais de 95% do total da área foliar, que varia de 100 a 120 cm² para cada lagarta. Fonte: Celoto, F. J. (2008).

O controle das lagartas de *A. gemmatalis* pode ser realizado via controle biológico natural exercido pelo fungo *Nomurea rileyi* que é muito efetivo em condições mais elevadas de umidade relativa e temperatura. Também é eficiente a aplicação de inseticidas biológicos ou químicos seletivos aos inimigos naturais. É importante considerar apenas lagartas pequenas para o uso de baculovírus, *Bacillus thuringiensis* ou inseticidas reguladores de crescimento de insetos, pois estas são as mais suscetíveis a estes tipos de tratamentos.

2.2.2.2 *Chrysodeixis includens*

A lagarta-falsa-medideira *C. includens* ocorre em todo o continente americano, sendo encontrada em diversas regiões produtoras de soja, ocorrendo simultaneamente ou mais tardiamente em relação a populações da lagarta-da-soja, *A. gemmatalis*. No Brasil, pode ser encontrada em todas as regiões produtoras de soja (MOSCARDI et al., 2012), ocorrendo em surtos, isolada ou associada à lagarta-da-soja, provocando um sério problema fitossanitário (BERNARDI, 2012).

A fase larval dura cerca de 20 dias. Após este período, as lagartas eclodem com coloração verde-clara e listras longitudinais brancas e pontuações pretas. Neste estágio larval, podem atingir de 40 a 45 mm de comprimento. Depois do último ínstar larval, ocorre a formação da pupa, sob uma teia, na face abaxial das folhas (Figura 4) (SOSA-GÓMEZ et al., 2010).

Estas lagartas são chamadas falsas-medideiras, porque na fase larval se deslocam medindo palmos (Figura 5). Do primeiro ao terceiro ínstar, o consumo foliar é pequeno, e as lagartas dão preferência para folhas novas, com baixo teor de fibras; lagartas mais desenvolvidas tornam-se menos exigentes, e passam a se alimentar de folhas mais velhas e mais fibrosas (PAPA; CELOTO, 2007). Nos primeiros instares, as lagartas raspam as folhas, mas, a partir do terceiro, já lagartas conseguem perfurá-las, consumindo o parênquima foliar, deixando, as nervuras centrais e laterais intactas, dando às folhas um aspecto de folhas rendilhadas (Figura 6) (SOSA-GÓMEZ et al., 2014). Os adultos de *C. includens* não causam danos à cultura da soja.

O consumo total médio foliar relatado na literatura pode variar bastante, de 64 cm² a 200 cm² ao longo de todo o ciclo. Essa variação ocorre devido às diferenças nos tipos de folhas utilizadas nos estudos, pois este material pode ser proveniente de plantas cultivadas em casa de vegetação, em campo, ou ainda de diferentes estágios fenológicos da planta (BUENO et al., 2011).

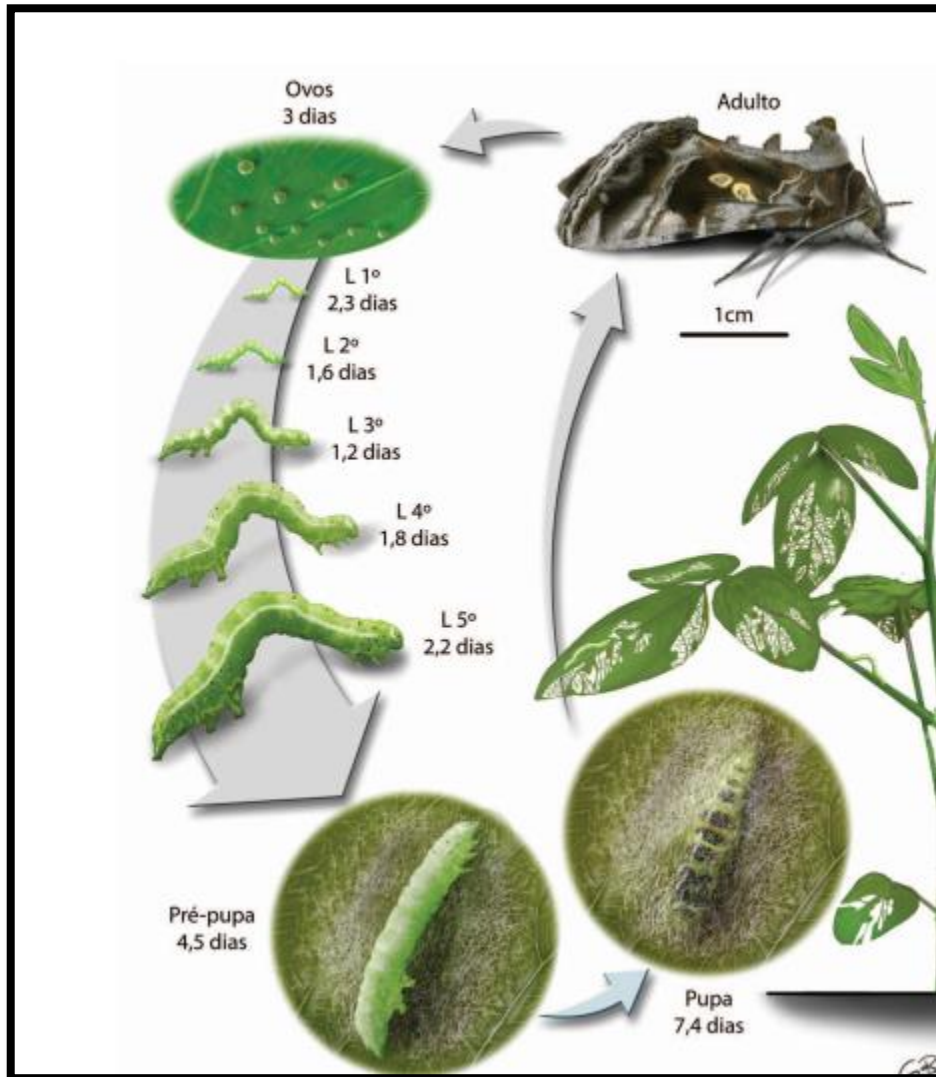


Figura 4. Desenvolvimento de *Chrysodeixis includens*. O ciclo se inicia com a oviposição, pela fêmea de aproximadamente 700 ovos. Decorridos, aproximadamente 2,5 dias, as lagartas eclodem. A fase larval dura cerca de 20 dias, e depois do último instar larval, a lagarta se transforma em pupa, que ocorre sob uma teia, em geral na face abaxial das folhas. Esta fase dura de 7 a 9 dias até a emergência dos adultos, mariposas com 35 mm de envergadura de asas. A longevidade dos adultos é de aproximadamente de 15 dias e o acasalamento ocorre, habitualmente, entre 22h e 4h, reiniciando o ciclo. Fonte: Reid e Greene (1973); Vásquez (1988); Moscardi et al. (2012).



Figura 5. Lagarta-falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) emergindo da exúvia do instar anterior. Fonte: Barbosa, D. A. (2017).

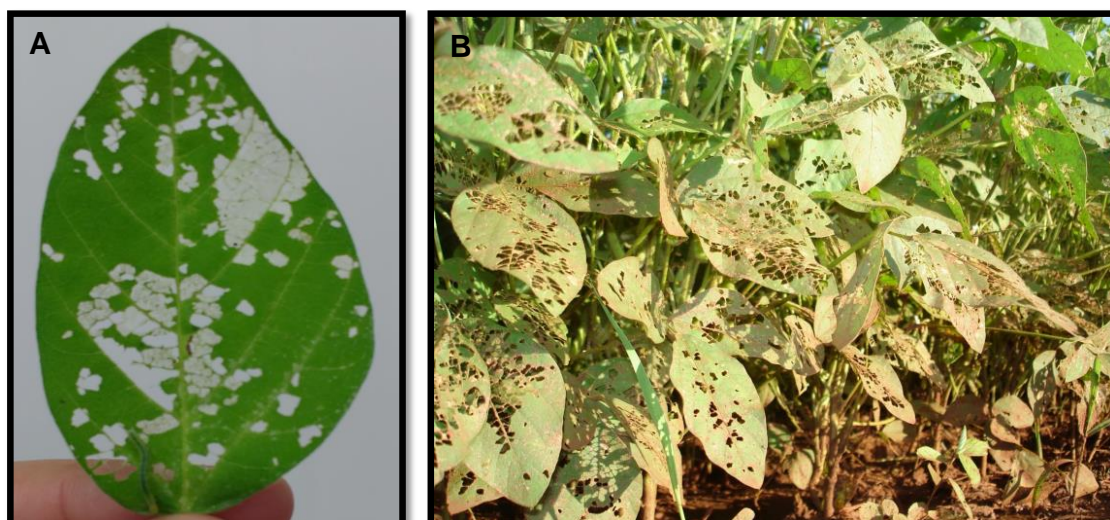


Figura 6. Injúrias causadas pela lagarta *Chrysodeixis includens* em folhas de soja. No primeiro e segundo ínstar, as lagartas apenas raspam as folhas, enquanto, a partir do terceiro ínstar, as lagartas conseguem a perfurar as folhas, consumindo o parênquima foliar e deixando as nervuras centrais e laterais intactas, proporcionando aspecto característico de folhas rendilhadas. Fonte: (B) Celoto, F. J. (2010) ; (A) Barbosa, D. A. (2017).

2.2.3 Resistencia de Plantas a Insetos

Alguns fatores podem favorecer a implantação das lagartas na cultura da soja. Temperatura, radiação solar, fertilidade do solo, deficiência hídrica e agrotóxicos podem favorecer a resistência ou a suscetibilidade da planta ao inseto afetando a interação entre ambos (PIZZAMIGLIO-GUTIERREZ, 2009). A idade das folhas também influencia na alimentação dos insetos, pois o desfolhamento é maior em folhas novas se comparado com o desfolhamento que ocorre em folhas mais velhas, que podem conter substâncias deletérias, como os taninos, ou serem mais rígidas. Não existem evidências se esses efeitos são resultado de substâncias secundárias ou simplesmente por terem um valor nutricional mais baixo. Em algumas plantas, essas substâncias podem estar nas folhas jovens, como os glicosídeos nas folhas de brássicas e os alcalóides nas folhas de batata (PIZZAMIGLIO-GUTIERREZ, 2009).

Evolutivamente, as plantas desenvolveram mecanismos ou estratégias para evitar ou reduzir ataques por insetos, seja por meio de um ciclo vegetal mais longo ou mais curto, ou mesmo compensando a perda de biomassa com um crescimento rápido, além de alterações bioquímicas nas folhas (PIZZAMIGLIO-GUTIERREZ, 2009). As características envolvidas na manifestação da resistência podem ainda atuar interferindo no ciclo biológico do inseto (antibiose), no comportamento de seleção do hospedeiro para alimentação, oviposição ou abrigo (antixenose ou

preferência) ou não atuarem sobre a praga, mas sobre o hospedeiro, permitindo-lhe compensar o ataque sofrido sem comprometimento da produção (olerância) (SMITH, 2005; BASTOS et al., 2015).

O controle de lagartas desfolhadoras, como *A. gemmatalis* e *C. includens* de modo geral, necessita de um manejo adequado dos produtos utilizados seja por controle biológico, químico ou controle via cultivo de plantas geneticamente modificadas (PGMs) que tenham incorporadas no seu genoma as toxinas Bt (da bactéria *Bacillus thuringiensis*). A aplicação de inseticidas é ainda a principal forma de controle destes insetos. Entretanto, a utilização indiscriminada desses produtos tem gerado efeitos deletérios ao homem e ao ambiente, como o desequilíbrio da biodiversidade em virtude da seleção de insetos resistentes, a mortalidade dos inimigos naturais e a contaminação ambiental de pessoas e animais (BUENO et al., 2012; FAZAM et al., 2013; CONTE et al., 2014). Para *C. includens* e *A. gemmatalis*, é indicado realizar o controle químico quando forem encontradas, em média, 20 lagartas grandes por pano-de-batida, ou se a desfolha atingir 30% até o final do florescimento, ou 15%, tão logo apareçam as primeiras flores (ALBUQUERQUE; BORGES; ANDRADE, 2005).

Por outro lado, a utilização de plantas transgênicas ao longo dos anos tem aumentado significativamente e com isso a polêmica que envolve o uso de GMs, que abrange muitas discussões a respeito dos benefícios e dos malefícios da tecnologia. As vantagens para o produtor incluem a possibilidade de redução do uso de agrotóxicos para controle de insetos pragas, favorecendo a manutenção de inimigos naturais, que auxiliam no controle de pragas e contribuem para retardar o desenvolvimento de populações de pragas resistentes (FRIZZAS; OLIVEIRA, 2006). Por sua vez, as desvantagens são o custo elevado cobrado pelas sementes, e o uso de genes resistentes a insetos-pragas que podem levar ao aparecimento de insetos resistentes se não for usado corretamente e conjuntamente ao manejo integrado de pragas (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2016).

Cabe ressaltar que, o uso de plantas GMs que contenham em seu genoma mais de uma característica de interesse será cada vez mais necessário, considerando-se um cenário de futuro próximo, com significativas mudanças climáticas quando os pesquisadores terão que lidar com estresses bióticos e abióticos mais severos interferindo diretamente na produção. Aliado a este cenário agrícola adverso, segundo Malthus a população cresce geometricamente e a

produção de alimentos aritmeticamente (ALVES, 2002). Assim, com o aumento da população mundial, que girará em torno de 9,8 bilhões de pessoas em 2050, a necessidade do aumento na produção de alimentos torna-se evidente, porém em um contexto de mudanças climáticas, da degradação dos solos, de escassez de água, e de pragas e doenças afetando as lavouras de modo mais intenso e frequente, que irão dificultar uma agricultura sustentável e o fornecimento de alimentos para esta população crescente (ONU, 2017). Assim, os pesquisadores têm buscado entender as vias cruzadas de respostas vegetal a fatores ambientais bióticos e abióticos e assim tentar desenhar estratégias para o desenvolvimento de cultivares que contenham genes de tolerância a estresse abióticos como a seca e resistência a insetos, como as lagartas desfolhadoras e desta maneira ofertar ao sojicultor linhagens contendo mais de um atributo interessante, pois acredita-se que linhagens com maiores vantagens serão mais bem aceitas e implementadas pelo produtor, resolvendo e minimizando problemas que afetam seriamente a lavoura, de modo produtivo e sustentável economicamente.

2.3 BARREIRA FÍSICA DE RESISTÊNCIA: LIGNINA

A lignina é o segundo polímero mais abundante encontrado nas plantas, derivado de álcoois hidroxicinâmicos p-coumarílico, coniferílico e sinapílico, também chamados de monolignóis, pode representar até 30% de todos os tecidos das plantas vasculares. A lignina, principalmente encontrada na parede celular e na lamela média de células xilemáticas e em outras partes de diferentes origens citológicas, como folha, caule, casca e raízes (FIRMINO et al., 2006), auxilia na rigidez e hidrofobia nas plantas, aumentando a resistência aos danos mecânicos, facilitando o transporte de água e contribuindo para a defesa vegetal contra ataques de patógenos (BALDONI, A. et al, 2010) e o consumo por insetos (COOLEY, 1988).

O teor de lignina pode variar de acordo com o órgão analisado. O alto teor de lignina presente na parte aérea de forrageiras pode determinar a baixa digestibilidade (LACERDA, 2001) enquanto que em eucalipto, o alto teor de lignina presente nos tecidos do caule prejudica a obtenção de celulose e papel (ENDT et al., 2000).

A síntese deste polímero de fenilpropanos, ocorre a partir a via dos fenilpropanóides, compostos do metabolismo secundário vegetal com uma grande variedade de funções, como sabor, odor e coloração o que contribui para atração de

insetos e a outros animais para dispersão de sementes. Além disso, esse grupo de compostos pode ainda contribuir na proteção das plantas contra fatores abióticos como os raios UV e bióticos como fungos, bactérias e vírus. Acredita-se que estes compostos fenólicos tenham sido fundamentais para a própria conquista do ambiente terrestre pelas plantas. Esse é o caso da lignina, que proporcionou o desenvolvimento do sistema vascular, dando rigidez aos vasos. De modo coerente com esta hipótese, plantas primitivas que habitam principalmente ambientes úmidos, como as briófitas e pteridófitas, são pobres em compostos fenólicos. Esses compostos são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido melavônico, menos significativa. O ácido chiquímico é formado a partir da condensação de dois metabolitos de glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato. O próximo passo, é a formação do ácido corísmico, que por sua vez leva à formação de vários aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) que são precursores de vários alcalóides. A partir da fenilalanina, a enzima PAL (phenylalanine ammonia-lyase), uma das principais enzimas que atua na formação dos precursores da lignina, atua catalisando a desaminação da fenilalanina a ácido trans-cinâmico iniciando a via de biossíntese do polímero (Figura 7). Essa enzima também é chave na via dos fenilpropanóides e pode ser induzida por agentes bióticos ou abióticos (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

A via da biossíntese de lignina está ainda ligada à várias outras enzimas, e muitas delas estão presentes também nas etapas iniciais da via de biossíntese dos fenilpropanóides (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Os genes que estão ligados diretamente a biossíntese da via da lignina são phenylalanine ammonia-lyase (PAL), 4-cumarate-CoA-Ligase (4CL), 4 Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H), Ferulato-5 Hidroxilase (F5H), Hidroxicinamoil COA Redutase (CCR), Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), Cafeoil-CoA Ometiltransferase(CCoAOMT), Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like (COMT), Hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato transferase (HCT).

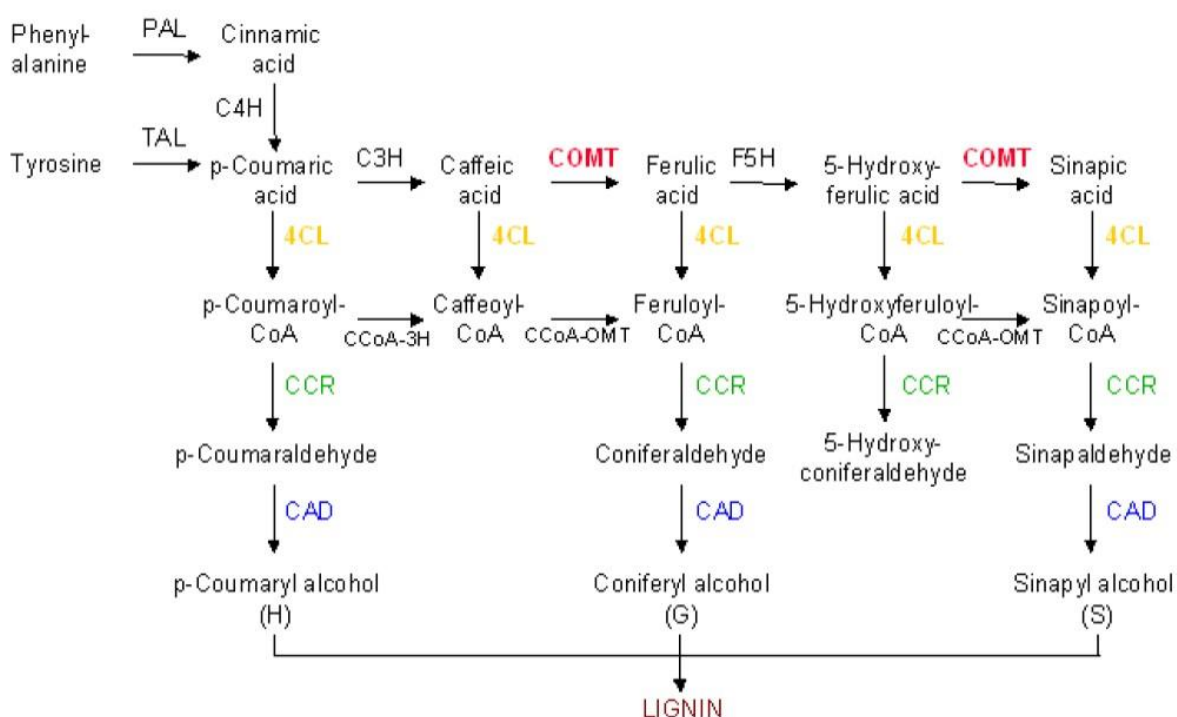


Figura 7. Via da Biossíntese de Lignina. **Fonte:** Baldoni, A. (2010). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), 4-cumarate-CoA-Ligase (4CL), 4-Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H), Ferulato-5-Hidroxilase (F5H), Hidroxicinamatoil-CoA Redutase (CCR), Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), Caffeoyl-CoA Ometiltransferase (CCoAOMT), Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like (COMT), Hidroxicinamatoil-CoA chiquimato/quinato transferase (HCT).

3. OBJETIVOS

Dentro do contexto apresentado acima, os pesquisadores tem buscado desenvolver estratégias que contemplem em uma mesma linhagem GM mais de uma característica de interesse para o agricultor. Observações em experimentos realizados em condições de campo indicaram que as linhagens 1Ea2939 e 1Ea15, geneticamente modificadas para tolerância a seca, com o fator de transcrição *AtAREB1A*, apresentavam menos danos por lagartas desfolhadoras que a cultivar convencional BR 16. Por esta razão, buscou-se desenvolver experimentos que contemplassem parâmetros de herbivoria para estas linhagens GMs e para seu respectivo *background* genético convencional.

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é avaliar as linhagens 1Ea2939 e 1Ea15 geneticamente modificadas com o fator de transcrição *AtAREB1A* isolado de *Arabidopsis thaliana*, e sua isolinha a cultivar convencional BR 16 para resistência às principais lagartas desfolhadoras da soja (*A. gemmatilis* e *C. includens*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o consumo diário pelas lagartas desfolhadoras *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* de folhas de soja provenientes das linhagens 1Ea2939 e 1Ea15, geneticamente modificadas com o fator de transcrição *AtAREB1A* e da cultivar de soja convencional BR 16;
- Determinar diferenças de ganho de peso nas pupas das lagartas *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*, provenientes do consumo de folhas das linhagens geneticamente modificadas 1Ea2939 e 1Ea15, e da cultivar de soja convencional BR 16;
- Determinar possíveis diferenças de ganho de peso entre machos e fêmeas de *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*;
- Estudar o ciclo de desenvolvimento e a mortalidade das lagartas *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* para inferir possíveis diferenças provenientes do consumo de folhas das linhagens 1Ea2939 e 1Ea15, e da cultivar de soja convencional BR 16;
- Determinar o teor de lignina nas folhas das linhagens geneticamente modificadas 1Ea2939 e 1Ea15 e na cultivar de soja convencional BR 16;
- Determinar via RT-qPCR, o nível de expressão do fator de transcrição *AtAREB1A* e de genes conhecidos relacionados a via da lignina, nas linhagens geneticamente modificadas 1Ea2939 e 1Ea15, e na cultivar de soja convencional BR 16.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSAD, E.; PINTO, H. S. Aquecimento Global e Cenários Futuros da Agricultura. APOSTILA, Posigraf, São Paulo, 2008.

APROSOJA - Associação dos Produtores de Soja e Milho de Mato Grosso, Disponível em: <<http://www.aprosoja.com.br/sobre-a-soja/Os-usos-da-Soja>> Acesso em: 2016.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás naturais e combustíveis. 2016. 265 p. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/images/publicacoes/Anuario_Estatistico_ANP_2016.pdf> Acesso em: 04 de junho de 2017.

ALVES, J. E. D. A polêmica Malthus versus Condorcet reavaliada à luz da transição demográfica. Texto para discussão da Escola Nacional de Ciências Estatísticas, ENCE/IBGE, nº4, Rio de Janeiro, 2002.

ALBUQUERQUE, F. A.; BORGES, L. M.; ANDRADE, C. A. B. Controle químico da lagarta-falsa-medideira-da soja *Chrysodeixis includens* (walker). In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2, Varginha, 2005. Anais... Varginha: UFLA, 2005.

BALDONI, A. **Análise fisiológica ultraestruturas e expressão genica de lignina em sementes de soja**. Dissertação-Universidade Federal de Lavras-UFLA. Lavras-MG, 2010.

BASTOS, C.S.; et al. Resistência de plantas a insetos: contextualização e inserção no MIP. In: VISOTTO, L.E. et al. Avanços tecnológicos aplicados à pesquisa na produção vegetal. Viçosa: UFV. p.32-72, 2015.

BARBOSA, E. G. G.; LEITE, J. P.; MARIN, S. R. R.; MARINHO, J. P.; CARVALHO, J. de F. C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Overexpression of the ABA-dependent AREB1 Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* Improves Soybean Tolerance to Water Deficit. **Plant Molecular Biology Research**. Plant Mol Biol Rep, 2012.

BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Biotecnologia no melhoramento de plantas. In: BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. Disponível em: <<http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%20transgenicos.pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2016.

BERNARDI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 x MON 89788 no Brasil**. 2012. 144f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BUENO, R.C.O.F.; BUENO, A.F.; MOSCARDI, F.; PARRA, J.R.P.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Lepidopteran larvae consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. *Pest Management Science*, v. 67, p. 170-174, 2011.

BUENO, R.C.O.F.; PARRA, J. R. P.; BUENO, A. F. Thichogramma pretiosum parasitism of *Pseudoplusia includens* and *Anticarsia gemmatalis* eggs at different temperatures. *Biological Control*, 60: 154-162, 2012.

CELOTO, F. J. Aquecimento Global e a Nova Geografia da Produção Agrícola no Brasil. Embrapa/ Unicamp, São Paulo - agosto de 2008. Disponível em: <http://mudancasclimaticas.cptec.inpe.br/~rmclima/pdfs/destaques/CLIMA_E_AGRICULTURA_BRASIL_300908_FINAL.pdf> Acessado em: 02 de outubro de 2017.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_10_15_07_19_boletim_graos_janeiro_2014.pdf>. Acessado em: 2017.

COOLEY, P. D. Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia*, v. 74, p. 531-536, 1988.

COLUSSI, J. WEISS, C. R. SOUZA, A. R. L. OLIVEIRA, L. O agronegócio da soja: Uma análise da rentabilidade do cultivo da soja no Brasil. *Revista Espacios*. v. 37. n.16. 2016. Disponível em: <<http://www.revistaespacios.com/a16v37n16/16371623.html>>. Acessado em: 12 de janeiro de 2018.

CI SOJA – Centro de Inteligência da Soja. Disponível no site Disponível em: <<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=historico>> Acesso em: 2017.

CONTE, O. et al. Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2013/2014 no Paraná. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

ENDT, D. V. et al. Genes de Lignificação. *Biotecnologia, Ciências & Tecnologia, Brasília*, v. 3, n. 15, p.152-159, 2000.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/soja-transgenica>>. Acesso em: 2017a.

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br> acesso em: 2017b.

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/soja-na-alimentacao>> Acessado em: 2017c.

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>> Acesso em: 23 de maio de 2017d.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. Ecofisiologia da Soja. Circular Técnica, EMBRAPA, p. 1-9, 2011.

FAZAM, J.C. et al. Efeito da soja Bt sobre a frequência e densidade populacional de pragas e predadores. Londrina: Embrapa Soja, 2013.

FERREIRA, R. C. **Quantificação das perdas por seca na cultura da soja no Brasil**. Tese de Doutorado-Universidade Estadual de Londrina, centro de ciências agrárias, programa de pós-Graduação em agronomia, Londrina. 2016.

FIRMINO, A. et al. Alterações ligno-anatômicas em *Solanum gilo* Raddi por aplicação de cálcio e boro como estratégia de defesa. Ci. Agrotec., v. 30, n. 3, p. 394-401, 2006.

FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FERREIRA, L. C.; RODRIGUES, F. A.; MOLINARI, H. B. C.; MARIN, S. R. R.; MOLINARI, M. D. C.; MARCOLINO-GOMES, J.; MERTZ-HENNING, L. M.; FARIAS, J. R. B.; MIZOI, J.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Characterization of Soybean Genetically Modified for Drought Tolerance in Field Conditions. *Frontiers in Plant Science*. v. 8, abril 2017.

FUGI, C. G. Q.; LOURENÇÃO, A. L.; PARRA, J. R. P. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. *Sci. agric. Piracicaba*, vol.62, n.1, pp. 31-35, 2005.

FRIZZAS, M. R.; OLIVEIRA, C. M. de. Plantas transgênicas resistentes a insetos e organismos não-alvo: predadores, parasitoides e polinizadores. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 4, n.1/2, p. 63-82, 2006.

GHINI, R. **Influência das Mudanças Climáticas na Agricultura**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna -SP, 2006.

HEATH, R.R.; LANDOLT, P.J.; LEPPLA, N.C.; DUEEBEN, B.D. Identification of a male-produced pheromone of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) attractive to conspecific males. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, p. 1121-1130, 1988.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa-CNPSO, 2000. 70 p. (Embrapa-CNPSO. Circular Técnica, 30).

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/>>. Acessado em: 2017.

JAGGARD, K. W.; QI, A.; OBER, E. S. Possible changes to arable crop yields by 2050. *Philosophical Transactions of Royal Society B*, v.365, p.2835-2851, 2010.

JICA – Japan International Cooperation Agency. Disponível em: <<http://www.jica.go.jp/brazil/portuguese/office/articles/110223.html>> Acesso em: 01 julho de 2017.

LACERDA, R. S. **Teores de lignina estimados através do método espectrofotométrico:** lignina solúvel em brometo de acetila de alguns cultivares de aveia. 2001. 75p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, 2001.

LEPPLA, N.C.; GUY, R.H.; HEATH, R.R.; DUEBEN, B. Courtship and chemical communication of the velvetbean caterpillar moth. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 80, p. 734-738, 1987.

MAPA-**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 26 Jul. 2017.

MARINHO, J. P.; KANAMORI, N.; FERREIRA, L. C. et al. Characterization of molecular and physiological responses under water deficit of genetically modified soybean plants overexpressing the *AtAREB1* transcription factor. *Plant Mol Biol Rep.*, 2015.

MARTINS, C. C.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; MÔRO, G. V.; VIEIRA, R. D. Metodologia para seleção de linhagens de soja visando germinação, vigor e emergência em campo. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n. 3, p.455-461, 2016.

MILANO, P. **Influência da nutrição e temperatura na reprodução de representantes de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae.** 2008. 75f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

MOSCARDI, F.; BUENO, A.F.; SOSA-GOMEZ, D.R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; POMARI, A.F.; CORSO, I.C.; YANO, S.A.C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga.** Embrapa, Brasília. p. 211-334, 2012.

ONU- Organização das Nações Unidas. Disponível em:<<http://agenciabrasil.ebc.com.br/internacional/noticia/2017-06/onu-diz-que-populacao-mundial-chegara-86-bilhoes-de-pessoas-em-2030>> Acessado em: 20 de agosto de 2017.

PAPA, G.; CELOTO, F.J. Lagartas na soja. 2007. Disponível em: <<http://www.ilhasolteira.com.br/colunas/index.php?acao=verartigo&idartigo=1189090532>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

PIZZAMIGLIO-GUTIERREZ, M. A. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. Bioecologia e nutrição de insetos. EMBRAPA: Brasília-DF, p 211-249, 2009.

PRITCHARD, S. G.; AMTHOR, J. S. Crops and environmental change: an introduction to effects of global warming, increasing atmospheric CO₂ and O₃

concentrations, and soilsalinization on crop physiology and yield. New York: Food Products Press. p. 421, 2005.

REID, J.C. Larval development and consumption of soybean foliage by the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), in the laboratory. 1975. 116f. Thesis (PhD) – University of Florida, Gainesville, 1975.

REID, J.C.; GREENE, G.L. The soybean looper: pupal weight, development time, and consumption of soybean foliage. *Florida Entomologist*, v. 56, p. 203- 206, 1973.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p.123-130, Mar/abr. 2003.

SAKAI, T.; KOGISO, M. Soy isoflavones and immunity. **Journal of Medical Investigation**, v. 55, p. 167-173, 2008.

SEAB- Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/soja_2013_14.pdf>. Acesso em: 2016.

SILVA, D.M. da; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; BUENO, A.de F.; BUENO, R.C.O. de F.; OLIVEIRA, M.C.N. de; MOSCARDI, F. Biological characteristics of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) for three consecutive generations under different temperatures: understanding the possible impact of global warning on a soybean pest. *Bulletin of Entomological Research*, v. 102, p. 285-292, 2012.

SMITH, M. Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches. Berlin: Springer423p., 2005.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORSO, I.C.; OLIVEIRA, L.J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A.R.; BUENO, A. de F.; HIROSE, E. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 2010. 90 p. (Embrapa – CNPSo. Documentos, 269).

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; HIROSE, E.; ROGGIA, S. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja. p. 34-37, 2014.

VÁZQUEZ, W.C. Biología comparada de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidóptera: Noctuidae) em dietas naturais e artificiais e efeito de um vírus de poliedrose nuclear na sua mortalidade e no consumo da área foliar da soja. 1988. 164f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, Piracicaba, 1988.

VASCONCELOS, E. S. et al. Estimativas de parâmetros genéticos da qualidade fisiológica de sementes de genótipos de soja produzidas em diferentes regiões de Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 65-76, 2012.

VERGARA, W. L H.; OLIVEIRA, J. P. C.; BARBOSA, F. A.; YAMANARI, J. S. Análise de viabilidade econômico-financeira para aquisição de uma unidade de armazenagem de soja e milho. **GEPROS**. Gestão da Produção, Operações e Sistemas, Bauru, Ano 12, nº 1, p. 41-61, 2017.

XU, Z. et al. Comparative genome analysis of lignina biosynthesis gene families across the plant kingdom. **BMC Bioinformatics**, New York, v.10, n. 11, p. 1-15, Oct. 2009.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor sinal transduction leading to production of plant secondary metabolities. **Biotechnology Advance**, New York, v. 23, n. 4, p. 283-333, June 2005.

Artigo

Análise molecular e de parâmetros de herbivoria de *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* em soja GM com o gene *AtAREB1A*

Artigo a ser submetido à revista Planta

1. INTRODUÇÃO

A sojicultura é uma das atividades agrícolas de maior importância no mundo em virtude de sua escala de produção e dos valores que movimentam na economia. No Brasil na safra 2016/2017, a produção foi de aproximadamente 114 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

Entretanto, lavouras do grão são frequentemente assoladas por diversos fatores abióticos como o déficit hídrico e também bióticos, como os insetos-praga, que atuam durante todo o ciclo de produção, prejudicando o desenvolvimento das plantas e a produtividade final da cultura. Nos últimos anos, estes fatores tem se tornado mais intensos e frequentes, pois as mudanças climáticas globais têm provocado desequilíbrios que estão refletindo diretamente nas interações planta-ambiente-praga, por intensificar fenômenos como secas, inundações, infestações de pragas e insetos, doenças entre outros (GHINI, 2006).

Dentre os fatores bióticos tem se destacado o ataque de insetos desfolhadores como a lagarta-falsa-medideira, *Chrysodeixis includens* (Walker 1857) (Lepidoptera: Noctuidae). Essa lagarta que era considerada, até a década de 1990, uma praga secundária na cultura da soja, tem atualmente recebido destaque devido aos sérios danos provocados pela sua alta capacidade de consumo de folhas, podendo chegar a 200 cm². Esta lagarta consome o parênquima foliar deixando as nervuras, conferindo aos folíolos aspecto rendilhado. Ainda entre os insetos-praga, a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) também merece atenção. Na fase larval, em que não provocam prejuízos à sojicultura, as lagartas no sexto instar chegam a consumir mais de 95% do total consumido para completar seu ciclo, que varia de 100 a 120 cm² para cada lagarta (MOSCARDI et al, 2012; ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013).

O controle destas pragas é feito principalmente pela aplicação de inseticidas químicos, no entanto, o uso intenso (BUENO et al., 2011; GUEDES et al., 2012; VIVAN, 2012), têm levado ao desenvolvimento de populações resistentes (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010; SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012) e ao aparecimento de pragas secundárias em maior intensidade (CZEPAK; ALBERNAZ, 2015), aumentando o uso de inseticidas para o seu controle. Uma forma de controle

alternativo é o uso de plantas geneticamente modificadas (PGMs) contendo a toxina Bt (da bactéria *Bacillus thuringiensis*).

Esta tendência do uso da biotecnologia no desenvolvimento de plantas mais tolerantes a fatores bióticos estende-se aos fatores abióticos. Dentre eles, o déficit hídrico é o mais prejudicial para a sojicultura, afetando o crescimento e desenvolvimento das plantas e a produtividade final. Em números, os valores acumulados em perdas decorrentes de períodos de déficit hídrico, considerando-se dados registrados a partir das safras 1976/77 até 2013/2014, alcançam a cifra de US\$ 79,62 bilhões (FERREIRA, 2016). Neste contexto, linhagens de soja foram transformadas com o fator de transcrição ABA-dependente *AtAREB1A*, isolado de *Arabidopsis thaliana*, que confere para tolerância a seca. Estas plantas foram caracterizadas em condições de déficit hídrico, em casa de vegetação (MARINHO et al., 2015) e campo (FUGANTI-PAGLIARINI et al., 2017) mostrando resultados promissores. Em CV, as linhagens GMs tiveram melhor performance em experimentos de sobrevivência e rendimento, e dados de potencial hídrico e trocas gasosas sugeriram que as plantas GMs possuem um mecanismo de evitamento à seca (MARINHO et al., 2015). Em condições de campo, a linhagem GM *AtAREB1A* 1Ea2939 apresentou maior uso intrínseco da água, maior índice de área foliar e maior rendimento em comparação aos demais eventos GMs e cultivares convencionais de soja (FUGANTI-PAGLIARINI et al., 2017). Estes resultados mostraram que a inserção do FT *AtAREB1A* em soja aumentou a tolerância à seca. No entanto, nenhum estudo com fatores bióticos havia sido realizado até o momento. Algumas observações realizadas em experimentos em condições de lavoura mostraram que as linhagens GMs 1Ea2939 e 1Ea15 apresentavam além das respostas promissoras para tolerância ao déficit Hídrico, folhas mais espessas e ásperas (resposta física) e ainda uma menor desfolha por lagartas desfolhadoras quando comparadas à cultivar convencional BR 16, sugerindo maior conteúdo de lignina.

A lignina auxilia na rigidez e hidrofobia nas plantas, favorecendo com isso a resistência aos danos mecânicos, transporte de água e a defesa contra ataques de patógenos (BALDONI, et al, 2013) e consumo por insetos (COOLEY, 1988). Essas funções justificam-se por ser encontrada principalmente na parede celular e na lamela média de células xilemáticas e de outras partes de diferentes origens citológicas, como: folha, caule, casca e raízes (FIRMINO et al., 2006).

Assim, considerando-se a importância de fatores bióticos na lavoura de soja e a vantagem de ofertar ao produtor, uma cultivar com mais de uma característica de interesse, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros de herbivoria para as principais lagartas desfolhadoras da soja *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*, nas linhagens de soja 1Ea2939 e 1Ea15 GMs para tolerância a seca comparativamente a sua isolinha, a cultivar convencional BR 16. Genes conhecidos envolvidos na via da Lignina também foram quantificados e foi analisado o teor de lignina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ENSAIO DE HERBIVORIA

Sementes das linhagens 1Ea2929 e 1Ea15 GMs transformadas com, o fator de transcrição *AtAREB1A*, isolado de *Arabidopsis thaliana* que confere características de tolerância a seca, e da cultivar convencional BR 16 foram germinadas em papel Germitest[®] umedecido, em câmara de germinação, por cinco dias, em três grupos, intervalados por sete dias. Este procedimento foi realizado para que se tivesse, durante a condução do experimento de herbívora, folhas sempre no mesmo estágio de desenvolvimento (R1-R2), evitando-se que a idade da folha pudesse ser uma variável na preferência alimentar das lagartas.

As plântulas foram semeadas em vasos de 8L preenchidos com a mistura substrato: areia (1:1). O substrato foi constituído de terra: areia: composto orgânico (3:2:2). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com temperatura programada de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até atingirem o estágio de florescimento (R1-R2), quando as folhas foram retiradas para uso nos ensaios.

O ensaio de herbivoria e as avaliações foram realizadas no laboratório de Entomologia da Embrapa Soja. Lagartas de terceiro instar de *A. gemmatalis* e *C. includens*, obtidas no Laboratório de Criação da Embrapa Soja, foram utilizadas para avaliar o desenvolvimento, o consumo foliar e o peso das pupas. Para cada instar, de cada espécie, foram utilizadas 50 placas de Petri, contendo folhas da cultivar BR 16 e dos evento GMs 1Ea2939 e 1Ea15. As folhas foram trocadas diariamente e para o cálculo de consumo, a área foliar de cada folha foi quantificada antes e após o consumo das lagartas, utilizando-se o aparelho LI-COR[®] (modelo LI-3100C).

Quando as lagartas entraram em fase de pupa, o peso foi quantificado em balança de precisão GEHAKA (modelo AG 200). Nesta fase também foi realizada a separação por sexto das pupas. O número de mortes e a causa aparente também foram registrados.

Durante todo o ensaio, as placas foram mantidas em câmara de germinação FANEM[®] (modelo MOD. 347CDG), em uma temperatura de 27± e umidade entorno de 70% até o final do experimento.

2.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIGNINA

A determinação do teor de ligninas nas linhagens de soja GMs 1Ea2939 e 1Ea15 e na cultivar convencional BR 16, foi realizada no Laboratório de Química de Sementes-Núcleo Tecnológico de Sementes e Grãos. Para isso, 2 mg de folhas de cada amostra foram macerados em nitrogênio líquido. Após a secagem deste macerado em estufa, as amostras foram alíquotadas em 4 repetições técnicas e, 7 ml de tampão fosfato (pH 7) foram adicionados a cada amostra. A solução foi agitada e centrifugada a 3.300 rpm por 6 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado em sucessivas centrifugações a 3.300 rpm por 6 min, com os seguintes reagentes: duas vezes com tampão fosfato (pH 7.0; 7 ml), três vezes com 7ml de Triton X-100 1% (v/v) em tampão pH 7.0, duas vezes com 7 ml de NaCl 1 M em tampão pH 7.0 buffer, duas vezes com 7 ml de água destilada e finalmente com duas vezes com 5ml de acetona. A seguir o pellet foi seco em estufa a 60°C.

Às amostras agora, livres de proteínas, foram adicionados 0,5 ml de brometo 25% em ácido acético e a solução colocada em banho-maria a 70°C por 30 min. A seguir, as amostras foram colocadas em gelo e 0,9 ml de NaOH foram adicionados seguido por adicionado 0,1 ml de hidroxilamina. A seguir, foi realizada uma centrifugação a 4000 rpm por 5 min. A seguir, 0,3 ml do sobrenadante foram coletados e diluídos em 2,7 ml de ácido acético. Esta solução foi utilizada para a leitura em espectrofotômetro UV, a 280nm, da absorbância das amostras que foi comparada a uma curva padrão, obtendo-se assim o teor de lignina nas folhas das amostras.

2.3 RT-qPCR

Folhas das linhagens de soja 1Ea2939 e 1Ea15 GMs com o fator de transcrição *AtAREB1A* e da cultivar convencional BR 16 foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer até o momento da extração de RNA, realizada utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen). Assim, 100 mg do tecido foliar foi pulverizado com microesferas de alumínio em tubo de 1,5 ml sob nitrogênio líquido e 1 ml de Trizol® (Invitrogen) foi adicionado. A solução foi homogeneizada em vórtex por 5 min à temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 12000g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual adicionaram-se 250 µL de solução salina (0,8M citrato de sódio; 1,2M NaCl) e 250 µL de isopropanol. Homogeneizou-se novamente a solução em vórtex por 5 min à temperatura ambiente e uma nova centrifugação foi realizada a 12000g, por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 1ml de etanol 75% adicionado. A seguir, centrifugou-se a solução a 12000g, por 5 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco a vácuo por 3 min. Foram adicionados 100 µL de água livre de RNase (Invitrogen) e o pellet ressuscitado. Logo em seguida, adicionaram-se 10 µL de acetato de sódio (3M) e 250 µL de etanol 100%. A solução foi homogeneizada em vórtex por 15s e a seguir homogeneizada em agitador mecânico por 5 min, à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas à 12000g, por 15 min, a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado, adicionaram-se 400 µL de etanol 75% e as amostras foram centrifugadas a 12000g, por 15 min, a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi removido e o pellet seco a vácuo por 3 min. Em seguida, 20 µL de água livre de RNase foram adicionados, o pellet ressuscitado e o RNA total tratado com DNase para retirada de possível DNA genômico utilizando-se o Kit DNase I (Invitrogen). A solução foi composta por 10 µg/µl de RNA total, tampão de reação 1X e 1 U de DNase I (Invitrogen) em um volume final de 25 µL completado com água livre de RNase. Incubou-se à 25°C por 7,5 min e então adicionou-se 2,5 nM EDTA e incubou-se a 65°C, por 5 min. Para verificar a presença de DNA genômico, as amostras de RNA total foram amplificadas via PCR convencional com *primers* para o gene da *β-actina*.

Para a síntese dos cDNAs, foram utilizados aproximadamente 200 ng de RNA tratado com DNase e o kit Super Script III (Invitrogen) conforme as recomendações do fabricante.

As sequências gênicas utilizadas para o desenho dos *primers* foram obtidas no banco de dados Phytozome (Tabela 1). Além da expressão gênica relativa do transgene *AtAREB1A*, a expressão de genes da via de biossíntese de lignina tais como Cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD) (Glyma.10G262400), Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like (COMT) (Glyma.06G137100), 4 Coumarato-CoA-ligase (4CL) (Glyma.11G194500), Ferulate 5-hydroxylase (F5H) (Glyma.01G169200), Phenylalanine ammonia lyase (PAL) (Glyma.19G182300), Cinnamoyl Coa Redutase (CCR) (Glyma.19G006900), Cafeoil-CoA Ometiltransferase (CCoAOMT) (Glyma.07G21470), Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H) (Glyma.03G122000) e Hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato transferase (HCT) (Glyma.07G021600) foram quantificados.

O programa Primer3plus ([www.http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi](http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi)) foi utilizado para o desenho dos *primers*. A melhor temperatura de reação para cada par de oligonucleotídeo (primer) foi determinada e avaliada pela qualidade de amplificação. Para a determinação da eficiência dos *primers* foi feita uma diluição seriada 1:5 a partir de um *bulk* (mistura) composto pelos cDNAs das amostras analisadas. Uma curva de dissociação para se verificar a ocorrência de formação de dímeros de *primers* e/ou amplificação de produtos inespecíficos também foi realizada.

As reações de PCR quantitativo foram conduzidas em equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando o kit Platinum[®] SYBR Green[®] qPCR Super Mix-UDG with ROX (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. A ciclagem de amplificação foi composta por um período inicial de 50°C por 2 min seguido de 95°C por 10 min, e por 40 ciclos a 95°C por 15s e 60°C por 1 min, para dissociação foi 95°C por 15s, 60°C por 15s e por fim um período de 95°C por 15s.

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos foi realizada por quantificação relativa utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O gene endógeno *Gm β -actina* (Glyma.15G050200) foi utilizado como normalizador e a cultivar convencional BR 16 como amostra calibradora para a quantificação da expressão relativa dos genes nas linhagens GMs 1Ea2939 e 1Ea15.

Tabela 1. As sequências de genes e *primers* utilizados na análise de RT-qPCR da biossíntese de lignina em soja.

Glyma/Gene model	Gene name	Primer F e R (3'-5')
AT1G45249	AtAREB1A	ACATACCAGCAATCGCAACA CCACAAGACCACCACCTCTT
Glyma.10G262400	Cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD)	ACGCAACATCCATCCTTCCA AACGTCGTGTAACCAAAACAGA
Glyma.06G137100	Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like (COMT)	ACTCACAAGCTCACAGAGCA ACGTGGGTTGGGGTAATCTG
Glyma.11G194500	4 Coumarato-CoA-ligase (4CL)	GTCTCATTCTCTTCCAAAGCG CCTGTGATTTGAGGTGCGC
Glyma.01G169200	Ferulate 5-hydroxylase (F5H)	GCTCTACGCGCTTGAATTGG GAACACGTCACCCATGTCCA
Glyma.19G182300	Phenylalanine ammonia lyase (PAL)	CGGAAGTGATGCAAGGGAGA GCTCCATAATTGCAGCAGCC
Glyma.19G006900	Cinnamoyl Coa Redutase (CCR)	TCAAGGTTTTCTAGCATCAGTGG GCCTCGTTGTTTCATTGCCT
Glyma.07G214700	Cafeoil-CoA Ometiltransferase(CCoAOMT)	GTGCTGGAGCTCAACAAAGC GGTGTGCAGAAGAAGCAACG
Glyma.03G122000	Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H)	GCAGGGACCACCACAACATT TAGCCGCTGGTATAGGGTGT
Glyma.07G021600	Hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato transferase(HCT)	GGTCGCTCTCACACCCAATC CTCTCTGCTCGACTGCTCAC

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados referentes ao consumo foliar (cm²), desenvolvimento (em dias), peso das pupas (g) e mortalidade que atenderam aos pressupostos de normalidade de estatística descritiva (Shapiro Wilk) foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e análise de médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o programa computacional SASM-Agri.

3. RESULTADOS

3.1 CONSUMO FOLIAR

Os resultados obtidos para *Anticarsia gemmatalis* mostraram um maior consumo diário das folhas da cultivar convencional BR 16 e da linhagem GM 1Ea2939, em torno de 2,38 e 2,65 cm² em média (Figura 8). O menor consumo diário foi registrado para o evento GM 1Ea15 em torno de 1,59 cm² (Figura 8). Já para as lagartas de *Chrysodeixis includens* não houve diferenças estatística no consumo foliar, no entanto as lagartas consumiram em média cerca de 10,04 cm² da cultivar BR 16 em quanto que as linhagens GMs 1Ea2939 e 1Ea15, tiveram um consumo de 9,49 e 9,45 cm² (Figura 8).

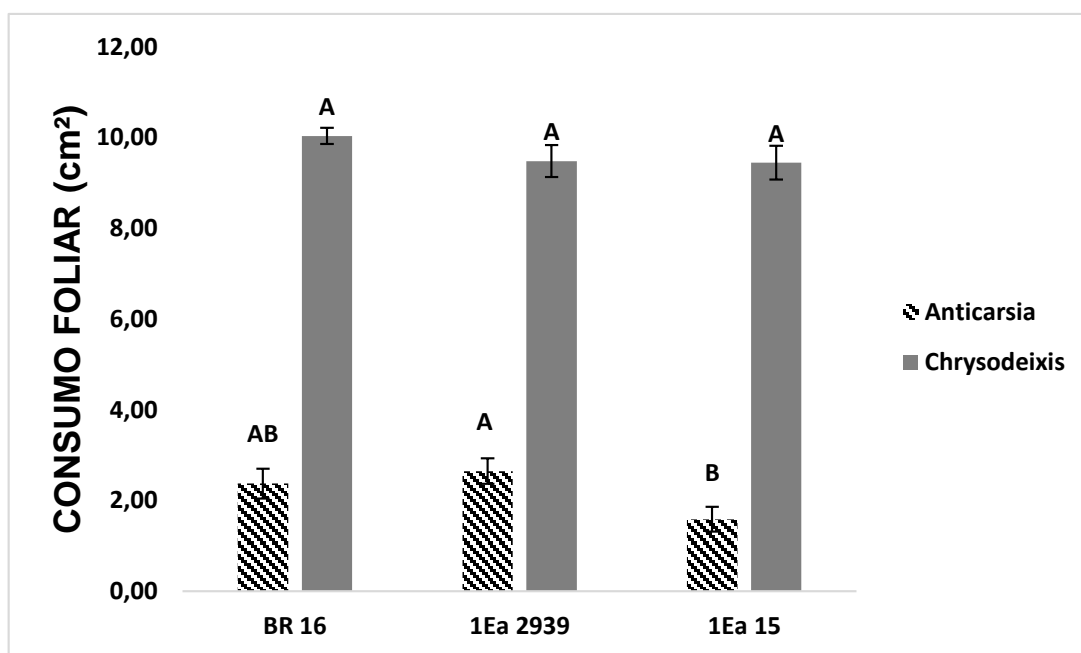


Figura 8. Consumo foliar diário em (cm²) da Lagarta *Chrysodeixis includens* e *Anticarsia gemmatalis* na cultivar convencional de soja BR 16 e nos respectivos eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15. Teste Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam linhagens GMs e cultivar convencional.

3.2 DESENVOLVIMENTO

As lagartas de *A. gemmatalis* que consumiram folhas da cultivar convencional BR 16 e da linhagem GM 1Ea2939, tiveram um desenvolvimento maior, em média de 12,58 e 12,54 dias, respectivamente. O menor desenvolvimento, em média de 10,02 dias foi registrado para as lagartas que consumiram folhas da linhagem GM para 1Ea15. O desenvolvimento das lagartas de *C. includens* que se alimentaram das GM 1Ea2939 e GM 1Ea15 apresentaram um alongamento dos

dias, em média 13,36 e 14,12 dias comparada a soja convencional BR 16, cerca de 11,68 dias (Figura 9).

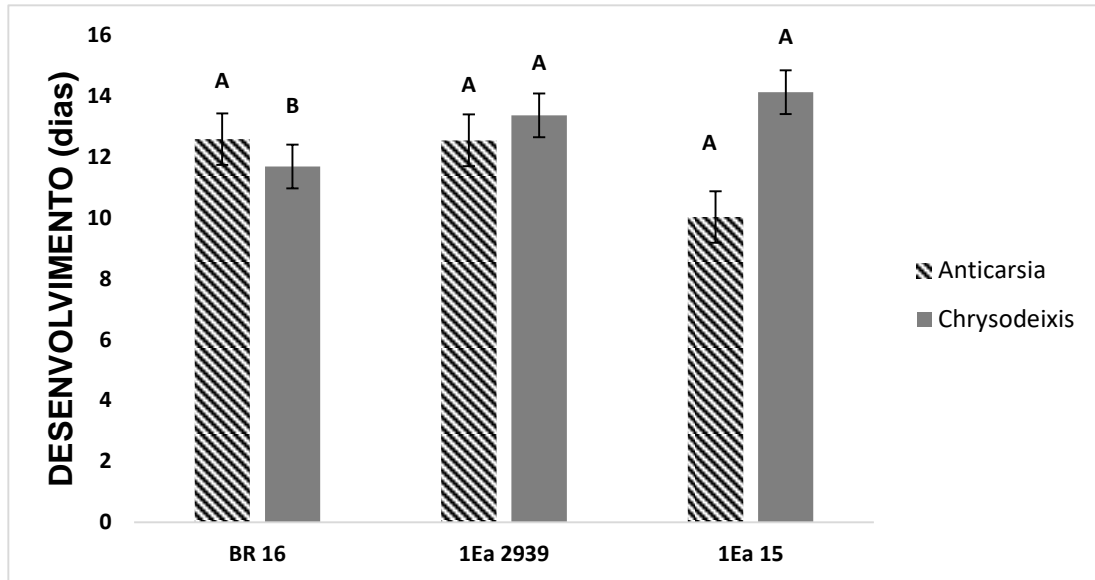


Figura 9. Desenvolvimento da Lagarta *Chrysodeixis includens* e *Anticarsia gemmatalis* na cultivar convencional de soja BR 16 e nos respectivos eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15. Teste Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam linhagens GM e cultivar convencional.

3.3 PESO DE PUPA

O peso registrado para as lagartas de *A. gemmatalis* não apresentou diferença estatística significativa para as diferentes folhas de soja ofertadas, sejam elas provenientes de linhagens GMs (Figura 10). No entanto, a média de peso foi de 0,08 (g) BR 16, 1Ea2939 0,10 (g) e para 1Ea15 de 0,06 (g). O peso das pupas de *C. includens* mostrou o menor peso para as lagartas que consumiram a folha da GM 1Ea15 (Figura 10). No entanto, a média de peso foi de 0,20 (g) para BR 16, 0,18 (g) para 1Ea2939 e 0,14 (g) para 1Ea15.

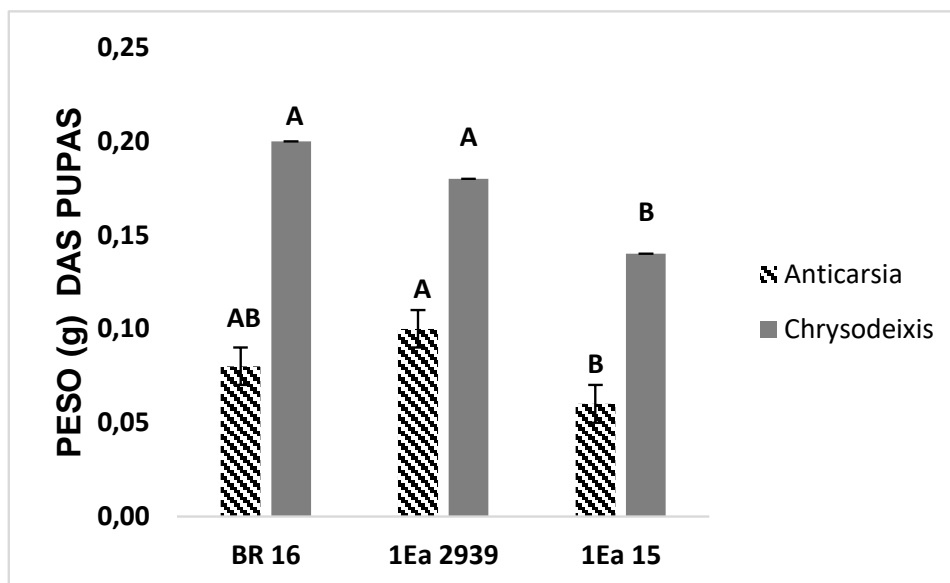


Figura 10. Peso de pupa (g) das lagartas *Anticarsia gemmatilis* e *Chrysodeixis includens* registrados quando estas foram alimentadas com folhas da cultivar convencional de soja BR 16 e com os eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15. Teste Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam pesos dentro da mesma linhagem GM ou cultivar convencional.

3.4 MORTALIDADE

Com relação a mortalidade, para ambas as lagartas analisadas, o número de mortes registrado foi maior após o consumo de folhas provenientes do evento GM 1Ea15, quando comparado à cultivar não GM e a linhagem GM 1Ea2939 (Figura 11). Na morte por troca de instar (Tabela 2) as lagartas de *A. gemmatilis* morreram mais no evento 1Ea15 (11 mortes) comparado ao evento 1Ea2939 (16 mortes). E para lagarta *C. includens* a mortalidade na troca de instar foi maior na 1Ea15 (5 mortes) comparada ao evento 1Ea2939 (2 mortes). A cultivar BR 16 não apresentou morte na troca de instar.

Tabela 2: Mortalidade da lagarta *Chrysodeixis includens* e *Anticarsia gemmatilis* na cultivar de soja BR 16 e nos eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15, por motivo aparente.

<i>Anticarsia gemmatilis</i>	Pupa	Morte por Bactéria	Morte na Troca de Instar	Morte não Identificada
BR 16	24	26	-	-
1Ea2939	30	9	11	-
1Ea15	18	16	16	-

<i>Chrysodeixis includens</i>	Pupa	Morte por Bactéria	Morte na Troca de Instar	Morte não Identificada
BR 16	49	-	-	1
1Ea2939	47	-	2	1
1Ea15	36	1	5	8

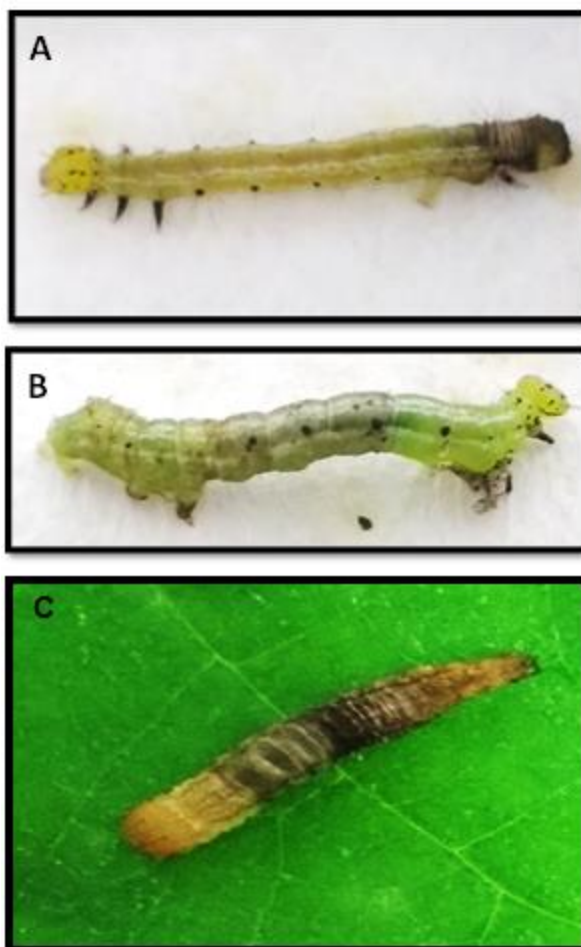


Figura 11. Mortalidade da lagarta *Chrysodeixis includens* por estrangulamento, na troca de instar. Estas mortes foram registrados quando do consumo de folhas de soja dos eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15, Em A, morte por estrangulamento na região final do corpo da lagarta, e em B, morte por estrangulamento na região intermediária do corpo da lagarta e C morte de *Anticarsia gemmatalis* na região mediana do corpo. Fonte: Barbosa, D. A. (2017).

3.5 TEOR DE LIGNINA

As análises de quantidade do teor de lignina (Figura 12) nas folhas mostrou que as folhas das GMs 1Ea15 e 1Ea2939 apresentam um maior teor de lignina, respectivamente média de 85,30 e 89,28 mg de lignina/g⁻¹ de parede celular, quando comparadas ao teor de lignina quantificado na cultivar convencional BR 16, média de 73,10 mg de lignina/g de parede celular.

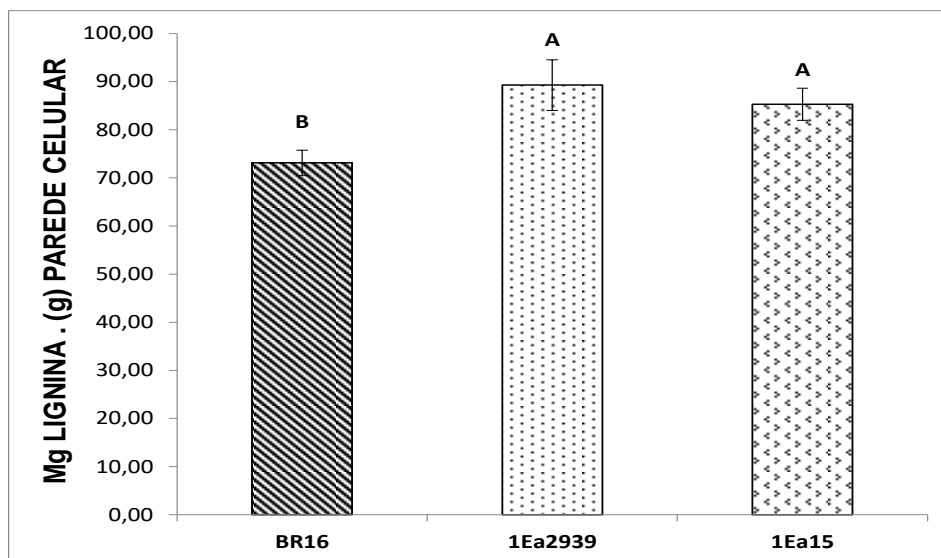


Figura 12. Determinação do Teor de Lignina na Folha na cultivar convencional de soja BR 16 e nos respectivos eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15. Teste Tukey ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam teor de lignina dentro da mesma linhagem GM ou cultivar convencional.

3.6 EXPRESSÃO GÊNICA

Os resultados de quantificação da expressão gênica relativa (Figura 13) do transgene *AtAREB1* mostraram que o GM evento 1Ea2939 apresentou maior expressão do transgene *AtAREB1* quando comparado ao evento 1Ea15.

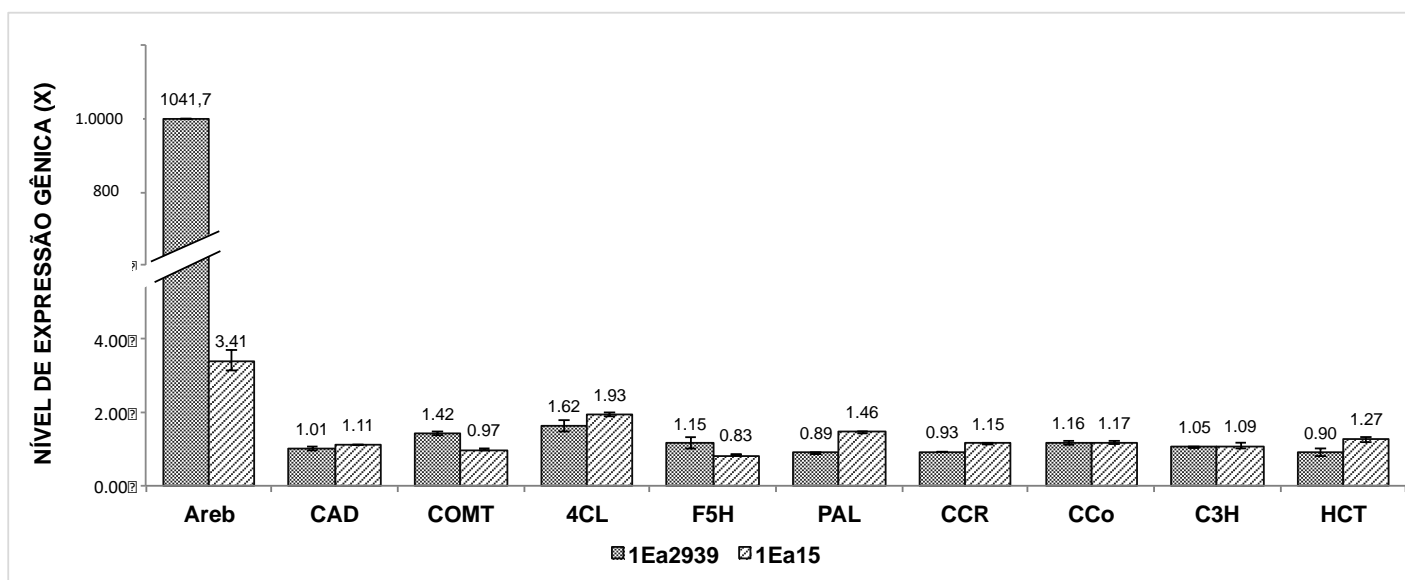


Figura 13. Quantificação da expressão gênica relativa dos genes *AtAREB1A*, e genes da biossíntese de lignina, Cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD) (Glyma.10G262400), Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like (COMT) (Glyma.06G137100), 4 Coumarato-CoA-ligase (4CL) (Glyma.11G194500), Ferulate 5-hydroxylase (F5H) (Glyma.01G169200), Phenylalanine ammonia lyase (PAL) (Glyma.19G182300), Cinnamoyl Coa Redutase (CCR) (Glyma.19G006900), Cafeoil-CoA Ometiltransferase (CCoAOMT) (Glyma.07G21470), Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H) (Glyma.03G122000) e Hidroxicinamóil-CoA chiquimato/quinato transferase (HCT) (Glyma.07G021600) via RT-qPCR. Os valores inferiores e superiores a 1 representam,

respectivamente, genes *down* e *up* regulados em relação ao calibrador, a cultivar convencional de soja BR 16.

Com relação aos genes relacionados a via de biossíntese de lignina, Cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD) (Glyma.10G262400), Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like (COMT) (Glyma.06G137100), 4 Coumarato-CoA-ligase (4CL) (Glyma.11G194500), Ferulate 5-hydroxylase (F5H) (Glyma.01G169200), Phenylalanine ammonia lyase (PAL) (Glyma.19G182300), Cinnamoyl Coa Redutase (CCR) (Glyma.19G006900), Cafeoil-CoA Ometiltransferase (CCoAOMT) (Glyma.07G21470), Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H) (Glyma.03G122000) e Hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato transferase (HCT) (Glyma.07G021600) três perfis diferentes de expressão foram observados. Embora os genes CAD, 4CL, CCo e C3H tenham apresentado perfil de *up*-regulação em ambos os eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15, valores maior de expressão foram identificados para o evento 1Ea15. Quanto a perfis de expressão contrários, os genes COMT e F5H foram *up*-regulados no evento 1Ea2939 e *down*-regulados no evento 1Ea15. De modo oposto, os genes PAL, CCR e HCT foram *down*-regulados no evento 1Ea2939 e *up*-regulados no evento 1Ea15 (Figura 13).

4. DISCUSSÃO

Desde a semeadura, até a colheita, a cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas. No Brasil, a espécie *Chrysodeixis includens* tem se tornado um sério problema fitossanitário para a cultura da soja, com vários surtos ocorrendo isolados ou associados mais tardiamente à lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*.

Lagartas de *C. includens* podem causar desfolhas e consideráveis danos as vagens, especialmente quando essa desfolha ocorrer durante o período reprodutivo da cultura. Segundo a literatura, as lagartas de *Chrysodeixis includens* consomem em média 114 cm² de área foliar para se desenvolver (ALBUQUERQUE et al., 2005). Os dados obtidos neste trabalho não mostram uma diferença significativa no consumo, entretanto, durante o desenvolvimento as lagartas de *C. includens* prolongaram seu desenvolvimento quando consumiram folhas provenientes nas linhagens GM 1Ea2939 e 1Ea15 na tentativa de ganhar peso para fase de pupa. A maior duração do período larva-adulto é descrito por alguns autores como uma ação compensatória para que as lagartas recuperem e formem pupas com pesos maiores,

apesar dos hospedeiros não atenderem satisfatoriamente as exigências nutricionais dessas espécies (CROCOMO; PARRA, 1985; SILVEIRA et al., 1997; MACHADO et al., 1999). No entanto, um aumento de peso de pupa não foi identificado, ao contrário, lagartas que consumiram folhas do evento GM 1Ea15 apresentaram menor peso, em comparação com lagartas que consumiram folhas provenientes da cultivar convencional BR 16. Vários insetos podem ter seu desenvolvimento alterado por conta do tipo de alimentação, causando efeitos como redução ou prolongamento do seu período larval, deformação de pupas, redução da longevidade de adultos e sobrevivência (HABIB, PALEARI, AMARAL, 1983; BAVARESCO et al., 2003).

Já as lagartas de *A. gemmatalis* apresentaram menor consumo foliar na linhagem GM 1Ea15 comparada a linhagem 1Ea2939 entretanto não foram identificadas diferenças significativas em relação à cultivar convencional BR 16. Não houve diferença no desenvolvimento destas lagartas, entretanto, o peso da pupa para lagartas que consumiram folhas do evento 1Ea15 foi menor quando comparado ao evento 1Ea2939 e a BR 16. As diferenças de consumo foliar podem ocorrer pois o teor de carboidratos e proteínas é essencial para o pleno desenvolvimento dos insetos e pode variar em função da planta e do estágio fenológico que as plantas se encontram. Geralmente nas plantas as folhas mais velhas são mais ricas em carboidratos e pobres de proteínas e folhas mais novas possuem tecidos ricos em proteínas (MATTSON, 1980; LINCOLN, 1993). As folhas ofertadas aos insetos durante todo o ensaio de herbivoria realizado neste trabalho foram retiradas de plantas no mesmo estágio de desenvolvimento, o que sugere que os teores de carboidratos e proteínas não guiaram a preferência alimentar, o que sugere que a linhagem GM 1Ea15 que pode estar sintetizando alguma substância que conduza a “não preferência alimentar” e conseqüentemente ao menor consumo e a um ciclo de vida mais curto ou ainda que alguma barreira possa estar dificultando a alimentação das lagartas, como o alto teor de lignina, presente nas folhas das plantas das linhagens GM 1Ea2939 e 1Ea15.

Diversos autores relatam as propriedades repelentes e estimulantes dos aleloquímicos presentes nas plantas (BERENBAUM; NEAL, 1985; ISHAAYA, 1986; NORRIS; KOGAN, 2005). Com o ataque de insetos, a soja passa a produzir substâncias para desencadear mecanismos de proteção, geralmente são toxinas de defesas que interferem no desenvolvimento, interferindo no crescimento dos insetos

pragas e formando pupas com pesos menores (PIUBELLI et al., 2005; BORTOLI et al., 2012).

Outro fator que pode causar redução no crescimento e sobrevivência dos insetos (SCHALLER, 2008) são os metabólitos secundários que atuam na defesa da planta contra herbívoros, causando interferência na digestão de proteínas, com destaque para os taninos, conhecidos por formarem complexos com as enzimas digestivas presentes no intestino dos herbívoros, reduzindo a digestão de proteínas e assim interferindo no crescimento (SILVA, D. M, 2014).

Uma alta mortalidade foi registrada para lagartas de *A. gemmatalis* e *C. includens* que consumiram folhas provenientes dos eventos GMs 1Ea15 e 1Ea2939 quando comparada ao seu *background* convencional BR 16. No entanto, os números para mortalidade por estrangulamento ao longo do corpo, na mudança de instar para o evento GM 1Ea15 foram maiores. Em condições naturais, o hormônio esteróide ecdisona, sintetizado na fase terminal do processo de muda, ativa as células hipodérmicas, com a restauração da capacidade de crescimento das mesmas e síntese protéica, permitindo a formação de uma nova cutícula, resultando na liberação da cutícula velha (apólise) (GATEHOUSE, J. A., 2002). Os dados obtidos neste trabalho sugerem que o evento GM 1Ea15 sintetize alguma substância similar a um inseticida, promovendo o estrangulamento lento e a morte das lagartas ou que a dificuldade para se alimentar devido ao teor de lignina cause a falta de nutrientes necessários para troca de instar.

Em condições de lavoura, uma cultivar de soja que agregue característica de um menor consumo diário e total de folhas por lagartas desfolhadoras, aliado a um ciclo de vida mais curto e a uma maior mortalidade dos insetos pode ser muito útil na diminuição dos danos foliares. Cabe destacar que quanto menor a área foliar, menor a superfície fotossintetizante, importante fator para a fase de enchimento de grãos e consequentemente a produtividade final da lavoura. Assim, o evento de soja GM 1Ea15 poderia diminuir os danos provocados pelas lagartas de *Chrysodeixis includens* em lavoura infestadas.

Como já discutido, o menor consumo das folhas provenientes dos eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15 pelas lagartas de *A. gemmatalis* e *C. includens* pode também estar relacionado ao alto teor de lignina identificado nas folhas. Segundo Heerd e Melo Junior (2016), a lignina desempenha função importante na resistência das plantas ao ataque por patógenos por promover o fortalecimento da parede

celular, aumentando a resistência física e durabilidade química dificultando a sua ingestão por herbívoros; assim como, alternado a palatabilidade e digestibilidade, que é diminuída por estar ligada covalentemente com celulose e proteínas. A lignina, um polímero derivado de unidades fenilpropanóides denominadas C₆C₃ ou, simplesmente, unidades C₉ pode ser classificada de acordo com constituição em unidades de p-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S) (SALIBA et al., 2001). Uma grande quantidade de genes está envolvida nesta via biossintética.

Os dados moleculares obtidos neste trabalho, mostraram para o transgene *AtAREB1A*, uma alta expressão no evento 1Ea2939 quando comparado ao outro evento GM, o 1Ea15. Os eventos GMs são obtidos de modo independente e podem portanto, apresentar respostas diferentes dependendo dentre outros fatores, do local de inserção no genoma hospedeiro e da interação do genoma receptor com o gene exógeno (ALTPETER et al., 2005). Assim, resultados diversos para os eventos GMs podem ser esperados não apenas molecularmente mas também em aspectos físico-químicos, anatômicos, morfológicos, metabólicos, e modificações pós transcricional.

Como relação ao genes de via biossintética de lignina, os resultados indicaram ainda que os eventos GMs 1Ea2939 e 1Ea15 apresentaram *up*-regulação de alguns genes da via sintética de lignina tais como Cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD) (Glyma.10G262400), 4 Coumarato-CoA-ligase (4CL) (Glyma.11G194500), Cafeoil-CoA Ometiltransferase (CCoAOMT) (Glyma.07G21470) e Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H) (Glyma.03G122000), sugerindo que a maior quantidade de lignina nas folhas destes eventos possa ser resultado da indução da transcrição destes genes. O evento GM 1Ea15, além da *up*-regulação dos genes CAD, 4CL CCoAOMT e C3H, ainda apresentou maior expressão dos genes Phenylalanine ammonia lyase (PAL) (Glyma.19G182300), Cinnamoyl Coa Redutase (CCR) (Glyma.19G006900) e Hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato transferase (HCT) (Glyma.07G021600), que foram *down*-regulados no evento 1Ea2939. Segundo Moura e colaboradores (2010), injúrias provocadas por insetos, podem induzir a síntese de genes da via de biossíntese de lignina. Delessert e colaboradores (2004) mostraram que *A. thaliana* apresenta aumento da expressão de genes tais como 4CL, CAD e CCR como estratégia para evitar infecção por patógenos.

As enzimas que participam das etapas iniciais e intermediárias da via de biossíntese da lignina são também comuns à via dos fenilpropanóides. A enzima

PAL (fenilalanina amônia-liase), *up*-regulada no evento GM 1Ea15, é uma das principais enzimas que atuam na formação dos precursores de lignina, além disso, a invasão por patógenos desencadeia o aumento da síntese de PAL, estimulando a síntese de compostos fenólicos, portanto, esta enzima é também chave na via metabólica de fenilpropanóides. Ueda e colaboradores (2016) estudando aspectos biológicos de *A. gemmatalis* e a indução de compostos fenólicos em soja sugeriram que em resposta ao ataque, as cultivares de soja utilizam a via dos fenilpropanóides, aumentando e/ou induzindo compostos fenólicos, como o coumestrol, composto detectado apenas após o processo de herbivoria.

Como resultado da indução de genes em comum da via de biossíntese de lignina, uma maior quantidade de lignina foi identificada nos eventos GMs, provavelmente dificultando o consumo foliar e diminuindo o peso das pupas das lagartas *A. gemmatalis* e *C. includens*. Os dados de mortalidade sugeriram ainda que pode ter ocorrido a síntese de algum composto (fenólico ou repelente/inseticida) que provocou a morte das lagartas. No entanto, para confirmar tal hipótese, novos estudos para identificar e quantificar tais compostos precisam ser conduzidos. Cabe ressaltar que os eventos GMs são obtidos de modo independente desta forma é possível que haja mudanças em outros compostos da rota.

CONCLUSÕES

Lagartas de *A. gemmatalis* e *C. includens* consumiram menor quantidade de folhas provenientes do evento GM 1Ea15, e as pupas destas apresentaram menor peso;

Os eventos GMs apresentaram maior teor de lignina nas folhas quando comparados à cultivar convencional BR 16;

O evento GM 1Ea2939 apresentou maior expressão do transgene *AtAREB1A*, resultado que pode estar relacionado ao local de inserção do gene no genoma da planta, uma vez que os eventos são obtidos de modo independente e portanto, podem exibir respostas completamente diferentes e;

A maioria dos genes da via biossintética de lignina foi *up*-regulado no evento 1Ea15 quando comparado ao evento 1Ea2939, confirmando aumento da concentração desta nas folhas e devido à enzimas comuns com a via de síntese de fenilpropanóides, sugerindo que algum composto possa ser sintetizado neste evento que provoque a morte prematura das lagartas, no entanto, novos estudos para comprovar esta hipótese e possivelmente identificar e quantificar tais compostos precisam ser conduzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K. et al. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*, v.15, p.305-327, 2005

ÁVILA, C. J.; VIVIAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícola. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013.

ALBUQUERQUE, F. A.; BORGES, L. M.; ANDRADE, C. A. B. Controle químico da lagarta-falsa-medideira-da soja *Chrysodeixis includens* (walker). In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2, Varginha, 2005. Anais... Varginha: UFLA, 2005.

BALDONI, A. **Análise fisiológica ultraestruturas e expressão genica de lignina em sementes de soja**. Dissertação-Universidade Federal de Lavras-UFLA. Lavras-MG, 2010.

BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S.; GRÜTZMACHER, A. D.; RINGENBERG, R.; FORESTI, J. Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamão, soja e feijão. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 6, n. 33, p. 993- 998, 2003.

BERENBAUM, M; NEAL, J.J. Synergism between myristicin and xanthotoxin, a naturally co-occurring plant toxicant. *Journal of chemical ecology*, New York, v.11, p.134-1358, 1985.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Biol.** 54:519–46, 2003.

BORTOLI, S. A.; MURATA, A. T.; VACARI, A. M.; BORTOLI, C. P.; 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*, Bom Jesus, v. 3, n. 3, p. 192-198, 2012.

BUENO, Regiane C.O. F.; BUENO, Adeney F.; MOSCARDI, Flavio; PARRA, J.R.P.; HOFFMANN-CAMPO, Clara. B. Lepidopteran larvae consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. *Pest Management Science*, v. 67, p. 170-174, 2011.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em:< http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_10_11_27_12_boletim_graos_agosto_2017.pdf> Acessado em: 2017.

COOLEY, P. D. Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. **Oecologia**, v. 74, p. 531-536, 1988.

CRÓCOMO, W.B.; PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de milho, trigo e sorgo por *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, v. 29, p. 225-260, 1985.

CZEPAK, Cecília; ALBERNAZ. Cordeiro, K. Manejo avançado. Revista Cultivar, v. 16, p. 6-10, 2015.

DELESSERT C, WILSON I, VAN DER STRAETEN D, DENNIS E, DOLFERUS R (2004) Spatial and temporal analysis of the local response to wounding. Plant Mol. Biol. 55, 165–181.

FERREIRA, R. C. Quantificação das perdas por seca na cultura da soja no Brasil. Tese de Doutorado-Universidade Estadual de Londrina, centro de ciências agrárias, programa de pós-Graduação em agronomia, Londrina. 2016.

FIRMINO, A. et al. Alterações ligno-anatômicas em *Solanum gilo* Raddi por aplicação de cálcio e boro como estratégia de defesa. Ci. Agrotec., v. 30, n. 3, p. 394-401, 2006.

FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FERREIRA, L. C.; RODRIGUES, F. A.; MOLINARI, H. B. C.; MARIN, S. R. R.; MOLINARI, M. D. C.; MARCOLINO-GOMES, J.; MERTZ-HENNING, L. M.; FARIAS, J. R. B.; MIZOI, J.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Characterization of Soybean Genetically Modified for Drought Tolerance in Field Conditions. Frontiers in Plant Science. v. 8, abril 2017.

GATEHOUSE, J. A. Resistência das plantas contra herbívoros de insetos: uma interação dinâmica. *Novo Phytologist*, 156: 145-169. doi: 10.1046 / j.1469-8137.2002.00519.x, 2002.

GUEDES, J.V.C.; ARNEMANN, J.A.; STÜRMER, G.R.; MELO, A.A.; BIGOLIN, M.; PERINI, C.R.; SARI, B.G. Percevejos da soja: novos cenários, novo manejo. Revista Plantio Direto, v. 1, p. 28-34, 2012.

GHINI, R. Influência das Mudanças Climáticas na Agricultura. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna -SP, 2006.

HABIB, M.E.M.; PALEARI, L.M.; AMARAL, M.E.C. Effect of three larval diets on the development of the armyworm, *Spodoptera latifascia* Walk., 1856 (Noctuidae, Lepidoptera). Revista Brasileira de Zoologia, São Paulo, v.1, n.3, p.177-182, 1983.

HEERDT, T.S.; MELO JUNIOR, J.C. F. ESTRATÉGIAS DE DEFESA E NÍVEL DE HERBIVORIA EM ESTRATOS DA COPA DE INGA EDULIS MART. (FABACEAE) EM UM FRAGMENTO FLORESTAL URBANO. *Acta Botanica Venezuelica* [en linea] 2016, 39 [Fecha de consulta: 13 de febrero de 2018] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86251385004>> ISSN 0084-5906

ISHAAYA, I. Nutritional and allelochemic insect - plant interactions relating to digestion and food intake: some examples. In: MILLER, J.R.; MILLER, T. A Insect - Plant Interactions. New York: **Springer-Verlog**, p. 191-223, 1986.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LINCOLN, D. E.; FAJER, E. D.; JOHNSON, R. H. Plant insect herbivore interactions in elevated CO₂ environments. *Trends in Ecology and Evolution*, Amsterdam, v. 8, p. 64-68, 1993.

MACHADO, V. O. F.; FERREIRA, G. A.; ROSA, S. R. A.; GARCIA, A. E.; PINHEIRO, J. B.; VELOSO, V. R. S. Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de soja (*Glycine max* Merrill). *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 29, n. 1, p. 39-41, 1999.

MARINHO, J. P.; KANAMORI, N.; FERREIRA, L. C. et al. Characterization of molecular and physiological responses under water deficit of genetically modified soybean plants overexpressing the *AtAREB1* transcription factor. *Plant Mol Biol Rep*. doi: 10.1007/s11105-015-0928-0 (In Press), 2015.

MATTSON, W. J. Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Palo Alto, v. 11, p. 119-161, 1980.

MOSCARDI, F.; BUENO, A.F.; SOSA-GOMEZ, D.R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; POMARI, A.F.; CORSO, I.C.; YANO, S.A.C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Embrapa, Brasília, p. 211-334, 2012.

MOURA JCMS, BONINE CAV, VIANA JOF, DORNELAS MC, MAZZAFERA P (2010) Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Integr. Plant Biol.* 52(4), 360-376.

NORRIS, R.F; KOGAN, M. Ecology of interactions between weeds and arthropods. *Annual Review Entomology*, Stanford, v. 50, p.479-503, jan. 2005.

PARRA, J. R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S. B. (Coord.). *Controle Microbiano de Insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? *Journal of chemical ecology*, New York, v. 31, p. 1509-1525, 2005.

SALIBA, Eloísa de Oliveira Simões et al. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. *Cienc.* v. 31, n. 5, p. 917-928, Oct. 2001 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000500031&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 2018.

SILVA, D. M. Aspectos Biológicos e Nutricionais do Complexo *Spodoptera spp.* Em Culturas Anuais. Tese do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade estadual de Londrina, 2014.

SILVEIRA, L. C. P. J. D.; VENDRAMIN, C. J.; ROSSETTO,. Efeitos de genótipos de milho no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Londrina, v. 26, n. 2, p. 291-298, 1997.

SOSA-GÓMEZ, Daniel, R.; SILVA, Jovenil, J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 45, n.7, p.767-769, jul. 2010.

SOSA-GÓMEZ, Daniel, R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, Clara, B.; CORRÊA-FERREIRA, Beatriz, S.; MOSCARDI, Flavio. (Ed.). Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília: Embrapa, p. 673-723, 2012.

SCHALLER, A. Induced plant resistance to herbivory. In: BERNARDS, M.A; BASTRUPSPOHR, L. Phenylpropanoid metabolism induced by wounding and insect herbivory. New York: Springer, p.189-208, 2008.

UEDA, T. E.; GRAÇA, J. P.; SALVADOR, M. C.; GOIS, M. S.; LUSKI, P. G.; DIAS, B. F.; VENTURA, M. U.; OLIVEIRA, M. C. N. de; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e indução dos compostos fenólicos da soja. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 11. 2016, Londrina. Resumos expandidos... p. 222-230. Londrina: Embrapa Soja, 2016.

VIVAN, Lúcia. Insetos vorazes. Revista Cultivar, v. 14, p.3-7, 2012.