

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

**EFEITO DE GENÓTIPOS DE SOJA E DE FLAVONÓIDES**  
**NA BIOLOGIA E NO INTESTINO MÉDIO DE *Anticarsia***  
*gemmatalis*

Mariana Closs Salvador

***Bióloga***

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**2008**

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

**EFEITO DE GENÓTIPOS DE SOJA E DE FLAVONÓIDES**  
**NA BIOLOGIA E NO INTESTINO MÉDIO DE *Anticarsia***  
*gemmatalis*

Mariana Closs Salvador

**Orientador: Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Junior**

**Co-orientadora: Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo**

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

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**Fevereiro de 2008**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARIANA CLOSS SALVADOR** – nascida em Ibiporã no Estado do Paraná em 21 de setembro de 1983. Concluiu a graduação em Ciências Biológicas na Faculdade Estadual de Filosofia Ciências e Letras de Cornélio Procópio – FAFICOP em 16 de Dezembro de 2005, estagiou na EMBRAPA soja de 2004 a 2008, no Laboratório de resistência de plantas à insetos.

Aos meus pais, em especial minha amada mãe Maria Aparecida, que é um exemplo de vida e está sempre ao meu lado proporcionando muito amor e carinho.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me concedido saúde e disposição para o desenvolvimento deste trabalho, pois sem Ele nada seria possível.

Ao meu namorado, Flávio pelo apoio, compreensão nas horas de ausência, apoio nas horas de cansaço, estímulo nos momentos de indecisão e acima de tudo pelo respeito aos meus ideais.

Aos meus irmãos, Janaína e Fabiano, pelo apoio, carinho e respeito.

Aos meus sobrinhos Matheus, João Vitor e Murilo por sempre preencherem nossas vidas com alegria.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp pela oportunidade de realização do curso.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja, por ter disponibilizado toda estrutura para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Junior pela orientação e por ter sido tão solícito comigo.

A todos os professores do departamento de Fitossanidade da Unesp-Jaboticabal.

Às funcionárias da secretaria do departamento de Entomologia da Unesp, Márcia, Lígia e Lúcia, e da seção de Pós-Graduação por sempre estarem dispostas a colaborar.

À Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo pela imensa contribuição científica, ensinamentos, compreensão e pela confiança depositada em mim. À você, todo meu carinho, respeito e admiração.

A (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

A pesquisadora da Embrapa Soja, Lenita Jacob de Oliveira, por ser tão solícita.

À pesquisadora da Embrapa Soja, Maria Cristina N. de Oliveira e às funcionárias da Biometria, Mariza e Tânia, pela colaboração nas análises estatísticas.

À Professora Dra. Sheila Michele Levy pelo apoio técnico e contribuição científica imprescindível para realização das análises histológicas.

Aos funcionários do departamento de Entomologia e Fitoquímica da Embrapa Soja Sérgio, João Alves e estagiários: José Perez, Natália, Débora e Everson, pela importante participação na condução dos experimentos.

Ao funcionário da Embrapa Soja, Adair Vicente Carneiro, pela colaboração com as fotografias.

Ao funcionário responsável pelas casas-de-vegetação Alvino e sua equipe, e o funcionário da Entomologia (Campo) Oriverto, pela contribuição na manutenção das plantas utilizadas nos experimentos.

Aos demais funcionários da Embrapa Soja, Ivanilda, Fábio, Neiva, Rosemeire, Joacir, Elis, Ranieri, Gustavo, Mariluci, Rodrigo, Sônia, D. Maria, Jovenil, Donizete, Moisés, Clenilda e Tica pela amizade e colaboração.

À Archer Daniels Midland Co. – ADM por ter cedido o concentrado de isoflavonas para realização dos experimentos.

A todas as amizades realizadas na Embrapa Soja, Sérgio, João Alves, José, Natália, Débora, Everson, Paulo, Rodrigo, Sheila, Edmar, Andréia.

Aos queridos amigos que conquistei na Unesp – Jaboticabal, Rafael, Flávio, Sônia e Juliana, pelo apoio, companheirismo, carinho e amizade.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho, espero que de alguma forma possa retribuir toda atenção e respeito.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	vii

### CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1.1. O Inseto.....	3
1.1.2. Resistência de plantas.....	4
1.1.3. Resistência de soja a insetos.....	7
1.1.4. Tubo digestivo de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	9
1.2. OBJETIVOS.....	10
1.3. REFERÊNCIAS.....	12

### CAPÍTULO 2

Concentrações de caseína acentuam dos efeitos adversos de rutina na biologia de <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)?.....	19
2.1. INTRODUÇÃO.....	20
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.2.1. Atividade biológica de <i>A. gemmatalis</i> em dieta artificial com diferentes concentrações de rutina e genistina.....	21
2.2.1.1. Experimento 1.....	21
2.2.1.2. Experimento 2.....	22
2.2.1.3. Experimento 3.....	22
2.2.2. Extração dos flavonóides da proteína de soja.....	22
2.2.3. Condução do experimento.....	23
2.2.4. Análise estatística.....	24
2.3. RESULTADOS.....	26

2.3.1. Experimento 1.....	26
2.3.1.1 Efeito de diferentes concentrações de caseína e 0,65% de rutina adicionados a dieta artificial sobre a biologia e fisiologia de <i>A. gemmatalis</i> .....	26
2.3.1.2. Ganho de peso, crescimento, consumo alimentar, eficiência na conversão dos alimentos ingeridos e digeridos em biomassa e assimilação dos alimentos.....	27
2.3.2. Experimento 2.....	33
2.3.2.1. Efeito de diferentes concentrações de caseína e 1,30% de rutina adicionados a dieta artificial sobre a biologia e fisiologia de <i>A. gemmatalis</i> .....	33
2.3.2.2. Ganho de peso, crescimento, consumo alimentar, eficiência na conversão dos alimentos ingeridos e digeridos em biomassa e assimilação dos alimentos.....	35
2.3.3.Experimento 3.....	39
2.3.3.1. Efeito de diferentes concentrações de caseína e 0,65% e 1,30% de rutina adicionados a dieta artificial sobre a biologia e fisiologia de <i>A. gemmatalis</i> .....	39
2.3.3.2. Ganho de peso, crescimento, consumo alimentar, eficiência na conversão dos alimentos ingeridos e digeridos em biomassa e assimilação dos alimentos.....	41
2.4. DISCUSSÃO.....	45
2.5. REFERÊNCIAS.....	48

### **CAPÍTULO 3**

Aspectos biológicos e fisiológicos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae) alimentada com diferentes concentrações de rutina e genistina.....	51
3.1. INTRODUÇÃO.....	52
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.2.1. Processos para obtenção de genistina.....	54
3.2.1.1. Precipitação ou cristalização.....	54



3.2.1.2 Recristalização.....	55
3.2.2 Atividade biológica e interação das substâncias químicas puras: rutina e genistina sobre <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	58
3.2.3. Extração dos flavonóides da proteína de soja.....	58
3.2.4. Condução do experimento.....	59
3.2.5. Análise estatística.....	60
3.3. RESULTADOS.....	61
3.3.1. Efeito de diferentes concentrações de rutina e genistina adicionados a dieta artificial sobre a biologia de <i>A. gemmatalis</i> .....	61
3.3.2. Ganho de peso, crescimento, consumo alimentar, eficiência na conversão dos alimentos ingeridos e digeridos em biomassa e assimilação dos alimentos.....	63
3.4. DISCUSSÃO.....	68
3.5. REFERÊNCIAS.....	71

## CAPÍTULO 4

Aspectos biológicos e fisiológicos de <i>A. gemmatalis</i> em diferentes genótipos de soja e identificação e quantificação de rutina e genistina nos genótipos estudados.....	75
4.1. INTRODUÇÃO.....	76
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	77
4.2.1. Genótipos de soja.....	78
4.2.2. Quantificação de rutina e genistina.....	78
4.2.2.1 Preparo das amostras.....	78
4.2.2.3 Análises cromatográficas.....	79
4.2.3. Análise estatística.....	80
4.2.3.1. Extração de flavonóides.....	80
4.2.3.2.Aspectos biológicos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	80
4.2.4. Condução do experimento... ..	81
4.3 RESULTADOS.....	82

4.3.1. Efeito de diferentes genótipos de soja e dietas artificiais contendo diferentes concentrações de rutina e genistina sobre a biologia e fisiologia de <i>A. gemmatalis</i> .....	82
4.3.2. Ganho de peso e crescimento, em populações de <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta artificial e com diferentes genótipos de soja com característica de resistência.....	84
4.3.3. Identificação e quantificação de rutina e genistina .....	85
4.4. DISCUSSÃO.....	85
4.5. REFERÊNCIAS.....	88

## CAPÍTULO 5

Efeitos de flavonóides adicionados a dietas e de flavonóides constitutivos de genótipos resistentes no epitélio do intestino médio em lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	92
5.1. INTRODUÇÃO.....	93
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	95
5.2.1 Experimento 1.....	95
5.2.2 Experimento 2 .....	95
5.2.3. Cultivo das plantas e preparo das amostras.....	96
5.2.4 Análises cromatográficas.....	96
5.2.3. Processamento do material para microscopia de .....	97
5.3.RESULTADOS.....	98
5.3.1. EXPERIMENTO .....	98
5.3.1.1. Análise histológica do epitélio do IM de <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações de rutina e genistina.....	98
5.3.2.EXPERIMENTO .....	103
5.3.2.1. Análise histológica do epitélio do IM de <i>A. gemmatalis</i> alimentadas de diferentes genótipos com característica de resistência.....	103
5.4. DISCUSSÃO.....	107
5.5. REFERÊNCIAS.....	111

IMPLICAÇÕES.....116

## EFEITO DE GENÓTIPOS DE SOJA E DE FLAVONÓIDES NA BIOLOGIA E NO INTESTINO MÉDIO *Anticarsia gemmatalis*

**RESUMO** - Resultados de efeitos de compostos fenólicos incorporados em dietas artificiais têm sido contestados, principalmente pela presença de proteínas com alto valor nutritivo, como a caseína, que podem influenciar a atividade dos aleloquímicos. Genótipos de soja resistentes a insetos têm apresentado flavonóides em sua composição, tornando necessária a informação sobre a interação deste fenólico com dieta. Adicionalmente, avaliaram-se os efeitos de dietas artificiais, contendo diferentes concentrações de rutina (R) e genistina (G), e de genótipos de soja nos aspectos biológicos, assim como o modo de ação desses alimentos no intestino médio (IM) de *A. gemmatalis*. O efeito de rutina foi potencializado apenas quando as lagartas se alimentaram com dietas com 7g de caseína, ou seja, a metade da necessária para o desenvolvimento adequado do inseto. Dietas com as maiores concentrações de rutina ( $R_2$ ) e a mistura  $R_1+G_1$  e folhas de PI 227687 e 'IAC-100' foram responsáveis pela maior mortalidade, redução dos pesos iniciais e de pupa, menor ganho de peso e crescimento. Estes tratamentos, principalmente  $R_1+G_1$  e 'IAC-100' ainda provocaram maiores alterações morfológicas no IM da lagarta. Dietas e genótipos contendo apenas genistina não apresentaram acentuado efeito antinutricional no inseto e nem alterações morfológicas importantes. Assim sendo, estes resultados permitem concluir que a interação das substâncias R e G observadas em folhas de soja, como a 'IAC-100' e PI 227687, atua na proteção da planta ao ataque de *A. gemmatalis*, possivelmente por alterar as células colunares do IM.

**Palavras-chave:** *Glycine max*, lagarta-da-soja, resistência

**EFFECT OF GENOTYPES OF SOY and FLAVONÓIDES In BIOLOGY THE *Anticarsia gemmatalis* AND MIDGUT CELLS**

**SUMMARY** - Results regarding the effects of phenolics incorporated in artificial diets have been contested, mainly by the presence of high nutritive proteins as casein. This protein can cause deep influence in the alelochemical activity on herbivores. Resistant soybean genotypes have presented flavonoids, as rutin (R), in their chemical profile, turning necessary the information related to the interaction of such phenolic compound with the artificial diet. Additionally, effects of diets, with different concentration of R and genistin (G), and of soybean leaves on biological aspects, as well as, on the mode of action of them in *A. gemmatalis* midgut were evaluated. Rutin effect was only potentialized when larvae fed on diet with 7g of casein, i.e., half of amount necessary for an adequate insect development. Insects fed on artificial diet containing R<sub>2</sub> (the highest rutin concentration) or R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> (mixture of R and G), on PI 227687 and 'IAC-100' caused higher mortality, reduction in weighs of larvae (end of second instar) and pupae, also gained less weigh and presented lower growth compared to other diets. These treatments, mainly R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> and 'IAC-100' also presented more morphologic alterations in the insect midgut. Diets and genotypes containing only genistin did not show accentuated antinutritional effect and presented less intense morphologic alterations in the insect midgut. Thus, these results allow suggesting that R and G, observed in leaves of soybean, as 'IAC-100' and PI 227687, interacts in the protection of the plant to *A. gemmatalis* attack, possibly by causing alterations in columnar cells of midgut.

**Key-Words:** *Glycine max*, resistance, soybean caterpillars.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é responsável por grande parte da produção mundial de grãos, a soja (*Glycine max*) considerada a principal cultura de exportação brasileira (CONAB 2007), sendo a espécie vegetal de maior importância econômica, colocando o país como o segundo maior produtor e exportador de farelo e grãos de soja no mundo (REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA 2005). Como o Brasil é o único produtor mundial com potencial de expandir significativamente a sua área total de cultivo existem perspectivas para liderar o mercado mundial. Ainda, no contexto das grandes culturas produtoras de grãos, a soja foi a que mais cresceu em termos percentuais nos últimos 35 anos, tanto no Brasil, quanto no mundo (CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA 2006). O complexo soja representa 12% do Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio do país e, apenas em 2005, atingiu o montante de U\$ 9,5 bilhões com a sua exportação (BOLETIM DE PESQUISA DE SOJA 2007). Em levantamento realizado pela Conab na safra 2006/2007, o país atingiu a produção 58,4 milhões de toneladas, o que representou um aumento de 5,8% em relação à safra anterior.

Um importante fator de redução de produtividade em diferentes espécies vegetais cultivadas são os insetos-praga. Na soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), também conhecida como a “lagarta-da-soja”, é uma das principais pragas desfolhadoras e, no Brasil, encontra-se distribuída em praticamente todas as áreas de cultivo. Em condições normais, essa praga ocorre nas lavouras a partir de novembro, nas regiões ao Norte do Paraná, e a partir de dezembro a janeiro em todo o Sul do País, causando desfolhamento que pode chegar a 100% (HOFFMANN-CAMPO et al. 2000, SILVA 2000). A planta de soja apresenta excepcional capacidade de recuperação durante o período vegetativo e de florescimento (SOZA-GOMEZ et al.1992). Porém, a ocorrência dessa lagarta no estágio de surgimento de vagens pode causar grande prejuízo aos

agricultores. Na fase reprodutiva a soja é mais sensível ao desfolhamento, pois neste período ocorre o deslocamento de carboidratos das folhas para formação das vagens e desenvolvimento dos grãos (GAZZONI & MOSCARDI 1998).

As infestações de pragas nas culturas, em geral, são controladas através da utilização de agrotóxicos. Contudo, apesar da importância dos inseticidas para o controle de pragas, seu uso indiscriminado é ecologicamente nocivo e pode desencadear a resistência dos insetos aos produtos utilizados, surtos de pragas secundárias, efeitos adversos em organismos benéficos, resíduos indesejáveis em alimentos e danos diretos aos aplicadores dos produtos (HOFFMANN-CAMPO 2005).

Na busca da redução do uso do controle químico, técnicas alternativas estão sendo utilizadas sendo, uma delas, a resistência de plantas. A utilização de cultivares de plantas com resistência a pragas é considerado como o método ideal de controle, uma vez que as populações podem ser reduzidas abaixo do nível de dano econômico sem necessidade do controle químico, diminuindo assim a poluição ambiental (LARA 1991). Ainda, essa técnica de controle apresenta vantagens sobre as demais, uma vez que não requer a adoção de tecnologia sofisticada por parte dos agricultores e, não apresenta custos adicionais.

Os mecanismos de defesa da planta abrangem uma série de características morfológicas e também, um complexo de substâncias químicas, que podem torná-la repelente, tóxica ou, de algum modo, inadequada para os insetos-praga (PIUBELLI 2004). Na soja, as substâncias de defesa mais prováveis são os flavonóides (HOFFMANN-CAMPO 1995), que em geral são mais abundantes nos genótipos resistentes às pragas. A rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo) é reconhecida por desempenhar papel importante na defesa da planta contra lepidópteros (HOFFMANN-CAMPO et al. 2001) sendo um dos compostos identificados em extratos de folhas de PI 227687, PI 274454 e outros, poucos, genótipos resistentes a insetos (PIUBELLI et al., 2005). Embora em menor concentração, o isoflavonóide genistina (genisteína 7-O-β-D-glicosídeo) também foi observado na maioria dos extratos foliares dos genótipos estudados por PIUBELLI et al. (2005) e utilizados pelos programas de melhoramento como fonte de resistência a insetos desfolhadores.

Os métodos de controle de insetos: químico, biológico e resistência de plantas, atuam no sistema digestivo do inseto, especialmente no intestino médio (IM), devido à necessidade de serem ingeridos pelas lagartas. O efeito nutricional e pós-ingestivo dos flavonóides nas células epiteliais do IM, foram pouco estudados. A falta de informação a respeito do modo de ação da rutina na defesa da planta e sua participação na quebra da resistência de *A. gemmatalis* ao seu baculovírus conforme foi indicado em experimentos anteriores (PIUBELLI et al. 2006). Ainda, o fato da genistina estar presente na maioria dos genótipos com característica de resistência estudados, reforçam a necessidade de estudos estruturais sobre o IM destes insetos, possível local de atuação dos flavonóides.

### **1.1.1. O inseto**

A lagarta-da-soja, *A. gemmatalis* é o principal inseto desfolhador da soja e, no Brasil, quando não controlado adequadamente, pode causar graves danos econômicos. Juntamente com o complexo de percevejos são responsáveis por praticamente 90% do total de aplicações de inseticidas na cultura da soja (MOSCARDI & SOSA-GOMEZ 1992).

Em geral, a lagarta-da-soja apresenta coloração totalmente verde, pardo-avermelhada ou preta com estrias brancas sobre o dorso, e é caracterizada pela presença de cinco pares de falsas pernas abdominais (HOFFMANN-CAMPO et al. 2000). Nos estágios iniciais, as lagartas dependuram-se por um fio de seda, tanto para mudar de lugar na planta, quanto para não caírem no solo (denominado estágio de “fio”) e se comportam como mede-palmos. No entanto, quando mais desenvolvidas, perdem o hábito mede-palmo, são ativas e caem ao solo quando incomodadas.

Sob condição de alta população podem apresentar coloração preta, mantendo as estrias brancas (HOFFMANN-CAMPO et al. 2005). Passam por seis estágios larvais, podendo atingir até 40mm de comprimento e, em seguida, se transformam em pupas no



solo. O adulto é uma mariposa de coloração variando entre, cinza, marrom e bege, tendo sempre presente uma linha transversal unindo as pontas do primeiro par de asas.

O processo reprodutivo ocorre durante o período noturno, sendo os ovos depositados isoladamente no caule, nos ramos, nos pecíolos e na face inferior das folhas. O ciclo ovo - adulto de *A. gemmatalis* dura em média 27 dias, sendo a longevidade dos adultos cerca de 20 dias. Cada fêmea ovípara cerca de 1000 ovos (HOFFMANN-CAMPO et al. 2005).

Na fase de “fio”, as lagartas inicialmente raspam o tecido foliar, a partir do terceiro estágio consomem o limbo foliar e as nervuras, deixando pequenos buracos nas folhas, provocando reduções da área foliar e, conseqüentemente, da taxa fotossintética. Nos casos mais severos, há perda total da folha, inclusive das nervuras e do pecíolo. Em função da época do ataque, do nível da infestação e das condições ambientais, a redução da área foliar pode ocasionar perdas de produtividade.

A lagarta-da-soja ataca a planta em todos os estádios da cultura e não apenas nas fases de desenvolvimento e florada. Na fase de enchimento das vagens e granação da soja a praga pode atacar a lavoura, provocando a queda das folhas e prejudicando a nutrição da planta.

### **1.1.2. Resistência de plantas**

O termo resistência de plantas à insetos é utilizado para descrever a capacidade da planta de evitar ou reduzir os danos causados por fitófagos (LARA 1991). Segundo PAINTER (1951), resistência é a soma relativa de qualidades hereditárias da planta, que influenciam no intensidade de dano que o inseto causa. Em igualdade de condições, algumas plantas alcançam maior rendimento e qualidade comparadas a outras variedades em geral, quando atacadas por insetos.

As substâncias químicas desempenham importante função não somente na escolha inicial, como na determinação da quantidade de alimento que o inseto vai

ingerir (BECK, 1965; FRAENKEL, 1969; JERMY, 1966; SRIVASTAVA et al. 1999). De acordo com a classificação de PAINTER (1951), existem três tipos de resistência: (1) não-preferência: quando uma planta ou cultivar, é preterida pelo inseto para alimentação, oviposição ou abrigo; (2) antibiose: quando a planta exerce efeito adverso sobre a biologia do inseto; e (3) tolerância: quando a planta sofre menos danos em relação às outras, em igualdade de condições, ou seja, sob um mesmo nível de infestação de determinada espécie de inseto, sem afetar o comportamento deste ou sua biologia.

A resistência a insetos está relacionada, principalmente, a substâncias químicas (aleloquímicos) presentes nas plantas hospedeiras, tais como alcalóides, flavonóides, terpenóides, esteróides, etc. (KUBO & HANKE 1986). Os aleloquímicos são definidos como metabólitos secundários, ou seja, substâncias não nutritivas, produzidas por uma espécie, e que afetam a sobrevivência, crescimento, comportamento, fecundidade ou fertilidade de indivíduos de outra espécie (KOGAN 1986). De acordo com a natureza dos compostos envolvidos, as defesas das plantas podem ser constitutivas (independente de estresse) ou induzidas (dependente de estresse). Segundo aquele autor, os dois mecanismos são de difícil separação, principalmente porque as respostas das plantas podem ser elicitadas por fatores ambientais.

Os flavonóides são substâncias químicas fenólicas que ocorrem amplamente nas plantas (HARBONE 1967), desempenhando as mais variadas funções, tais como, proteção à radiação ultravioleta, à insetos, a doenças causadas por fungos, bactérias e vírus; atraentes para polinização (pétalas coloridas); dispersantes de sementes (frutas vermelhas); controladores de hormônios; estimulantes à produção de nódulos pelos rizóbios; inibidores enzimáticos, antioxidantes e agentes aleopáticos (MARKHAM 1989). Segundo MARKHAM (1982), os flavonóides podem ser divididos em flavonas, flavonóis, antocianina, isoflavona, flavanonas, diidroflavonóis, biflavonóides. Pesquisas sobre o efeito antinutricional dos flavonóides em insetos têm se concentrado nos seus efeitos em pragas na agricultura, para determinar como estes compostos podem lhes conferir resistência (HARBORNE & GRAYER 1993).

Comparados a muitas outras substâncias secundárias, os flavonóides não são especialmente tóxicos, e têm baixa atividade fisiológica em muitos insetos. No entanto, muitos flavonóides podem agir como deterrente alimentar para insetos fitófagos, em concentrações relativamente baixas (HARBORNE & GRAYER 1993). São compostos fenólicos e podem ser atraentes, deterrentes, repelentes e tóxicos aos insetos (SIMMONDS 2001). Além disso, flavonóides com estrutura relativamente parecidas, podem agir de forma diferente no mesmo inseto (HARBORNE & GRAYER 1993), como no caso da rutina (quercitina 3-*O*-rutinosídeo) que funciona como estimulante alimentar para *Manduca sexta paphus*, enquanto a quercetina 3-rhamnosídeo que possui menor quantidade de açúcar em relação a rutina age como deterrente (BOER & HANSON 1987).

Rutina foi responsável por um prolongamento no ciclo de *A. gemmatilis* (GAZZONI et al. 1997; HOFFMANN et al. 2006) e alta mortalidade, em populações da lagarta suscetíveis e resistentes ao baculovírus (PIUBELLI et al. 2006). Entretanto, dependendo da concentração e da espécie de inseto, rutina pode ser estimulante alimentar, como no caso do gafanhoto *Schistocerca americana* (Drury) (BERNAYS et al. 1991).

A resposta do inseto em relação a rutina, pode variar conforme a concentração testada. Em concentrações maiores que  $10^{-3}$  molar foi deterrente para *Heliothis zea* (Boddie) e *Helicoverpa armigera* (Hübner) no final do estágio larval, mas em concentrações menores que  $10^{-4}$  molar estimula a alimentação (BLANEY & SIMMONDS 1983; citado por SIMMONDS 2001).

Os isoflavonóides são uma classe distinta de flavonóides e demonstram uma vasta extensão de propriedades biológicas, mas provavelmente as mais importantes são atividades estrogênicas, antifúngicas e bactericidas das fitoalexinas; ainda os rotenóides apresentaram a atividade inseticida (WILLIAMS & HARBORNE 1989). Porém pouco se sabe, sobre seus efeitos na preferência alimentar e na biologia de pragas.

Ainda que a importância das substâncias químicas na defesa das plantas a insetos e doenças seja reconhecida desde 1950, somente na última década a sua

utilização pelos melhoristas tem aumentado, devido, principalmente, aos progressos na biologia molecular e genética (SRIVASTAVA et al. 1999). A resistência de genótipos a insetos pode ser obtida através do melhoramento das plantas cultivadas, incorporando os fatores de resistência desejados, por métodos tradicionais e/ou engenharia genética.

O comportamento dos herbívoros depende das substâncias químicas das plantas (ROWELL-RAHIER & PASTEELS 1992), mas segundo VANDRIESCHE & BELLOWS Jr. (1996), o nível de resistência das plantas não deve ser muito elevado, de forma a suplementar os efeitos dos inimigos naturais existentes. Se for muito alto poderá reduzir o sistema a um só fator, e em conseqüência, tornar a resistência menos estável ao longo do tempo, podendo acelerar a adaptação da praga à variedade (PIUBELLI 2004).

Os genótipos que apresentam o tipo de resistência não preferência ou antibiose, afetam negativamente os insetos, causando alterações no metabolismo que se refletem na duração do ciclo, fecundidade e sobrevivência. Aliadas às características morfológicas, as substâncias químicas das plantas podem afetar o comportamento da praga, principalmente na seleção do hospedeiro para alimentação e oviposição (VENDRAMIM & CASTIGLIONI 2000) e biologia e fisiologia de insetos (HOFFMANN-CAMPO 1995; HOFFMANN-CAMPO et al. 2001; 2006). Assim, a utilização de cultivares com característica de resistência moderada podem reduzir a incidência de pragas, resultando em menor perda na produção.

### **1.1.3. Resistência de soja a insetos**

Os mecanismos bioquímicos da resistência de soja a insetos são diversos e, provavelmente, envolvem substâncias voláteis das folhas (LIU et al. 1988), variação na concentração de nutrientes, excitantes alimentares ou deterrentes, e antibióticos (FISHER et al. 1990). As substâncias voláteis das folhas podem estar envolvidas na fase inicial do processo de seleção do hospedeiro como atraentes em genótipos suscetíveis, ou repelentes em genótipos resistentes (LIU et al. 1988). Os voláteis das

plantas também podem ser usados como sinalizadores para os inimigos naturais dos herbívoros para encontrar suas presas ou fornecer-lhes abrigo ou alimento alternativo (ROWELL-RAHIER & PASTEELS 1992).

Compostos fenólicos, em geral, desempenham importante função na defesa da planta contra microrganismos e insetos pragas (DIXON & STEELE 1999) e alguns deles como os flavonóides, dependendo da concentração podem ser atraentes, deterrentes, repelentes, ou tóxicos às pragas que atacam a cultura da soja (HOFFMANN-CAMPO et al. 2001).

A maioria das plantas selvagens ou cultivadas possui algum grau de resistência a insetos (KOGAN 1986). Ainda que a soja e outras leguminosas não apresentem metabólitos secundários com potencial aleloquímico evidente (KOGAN 1986), muitos flavonóides, constitutivos ou induzidos, foram identificados em diferentes partes da planta (HOFFMANN-CAMPO 1995). A rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo) foi um dos flavonóides encontrados no genótipo PI 227687 (HOFFMANN-CAMPO 1995). Esse genótipo tem sido amplamente utilizado em programas de melhoramento como fonte de resistência a insetos desfolhadores. Também tem mostrado efeito antibiótico e/ou antinutricional em diversos insetos sugadores (GILMAR et al. 1982, PIUBELLI et al. 2003) e mastigadores (HOFFMANN-CAMPO et al. 2001, 2006; PIUBELLI et al. 2005; SIMMONDS 2001; STAMP & SKROBOLA 1993).

O desenvolvimento de plantas resistentes é uma forma de prevenir a adaptação de insetos e diminuir a poluição ambiental; assim, esforços têm sido feitos para obter linhagens e cultivares com pelo menos níveis moderados de resistência a insetos. Diferenças acentuadas no nível de resistência a herbívoros são observadas entre cultivares e linhagens de soja. Altos níveis de resistência a artrópodes que se alimentam de folhas têm sido constantemente registrados em diversos genótipos orientais; PI 171451, PI227687; PI 229358 (KOGAN 1991). Além disso, a cultivar IAC-100 apresentou resistência a *A. gemmatilis*, (LOURENÇÃO et al. 2000). Em estudos realizados por PIUBELLI et al. (2003) com *Nezara viridula*, observou-se que os genótipos PI 227687 e 'IAC 100' foram os que causaram maiores efeitos negativos na biologia e sobrevivência do inseto.

A bioatividade de extrato foliar da PI 227687, resistente a insetos, foi testado em *Heliothis virescens* (Fabr. 1781) (HOFFMANN-CAMPO 1995), *Trichoplusia ni* (Hübner) (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001) e *A. gemmatalis* (PIUBELLI, 2004). A biologia e fisiologia das lagartas que se alimentaram de dieta artificial contendo esses extratos foram negativamente afetados. A rutina também afeta negativamente o desenvolvimento de *A. gemmatalis* Hübner (HOFFMANN-CAMPO et al. 2006; PIUBELLI 2005).

Cultivares com nível moderado de resistência a insetos, em associação com outras táticas de controle para o manejo integrado de pragas, podem diminuir ou até mesmo eliminar o uso de inseticidas, contribuindo assim para a sustentabilidade ecológica de sistemas agrícolas. Rutina e genistina têm sido relatadas como as substâncias mais evidentes associadas à resistência de soja a desfolhadores (PIUBELLI 2004). Muitos compostos e substâncias foram extraídos, isolados e algumas vezes identificados na soja. Porém, o papel que representam na interação da soja com pragas da cultura não está totalmente esclarecido.

Estudos dessa natureza são importantes no processo de obtenção de cultivares resistentes a insetos. As informações sobre as substâncias biologicamente ativas em insetos e a sua detecção precoce podem acelerar o processo de desenvolvimento de cultivares com característica de resistência a pragas, através, principalmente, da biologia molecular.

#### **1.1.4. Tubo digestivo de *Anticarsia gemmatalis***

Nos insetos, o sistema digestivo é formado basicamente pelo canal alimentar e por órgãos anexos, sendo responsável pelo mecanismo de alimentação e estrutura química-digestiva dos alimentos. O canal alimentar é formado por três regiões morfofuncionais distintas: o intestino anterior, o intestino médio e o intestino posterior (CHAPMAN 1998), sendo o intestino médio (IM) o principal local de digestão, absorção

do alimento e a principal via de acesso dos inseticidas tanto os químicos como os biológicos (MOSCARDI & CARVALHO 1993).

Em *A. gemmatalis*, o IM é formado por um epitélio pseudoestratificado colunar, com pelo menos quatro tipos celulares distintos: células colunares, calciformes, regenerativas e endócrinas (LEVY 2000; LEVY et al. 2007), sendo esta estrutura assim descrita também em outras espécies de Lepidoptera (CHIANG et al. 1986; BINDER & BOWERS 1994). O epitélio é revestido por uma estrutura acelular denominado de membrana peritrófica (MP) que separa o epitélio do conteúdo intestinal protegendo-o contra abrasão, atuando como barreira permeável às enzimas digestivas e produtos da digestão (EISEMANN & BINNINGTON 1994; TERRA 2001), além de formar uma barreira que dificulta ou impede a entrada de microrganismos na cavidade do corpo (WANG & GRANADOS, 2001).

Como o IM tem papel importante na absorção dos metabólitos secundários e, possivelmente, na intensidade de seu efeito sobre os insetos, informações sobre alterações estruturais em suas células podem elucidar como os flavonóides da soja agem sobre a lagarta-da-soja.

## **1.2. Objetivos**

### **Objetivo geral**

Avaliar a atividade biológica de genótipos de soja e de flavonóides (rutina e genistina) sobre *A. gemmatalis*.

### **Objetivos específicos**

- Avaliar se a caseína, proteína de alto valor energético, contida na dieta potencializa a atividade da rutina.

- Testar o efeito das interações das substâncias químicas puras: rutina e genistina, incorporadas à dieta artificial de *A. gemmatalis*.
- Comparar o efeito das substâncias químicas puras incorporadas à dieta artificial com folhas de genótipos que as possuem em sua constituição.
- Verificar as possíveis diferenças morfológicas e ultraestruturais no intestino médio de *A. gemmatalis*, alimentadas com folhas de genótipos e dietas artificiais contendo rutina e genistina.



### 1.3. REFERÊNCIAS

- BECK, S.D. Resistance of plants to insects. **Ann. Rev. Entomol.** v.10., p. 207-232, 1965.
- BERNAYS, E. A. & RAUBENHEIMER D. Dietary Mixing in Grasshoppers: Changes in Acceptability of Different Plant Secondary Compounds Associated With Low Levels of Dietary Protein (Orthoptera: Acrididae). **J. Insect Behav.** v.5, p. 545-556, 1991 .
- BINDER, B.F.; BOWERS, W.S. Precocene II induced changes in the anatomy of midgut goblet cells of last instar larvae of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). **Int. J. Insect Morphol. Embriol.** v.3, p.127-134, 1994.
- BOER, G. & F.E. HANSON. Feeding responses to solanaceous allelochemicals by larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Entomol. Exp. Appl.** 45: 123-131,1987.
- CHAPMAN, R.F. **The Insects: structure and function.** 4ed. Cambridge: Havard University Press, 1998. p.38-68.
- CHIANG, A.S; YEN, D.F; PENG, W.K. Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. **J. Inv. Pathol.** v. 47, p. 333-339, 1986.
- COMPAINHA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **Central de informações agropecuárias.**  
Disponível em: [www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2\\_levantamento\\_200708pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2_levantamento_200708pdf)  
Acesso em 10 de março de 2008
- CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2006. 156 p.

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

EISEMANN, C.H.; BINNINGTON, K.C. The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. **Int. J. Parasitol.**, v.24, p. 15-26, 1994.

FISHER, D.C, KOGAN M.; PAXTON J. Effects of glyceollin, a soybean phytoalexin, on feeding by three phytophagous beetles (Coleoptera: Coccinellidae and Chrysomelidae): dose X response. **Environ. Entomol**, v. 19, p. 78-82, 1990.

FRAENKEL, G. Evaluation of our thoughts on secondary plant substances. **Entomol. Exp. Appl.** v.12, p. 473-486, 1969.

FUNDAÇÃO MT **Boletim de Pesquisa de Soja**, v.11, Rondonópolis, p. 199 - 216, 2007.

GAZZONI, D.L.; MOSCARDI F. Effect of defoliation levels on recovery of leaf area, on yield and agronomic traits of soybeans. **Pesq. Agropec. Bras.** v.33., p. 411-424, 1998.

GAZZONI, D. L., A. HULSMEYER & C.B. HOFFMANN-CAMPO. Efeito de diferentes doses de rutina e quercitina na biologia de *Anticarsia gemmatilis*. **Pesqu. Agropec. Bras.** v.32, p. 673- 681, 1997.

GILMAR, D.F. et al. Resistance in soybeans to the southern green stink bug. **Crop Sci.** v.22, p. 573-576, 1982.

HARBORNE, J.B. **Comparative biochemistry of the flavonoids**. London: Academic Press, 1967, 249 p.

HARBORNE, J.B.; GRAYER, R.J. Flavonoids and insects. In: HARBORNE, J.B (ed). **The Flavonoids: advances in research since 1986**, London: Chapman & Hall, 1993.

HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. 165 p. PH.D. Dissertation, The University of Reading, Reading.

HOFFMANN-CAMPO, C.B., et al. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina, Embrapa Soja, Circular Técnica n.30, 2000, 70p.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; HARBONE J.B; MCAFFERY A.R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomol. Exp. Applic.** v.98, p. 181-194, 2001.

HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Trabalhador no cultivo de grãos e oleaginosas: soja-Mip**. Curitiba: SENAR, Paraná, 2005, 82 p.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; RAMOS NETO J.A; OLIVEIRA M.C; OLIVEIRA L.J. Detrimental effect of rutina on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesqu. Agropecu. Bras.** v. 41, p. 1453-1459, 2006.

JERMY, T. Feeding inhibitors and food preference in chewing phytophagous insects. **Entomol. Exp. Appl.** v.9., p.1-12, 1966.

KOGAN, M. Natural chemical in plant resistance to insects. Iowa State **J. Res.** v.60, p. 501-527, 1986.

KOGAN, M.; FISCHER D.C. Inducible defenses in soybean against herbivorous insects, p.347-380. In W.D. TALLAMY; RAUPP M.J. (eds.), **Phytochemical induction by herbivorous**. New York, John Wiley & Sons, 1991, 432p.

KUBO, I. & F.G. HANKE. Chemical methods for isolating and identifying phytochemicals biologically active in insects. In: MILLER, J.R. & MILLER, T.A. (eds.), **Insect-plant interactions**. New York, Spring-Verlag, p. 225-249, 1986 ,374p.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, 1991, 336p.

LIU, S.H.; NORRIS, D.N. & MARTI E. Behavioral response of female adult *Trichoplusia ni* to volatiles from soybean versus a preferred host, lima bean. **Entomol. Exp. App.** v. 49, p. 99 -104, 1988.

LEVY, S.M. **Morfologia do tubo digestivo de *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) durante o desenvolvimento larval**. 2000, 93p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LEVY, S. M.; FALLEIROS, A. M. F.; MOSCARDI, F.; GREGÓRIO, E. A. Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): Structural study of the peritrophic membrane. **J. Invertebr. Pathol.** v. 96, p. 183-186, 2007.

LOURENÇÃO, A L; PEREIRA, J.C.V.N.A.; MIRANDA, M.A.C.; AMBROSANO, G.M.B. Avaliação de danos causados por percevejos e por lagartas em genótipos de soja de ciclos precoce e semiprecoce. **Pesq. agropec. bras.** Brasília. v. 35, P. 879-886, 2000.

MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. Biological Techniques Series. London: Academic Press, 1982, 113p.

MARKHAM, K.R. Flavones, flavonols and their glycosides. In: DEY P.M. & HARBONE J.B. (eds.), **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, p. 197-235, 1989, 552p.

MOSCARDI, F.; CARVALHO, R.C.Z. Consumo e utilização de soja por *Anticarsia gemmatalis* Hub. (Lepidoptera: noctuidae) infectada, em diferentes estádios larvais, por seu vírus da poliedrose nuclear. **An. Soc. Entomol. Bras.** v. 22, p.267-280, 1993.

PAINTER, R.H. **Insect resistance in crop plants.** New York, 1951. 520p.

PIUBELLI, G.C., et al. Augmentation of flavonoid production in soybean genotypes as response of *Nezara viridula* injury and its role on the insect feeding preference. **J. Chem. Ecol.** v. 29, p. 1223-1233, 2003.

PIUBELLI, G.C. **Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais.** 2004. 152p. Tese Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

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*. **J. Chem. Ecol.** v. 31, p. 1515-1531, 2005.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. de. Baculovirus-resistant *Anticarsia gemmatalis* responds differently to dietary rutin. **Entomol. Exp. Appl.** v. 119, p. 53-60, 2006.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 27, 2005, Cornélio Procópio. **Ata...** Londrina: Embrapa Soja, 2005. 394 p.

ROWELL-RAHIER, M. & PASTEELS, J.M. Third trophic level influence of plant allelochemicals. In: ROSENTHAL, G.A. & BERENBAUM, M.R. (eds.), **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites.** San Diego, Academic Press, p. 243-277, 1992, 452p.

SILVA, M.T.B. 2000. Manejo de insetos nas culturas de milho e soja. In: GUEDES, J.M., COSTA, I.D. & CASTIGLIONI, E. (eds.). **Bases e técnicas do manejo integrado de pragas**. Santa Maria, UFSM/ CCR/ DFS: Pallotti, p. 169-200, 2000, 234p.

SIMMONDS, M.S.J. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. **Phytoch.** v. 56, p. 245-252, 2001.

SOZA-GOMEZ, D.R.; GAZZONI, D.L.; CORREA-FERREIRA, B.; MOSCARDI, F. Pragas da soja e seu controle. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I. de M. de., ed. **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 299-331. Trabalho apresentado no Simposio sobre Cultura da Soja nos Cerrados, Uberaba, 1992.

SRIVASTAVA, R., Y.N. SHUKLA & S. KUMAR. Recent advances in the chemistry of insect antifeedants. **J. Med. Arom. Plant Sci.** v. 21, p. 59-76, 1999.

STAMP N.E. & C.M. SKROBOLA. Failure to avoid rutin diets results in altered food utilization and reduced growth rate of *Manduca sexta* larvae. **Entomol. Exp. Appl.** v. 68, 127-142, 1993.

TERRA, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Arch. Insect Biochem Physiol.**, v. 47, p. 47-61, 2001.

VENDRAMIM, J.D. & E. CASTIGLIONI. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: J.C. GUEDES, I.D. COSTA & E. CASTIGLIONI (eds). **Bases e técnicas do manejo integrado de insetos**. Santa Maria, UFSM/CCR/DFS, Pallotti, p. 113-128. 2000, 248p.

WANG P.; GRANADOS R.R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, p.110-118, 2001.

WILLIAMS, C.A. & HARBORNE, J.B. Isoflavonoids, In: **Methods in Plant Biochemistry**. Academic Press Limited, 1989.

VANDRIESCHE, R.G. & T.S. BELLOWS JR. 1996. Biological Control, New York, Chapman & Hall, 539p.

## **CAPÍTULO 2 - Concentrações de Caseína Acentuam os Efeitos Adversos de Rutina na Biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)?**

**RESUMO** - O flavonól rutina é reconhecido por desempenhar papel importante na proteção de plantas contra lepidópteros; no entanto; estudos com esta substância, em geral são feitos em dieta artificial. Proteínas de alto valor energético, como a caseína são ingredientes da dieta artificial para a criação de insetos e importante fonte de aminoácidos essenciais, podendo, entretanto, influenciar a atividade dos aleloquímicos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação de rutina, incorporada à dieta com diferentes concentrações de caseína, em populações de *A. gemmatalis*. Com base na quantidade utilizada na dieta, foram testadas três concentrações de caseína: 0; 7g e 14g, combinadas a 0,65% e 1,30% de rutina. Observou-se influência negativa, nos pesos secos iniciais, peso de pupa, dieta consumida e, ainda, prolongamento no ciclo larval dos insetos alimentados de dietas com adição de rutina. Esses efeitos atingiram maior intensidade em insetos que consumiram dietas com 7g de caseína com rutina em qualquer concentração, onde ocorreu também o maior índice de mortalidade. Comparando os tratamentos sem adição de caseína + rutina (SC+R) às dietas com 14g de caseína, quantidade padrão utilizada em dieta artificial para suprir a necessidade protéica dos insetos com rutina, o tratamento SC+R em qualquer concentração foi mais afetado. Assim sendo, possivelmente, o efeito de rutina pode ser potencializado apenas quando as dietas não são nutricionalmente adequadas.

**Palavras-chave:** Flavonóides, lagarta-da-soja, parâmetros biológicos.



## 2.1. INTRODUÇÃO

Os flavonóides estão extensamente distribuídos no reino vegetal (HARBORNE 1967, SIMMONDS 2001) e desempenham importante função na defesa da planta contra microrganismos e insetos pragas (DIXON & STEELE 1999), podendo ser atraentes, deterrentes, repelentes, ou tóxicos às pragas (HOFFMANN-CAMPO et al. 2001). O flavonol rutina (quercitina 3-*O*-raminoglicosídeo), foi detectado no genótipo de soja PI 227687 (HOFFMANN-CAMPO 1995; HOFFMANN-CAMPO et al. 2001, PIUBELLI 2004). Esse genótipo tem sido amplamente utilizado pelos programas de melhoramento como fonte de resistência a insetos desfolhadores. O flavonól rutina é um dos compostos fenólicos que tem mostrado efeito antibiótico e/ou antinutricional em diversos insetos mastigadores (STAMP & SKROBOLA 1993), inclusive *A. gemmatalis* (HOFFMANN-CAMPO et al. 2006).

Proteínas ou aminoácidos são essenciais às dietas de insetos em desenvolvimento, e são exigidas em altas concentrações para um crescimento ótimo (PANIZZI & PARRA 1991). Entre as proteínas, a caseína tem sido bastante utilizada, por conter todos os aminoácidos essenciais, ser solúvel em água, não coagular ou precipitar com o aquecimento (PARRA 1979). Além disso, possui traços de substâncias importantes como ácidos graxos, colesterol, açúcares, vitaminas e minerais (VANDERZANT 1966, citado por PARRA 1979).

A ação de uma substância química de defesa da planta na biologia e comportamento do inseto raramente é estudada de forma independente de outros compostos químicos. Segundo DUFFEY & STOUT (1996), os ingredientes utilizados em dieta artificial para a criação de insetos podem aumentar o impacto dos compostos químicos relacionados à defesa da planta. Os mesmos autores afirmam ainda que proteínas de alto valor energético, como a caseína, um dos ingredientes da dieta artificial da lagarta-da-soja, quando associada ao ácido clorogênico, aumenta a influencia negativa dessa substância no crescimento das larvas de lepidópteros. Essa substância é um composto fenólico (como rutina) e, portanto, informações sobre a

possibilidade de interação entre a caseína e rutina torna-se essencial para confirmar a viabilidade dos resultados sobre o efeito do flavonóide em insetos obtido em dietas artificial. Assim, considerando o que foi apontado por DUFFEY & STOUT (1996) quanto ao possível efeito de produtos químicos sobre a atividade de aleloquímicos e a participação da caseína como fonte de aminoácidos essenciais em dietas artificiais, o presente trabalho teve como objetivo precípua avaliar o efeito dessa proteína sobre a ação da rutina na biologia de *A. gemmatalis*.

## **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os bioensaios foram realizados nos laboratórios de Interação Inseto-Planta e Fitoquímica, da Embrapa Soja, Londrina-PR, no ano de 2007. A dieta artificial utilizada foi à base de feijão, proteína de soja, gérmen de trigo, caseína e agar de acordo com o método de (GREENE et al. 1976, modificada por HOFFMANN-CAMPO et al. 1985). As lagartas utilizadas nos ensaios foram provenientes do laboratório de criação de insetos da Embrapa Soja. A rutina utilizada nos experimentos foi da marca Sigma e a quantidade utilizada no experimento foi baseada na porcentagem do flavonóide encontrada por HOFFMANN-CAMPO (1995) em genótipos de soja. Estudando a bioatividade do extrato foliar do PI 227687, essa autora constatou a concentração de 0,641% (peso seco) de rutina na fração mais polar do extrato.

### **2.2.1. Atividade biológica de *A. gemmatalis* em dieta artificial com diferentes concentrações de rutina e genistina**

Para avaliar a ação de diferentes concentrações de caseína e rutina na biologia de *A. gemmatalis* foram realizados três experimentos.

#### **2.2.1.1. Experimento 1**

Na dieta artificial, foram utilizadas três concentrações de caseína (valores baseados na quantidade usual da dieta): 0; 7g e 14g combinadas a 0,65% de rutina,

sendo que estas mesmas concentrações também foram avaliadas sem a adição do flavonóide. Os tratamentos consistiram de dieta normal (DN, 14g) de caseína, sem adição de rutina; dieta normal (14g) de caseína, com adição de 0,65% de rutina (14g+ R 0,65%); dieta com metade da caseína (7g), com adição de rutina (7g+R 0,65%), dieta sem caseína (SC) e dieta sem caseína com adição de 0,65% de rutina (SC+ R 0,65%).

### **2.2.1.2. Experimento 2**

Foram utilizados os mesmos tratamentos do experimento 1, ou seja, as duas concentrações de caseína, combinadas com uma concentração maior de rutina, 1,30%.

### **2.2.1.3. Experimento 3**

Para este experimento foram adotados os seguintes tratamentos: DN (14g), sem rutina; DN com 0,65% de rutina (14g+R 0,65%); DN com 1,30% de rutina (14g+R 1,30%); dieta sem caseína (SC), com 0,65% de rutina (SC+R 0,65%); e dieta sem caseína, com 1,30% de rutina (SC+R 1,30%).

## **2.2.2. Extração dos flavonóides da proteína de soja**

Para assegurar a quantidade dos flavonóides na dieta artificial, e que os efeitos nutricionais e pós-ingestivos observados nas lagartas seriam devido à rutina adicionada à dieta, foi realizada a extração dos flavonóides da proteína de soja (ingrediente da dieta) utilizada para o desenvolvimento dos experimentos. A extração da proteína de soja foi realizada em metanol 80% (MeOH) na proporção de 10 vezes o volume do solvente para a massa da amostra, sob agitação a 100 r.p.m. por aproximadamente 18h. O extrato obtido foi filtrado em funil de Buchner, com papel de filtração rápida quantitativa Framex, sendo o processo de extração realizado três vezes para garantir completa extração dos flavonóides. Alíquotas de 10µL do extrato foram injetadas em HPLC (marca Shimadzu, Prominence com controlador CBM-20A; detetor SPD-20A; degaseificador DGU 20A5; Bomba LC-20AT; auto sampler SIL-20A e forno CTO 20A). As análises foram realizadas em coluna de fase reversa C18 (250 mm de comprimento

e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5 micra). A fase móvel foi composta de 2% de ácido acético (HOAc) (A) e uma mistura de metanol, ácido acético e água (MeOH:HOAc:H<sub>2</sub>O; 18:1:1) (B). O sistema inicial do gradiente linear foi 75% de A e 25% de B, atingindo aos 40 min., a situação inversa, ou seja, 25% de B e 75% de A. Aos 45 minutos, voltou à situação inicial, aí permanecendo por 5 min, antes da próxima injeção. O fluxo do solvente foi de 1mL/ min. e a absorção de UV foi medida a 260nm.

### **2.2.3. Condução do experimento**

Lagartas no final do 2<sup>o</sup> ínstar, criadas desde a eclosão em suas respectivas dietas, foram individualizadas para a realização dos bioensaios em copos de acrílico pequenos com tampas de papelão esterilizadas (Fig. 1). Os copos foram colocados em bandejas com tampa para evitar a perda de umidade. Os tratamentos foram mantidos em B.O.D., sob condições controladas de temperatura, umidade e fotofase ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  UR e 12h, respectivamente). As lagartas foram avaliadas diariamente observando-se a mortalidade e o tempo de desenvolvimento de cada estágio. Rutina foi dissolvida em água destilada e misturada à dieta artificial (HOFFMANN-CAMPO et al. 1985), em temperatura inferior a  $50^{\circ}\text{C}$ , para evitar sua inativação. Por ocasião da individualização, foi avaliado o peso inicial (fresco e seco). Além disso, avaliou-se, também, peso de pupa (seco), o peso seco do alimento não consumido e das fezes produzidas pelo inseto.

Para a obtenção do peso seco inicial das lagartas, foram retiradas cinco lagartas por tratamento que, após serem pesadas, foram mortas, secas em estufa por 72h ( $60^{\circ}\text{C}$ ) e novamente pesadas. O fator de correção médio, calculado pela divisão entre os pesos seco e fresco das lagartas, foi multiplicado pelo peso fresco de cada lagarta do experimento, obtendo-se, assim, o seu peso seco inicial. O mesmo procedimento foi adotado para o cálculo do peso seco da dieta oferecida aos insetos; após a pesagem, as dietas contidas em cinco copos por tratamento foram secas (72h,  $60^{\circ}\text{C}$ ), e novamente pesadas para a obtenção do fator de correção peso fresco/peso seco. Após consumo, a dieta remanescente no copo foi separada das fezes, sendo ambas secas

em estufa, nas condições descritas anteriormente, e pesadas. Para a obtenção da quantidade de dieta consumida pelas lagartas subtraiu-se do peso seco (peso fresco corrigido pelo fator de correção) da dieta de cada copo, o peso seco de dieta restante nos copos. Após 48h da transformação em pupa, as pupas foram mantidas em estufa por 72h a 60°C, para obtenção do peso seco.



Figura 1. Bandejas com copos contendo dieta para *Anticarsia gemmatalis* para a realização de bioensaios com dieta com rutina e caseína

#### 2.2.4. Análise estatística

Nos três experimentos o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos, especificados anteriormente, sendo 65 repetições para o primeiro e o terceiro e 60 repetições para o segundo. As variáveis consideradas neste trabalho foram: mortalidade de lagartas nos cinco ínstares, mortalidade total de lagartas, peso inicial de lagartas (fresco e seco, em mg), peso de pupa (seco, em mg), tempo de alimentação (dias), dieta consumida (mg) e peso de fezes (mg).

A mortalidade foi comparada pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), conforme BANZATTO & KRONKA (1992), ao nível de 5% de probabilidade. As demais variáveis foram analisadas considerando-se três etapas. Na primeira, realizaram-se os testes

estatísticos que verificaram se todos os pressupostos requeridos pela análise de variância (ANOVA) foram atendidos. Em seguida, realizaram-se as análises de variâncias com testes de médias de Tukey e Kramer para tratamentos, ao nível de 5% de probabilidade e, na última etapa, foram realizadas as análises de covariância (ANCOVA), para avaliar o efeito das covariáveis sobre as variáveis de resposta. Para as análises estatísticas deste trabalho foi utilizado o pacote estatístico SAS- Statistical Analysis System (SAS Institute 1996).

A ANCOVA, foi utilizada para estimar o crescimento, consumo alimentar, eficiência na assimilação e conversão dos alimentos ingeridos e digeridos em biomassa, além do ganho de peso, conforme proposto por RAUBENHEIMER & SIMPSON (1992). Todas as análises de covariância foram realizadas utilizando-se os pesos secos.

O crescimento e o consumo para os diferentes tratamentos foram obtidos pelo ajuste, respectivamente, do peso de pupa e quantidade de dieta consumida pela covariável tempo de alimentação. O ganho de peso foi estimado através do ajuste de peso de pupa pela covariável peso inicial. O peso de pupa, nos diferentes tratamentos, foi ajustado pela quantidade de dieta consumida e digerida (quantidade de dieta consumida menos a quantidade de fezes produzida pelas lagartas) para determinar a eficiência de conversão dos alimentos ingeridos e digeridos, respectivamente, em biomassa. A assimilação dos alimentos foi obtida através da correção da quantidade de fezes produzida pela covariável quantidade de dieta consumida.

Após a realização da ANCOVA, quando a interação entre a covariável e o tratamento foi significativo, considerou-se o efeito dos tratamentos ajustados pela covariável. Entretanto, quando a interação (covariável x tratamento) não foi significativa, utilizou-se o modelo de linhas paralelas, considerando-se somente o efeito dos tratamentos.

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1. Experimento 1**

### 2.3.1.1. Efeito de diferentes concentrações de caseína e 0,65% de rutina adicionados a dieta artificial sobre a biologia e fisiologia de *A. gemmatalis*

O teste de  $\chi^2$  (5;  $p > 0,05$ ) indica que as diferenças na porcentagem de mortalidade foram em função dos tratamentos. A maior mortalidade ocorreu quando as lagartas foram alimentadas com dieta artificial contendo 7g de caseína + 0,65% de rutina, seguida pelas das lagartas alimentadas de dieta sem caseína + 0,65% de rutina (Tabela 1), no 5º e 6º ínstars e 3º e 6º, respectivamente.

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade de *A. gemmatalis* alimentadas em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% de rutina

Tratamento	Ínstar					Total
	2º /3º	3º	4º	5º	6º	
14g C	0,00	0,00	1,54	0,00	0,00	1,54
14g C+R	0,00	1,54	1,54	4,61	3,08	10,77
7g C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7g C+R	1,54	4,25	9,10	10,64	12,76	38,29
SC	0,00	1,54	0,00	0,00	0,00	1,54
SC+R	0,00	6,15	1,54	4,61	13,85	26,15
$\chi^2$	0,87 <sup>ns</sup>	13,55 <sup>***</sup>	17,28 <sup>***</sup>	17,41 <sup>***</sup>	33,46 <sup>***</sup>	51,86 <sup>***</sup>

ns- não significativo, \*\*\*  $P < 0,001 - \chi^2_{(5; 0,05)}$   
C (caseína); R (rutina); SC (sem caseína)

Através da ANOVA, observou-se efeito significativo dos tratamentos nas variáveis peso inicial das lagartas (final do 2º ínstar), peso de pupa, quantidade de dieta consumida e peso de fezes e tempo de alimentação (Tabela 2).

O peso inicial das lagartas foi influenciado negativamente pelas dietas com adição de rutina e pela falta de caseína (Tabela 2). Os tratamentos SC+R e 7g+R proporcionaram os menores pesos iniciais, enquanto lagartas alimentadas em dietas sem rutina (14g e 7g) apresentaram pesos mais elevados; as lagartas das dietas SC e 14g + R tiveram pesos iniciais semelhantes e, intermediários, se os compararmos com os demais tratamentos. Apesar disso, no tratamento cujas lagartas consumiram a dieta SC, o seu peso de pupa não diferiu do das lagartas alimentadas em DN e dieta com 7g de caseína. Os menores pesos de pupa e maiores tempos de alimentação foram observados quando as lagartas comeram dietas com rutina (SC+R, 7g+R e 14g+R). Enquanto, o maior consumo foi observado nas lagartas criadas nas dietas contendo

caseína (7g e 14g), mas sem a adição de rutina, quando comparada com os demais tratamentos. Em dieta SC, observou-se a maior quantidade de fezes.

Tabela 2. Peso seco inicial de lagartas (final do 2º ínstar) (mg), peso seco de pupa (mg), dieta consumida (mg), peso seco de fezes (mg), tempo de alimentação (dias) (Média ± EP) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% de rutina

Tratamento	Peso seco inicial (mg)	Peso seco de Pupa (mg)	Dieta consumida (mg)	Peso de Fezes (mg)	Tempo de Alimentação (dias)
14g	0,69 ± 0,01 a	75,37 ± 3,33 a	216,04 ± 7,83 ab	128,75 ± 4,43 ab	9,89 ± 0,22 c
14g C+R	0,45 ± 0,01 b	42,36 ± 3,33 b	177,07 ± 7,83 c	109,22 ± 4,43 c	12,71 ± 0,22 b
7g	0,70 ± 0,001a	75,24 ± 3,22 a	221,69 ± 7,56 a	123,98 ± 4,28 abc	9,58 ± 0,21 c
7g C+R	0,34 ± 0,01 c	39,05 ± 4,21 b	167,68 ± 9,90 c	111,82 ± 5,60 bc	14,03 ± 0,28 a
SC	0,49 ± 0,001b	67,21 ± 3,19 a	187,85 ± 7,50bc	133,42 ± 4,24 a	9,84 ± 0,21 c
SC+R	0,32 ± 0,01c	42,00 ± 3,84 b	154,96 ± 9,04 c	111,33 ± 5,11 bc	14,02 ± 0,25 a
Valor de F	239,71***	24,64***	10,30***	5,09***	82,31***

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey e Kramer, ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05).

\*\*\* P< 0,001

C (caseína); R (rutina); SC (sem caseína)

### 2.3.1.2. Ganho de peso, crescimento, consumo alimentar, eficiência na conversão dos alimentos ingeridos e digeridos em biomassa e assimilação dos alimentos

A ANCOVA indicou efeito interativo entre os tratamentos e as covariáveis tempo de alimentação (Tabela 3c), dieta consumida (Tabela 3e), alimento digerido (Tabela 3f) nas suas relações com o peso de pupa. Também ocorreu interação entre os tratamentos e a covariável dieta consumida (Tabela 3e) na sua relação com o peso de fezes. Não ocorreu efeito interativo entre os tratamentos e a covariáveis peso inicial na sua relação com o peso de pupa (Tabela 3a), nem do tempo de alimentação, na sua relação com a dieta consumida (Tabela 3c). Consequentemente, essas relações podem ser representadas pelo modelo de linhas paralelas (Fig. 2 e 4).



Tabela 3. Análise de covariância (ANCOVA) para verificar o efeito dos diferentes tratamentos no ajuste de peso de pupa pela covariável peso inicial (a, b), peso de pupa pelas covariáveis tempo de alimentação e consumo (c, d, e), consumo pela covariável tempo de alimentação (c, d), peso de fezes pela covariável consumo (e), peso de pupa pela covariável alimento digerido (f) em *A. gemmatalis*

Variação	GL	Valor de F		
		Peso de pupa	Dieta consumida	Peso de fezes
(a) Peso inicial (covariável)	1	14**	-	-
Tratamento	5	0,52 <sup>NS</sup>	-	-
Peso inicial x Tratamento	5	0,70 <sup>NS</sup>	-	-
Resíduo	298	-	-	-
(b) Tratamento	5	4,85**	-	-
Peso inicial	1	14,07**	-	-
Resíduo	303	-	-	-
(c) Tempo de alimentação (covariável)	1	17,84***	8,43**	-
Tratamento	5	3,54**	0,61 <sup>NS</sup>	-
Tempo de alimentação x Tratamento	5	2,26*	0,71 <sup>NS</sup>	-
Resíduo	298	-	-	-
(d) Tratamento	5	-	3,12**	-
Tempo de alimentação	1	-	8,47**	-
Resíduo	303	-	-	-
(e) Dieta consumida (covariável)	1	91,04***	-	701,48***
Tratamento	5	1,45 <sup>NS</sup>	-	1,35 <sup>NS</sup>
Dieta consumida x Tratamento	5	4,75**	-	4,32**
Resíduo	298	-	-	-
(f) Alimento digerido (covariável)	1	0,71 <sup>NS</sup>	-	-
Tratamento	5	40,77***	-	-
Alimento digerido x Tratamento	5	4,32**	-	-
Resíduo	298	-	-	-

\*\*P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, ns- não significativo

O efeito principal dos tratamentos e da covariável, embora não-interativo, foi significativo, no ganho de peso (peso de pupa ajustado pelo peso inicial). As lagartas que se alimentaram de dieta com caseína (7g e 14g) e rutina ganharam menos peso

quando comparadas com as alimentadas com dieta sem caseína e rutina (gráfico inserido na Fig. 2).

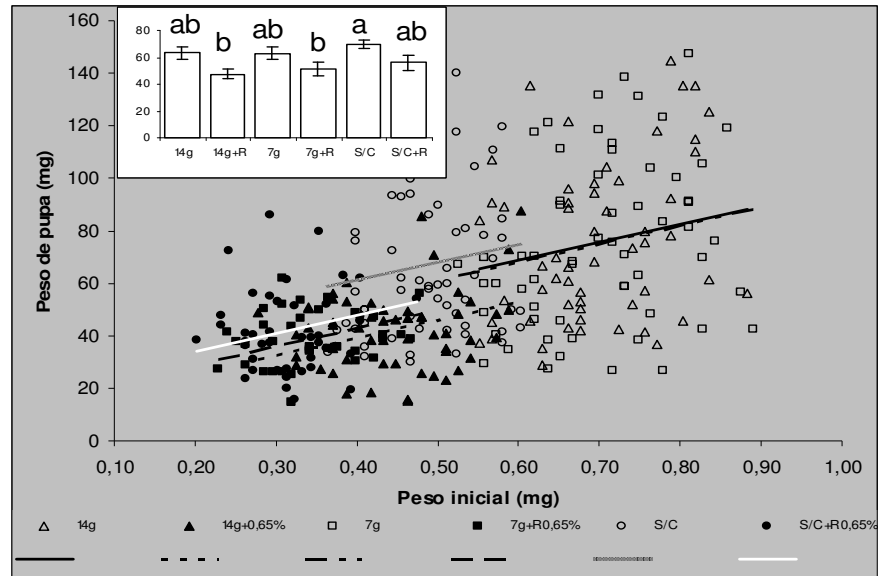


Figura. 2. Relação entre peso de pupa (mg) e peso inicial de lagartas (mg) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% de rutina. Gráfico inserido mostra a média de ANCOVA

A Figura 3 mostra que o alongamento no tempo de alimentação das lagartas (covariável) não proporcionou aumento no peso de pupas, considerando-se a tendência negativa (SC, 7g e 14g) ou estável (7g+R, SC+R e 14g+R) das retas que representam os dados obtidos corrigidos pela covariável.

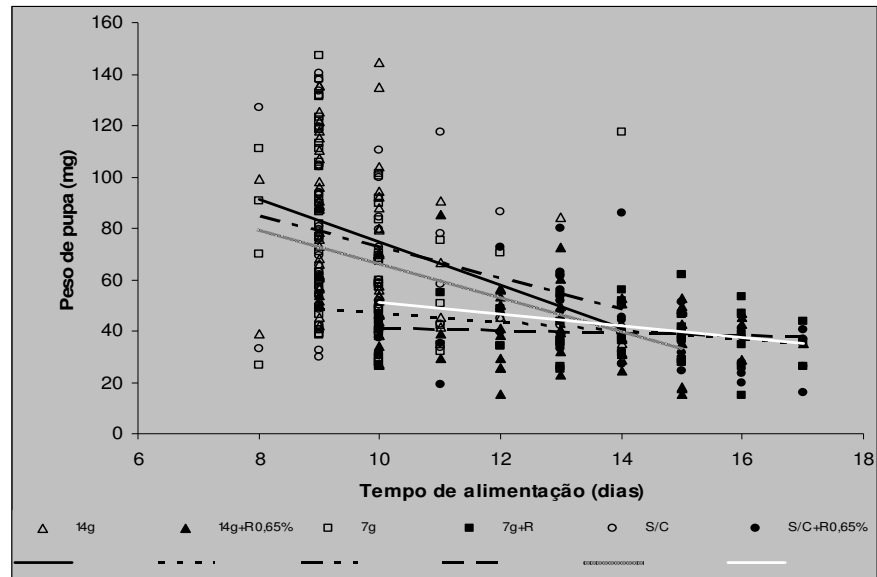


Figura 3. Relação entre peso de pupa (mg) e tempo de alimentação (dias) de *A. gemmatilis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% de rutina

Observou-se, também, uma relação negativa entre o consumo e o tempo de desenvolvimento dos insetos alimentados em todos os tipos de dietas (Fig. 4); as lagartas que prolongaram o seu tempo de alimentação não foram as que consumiram maior quantidade de dieta. A média dos quadrados mínimos (gráfico inserido na Fig. 4) indica que as lagartas alimentadas dieta SC (sem caseína e sem rutina) consumiram menor quantidade de alimento comparado com as alimentadas na dieta 7g, sem rutina.

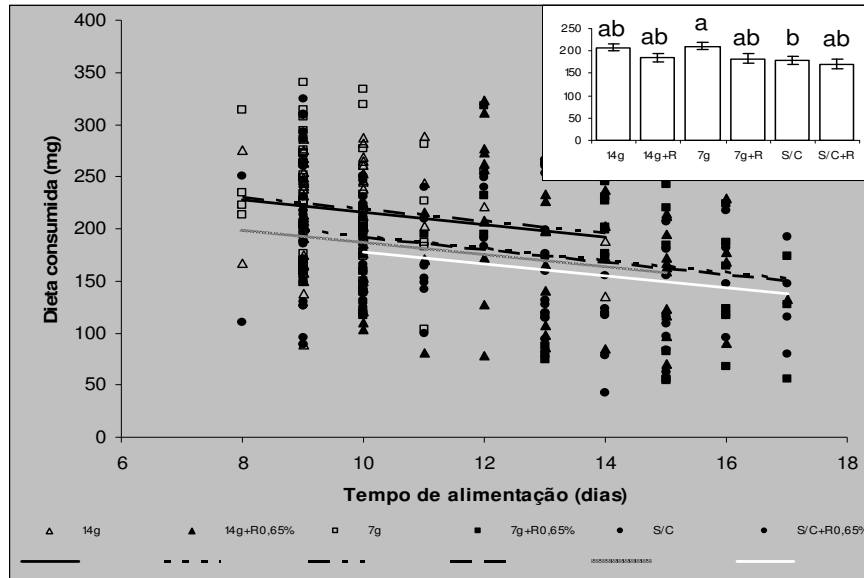


Figura 4. Relação entre dieta consumida (mg) e tempo de alimentação (dias) de *A. gemmatilis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% de rutina (conferir gráfico de médias)

Lagartas alimentadas nas dietas, com adição de com rutina, 7g+R, 14g+R e S/C+R, foram menos eficientes na conversão dos alimentos ingerido (peso de pupa ajustado pela covariável consumo) e digerido em biomassa [peso de pupas ajustado pelo covariável alimento digerido (consumo – fezes)], conforme, sugerido pelas menores inflexões nas retas observadas nestes tratamentos (Fig. 5 e 6). Nessas, o aumento de consumo não resultou em aumento no peso das pupas.

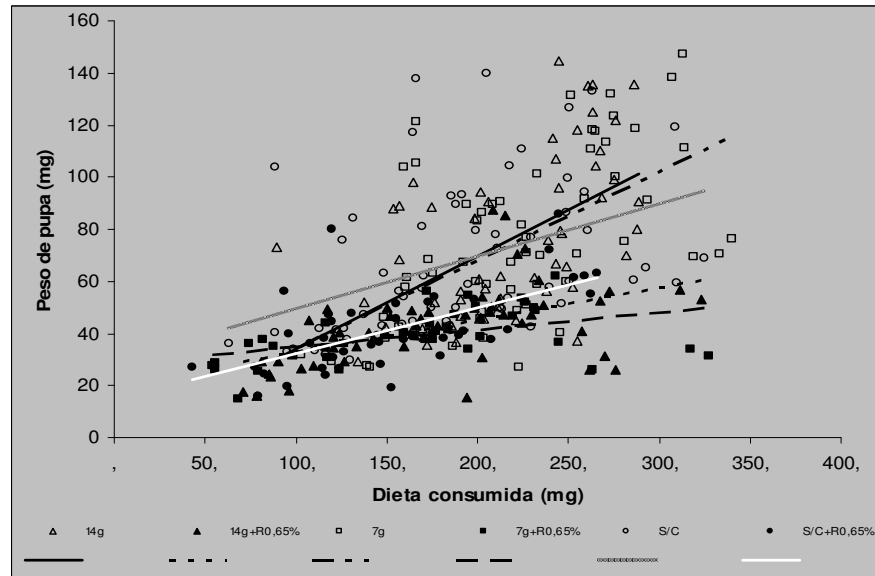


Figura 5. Relação entre peso de pupa (mg) e dieta consumida (mg) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% de rutina

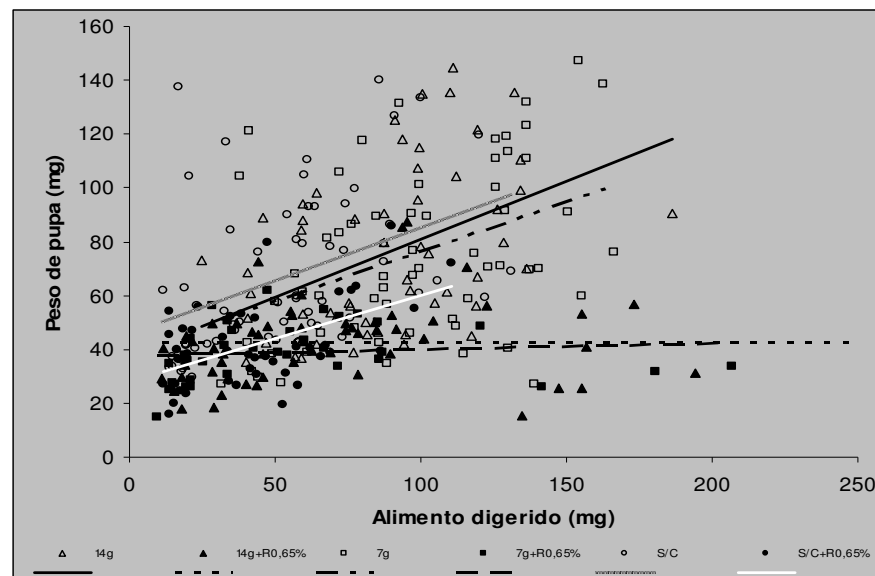


Figura 6. Relação entre peso de pupa (mg) e alimento digerido (mg) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% de rutina

Na assimilação dos alimentos (Fig. 7) observou-se que a produção de fezes foi dependente dos diferentes tratamentos, assim como, da quantidade de alimento

ingerido. Os dados indicam uma relação positiva entre as covariáveis, lagartas que consumiram mais, também produziram maior quantidade de fezes.

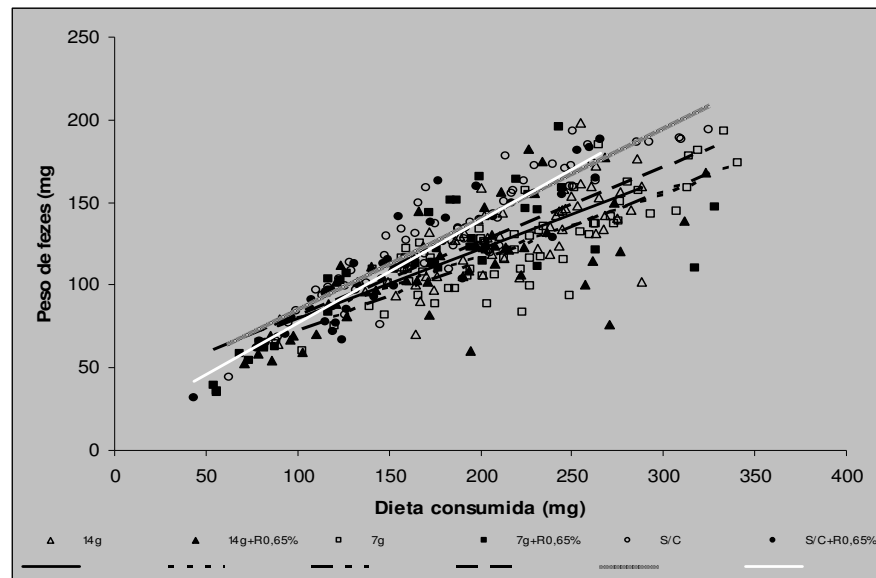


Figura 7. Relação entre peso de fezes (mg) e dieta consumida (mg) de *A. gemmatilis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% de rutina

## 2.3.2. Experimento 2

### 2.3.2.1. Efeito de diferentes concentrações de caseína e 1,30% de rutina adicionados a dieta artificial sobre a biologia e fisiologia de *A. gemmatilis*

Seguindo os dados obtidos no experimento anterior, a maior mortalidade ocorreu quando as lagartas foram alimentadas com dieta artificial contendo 7g de caseína com 1,30% de rutina, seguida pelas lagartas alimentadas de dieta SC+R, ou seja, sem caseína com 1,30% de rutina, e de dieta com 14g de caseína + 1,30% de rutina (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de mortalidade de *A. gemmatalis* alimentadas em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 1,30% de rutina

Tratamento	Ínstar					Total
	2 <sup>o</sup> /3 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	6 <sup>o</sup>	
14g C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14g C+R	1,66	5,00	26,66	16,66	0,00	49,98
7g C	0,00	0,00	0,00	1,66	0,00	1,66
7g C+R	6,66	16,66	33,33	8,33	0,00	64,98
SC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SC+R	0,00	8,33	26,66	18,33	1,66	53,32
$\chi^2$	15,68***	35,91***	139,88***	30,66***	5,75 <sup>ns</sup>	134,02***

ns- não significativo, \*\*\*  $P < 0,001 - \chi^2_{(5; 0,05)}$   
 C (caseína); R (rutina); SC (sem caseína)

Os tratamentos afetaram o tempo de alimentação das lagartas sendo mais rápido o desenvolvimento dos insetos alimentados com DN, sem rutina (14g de caseína), e mais lento nas lagartas que se alimentaram com dietas com rutina (7g+R, SC+R e 14g+R). A dieta SC com 1,30 % afetou negativamente o peso inicial das lagartas (Tabela 5). O maior peso inicial foi registrado para as lagartas alimentadas da dieta 14g+R. Entretanto, apesar dos insetos alimentados de dieta 14g+R terem apresentado o maior peso inicial, isso não refletiu no peso final; lagartas alimentadas nessa dieta e na SC+R, apresentaram menores pesos de pupa, quando comparadas com as alimentadas de dietas com caseína, mas sem rutina (7g e 14g). O maior consumo foi observado em insetos alimentados com DN (14g) e o menor naqueles alimentadas em dieta SC; não se observou diferença entre os demais tratamentos (14g+R; 7g; 7g+R, SC+R). A menor quantidade de fezes foi avaliada no tratamento SC, diferindo das dietas contendo caseína, mas sem adição de rutina (14g e 7g).

Tabela 5. Peso seco inicial de lagartas 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup> ínstar (mg), peso seco de pupa (mg), dieta consumida (mg), peso seco de fezes (mg), tempo de alimentação (dias) (Média ± EP) de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 1,30% de rutina

Tratamento	Peso seco inicial (mg)	Peso seco de Pupa (mg)	Dieta consumida (mg)	Peso de Fezes (mg)	Tempo de Alimentação (dias)
14g C	0,46 ± 0,01 b	53,12 ± 1,33 a	266,83 ± 6,43 a	131,42 ± 3,91 a	10,18 ± 0,27 c
14g C+R	0,59 ± 0,01 a	45,87 ± 1,82 b	197,25 ± 8,78 b	121,70 ± 5,35 ab	15,73 ± 0,37 b
7g	0,36 ± 0,01 c	53,35 ± 1,32 a	219,49 ± 6,37 b	131,76 ± 3,88 a	10,57 ± 0,27c
7g C+R	0,42 ± 0,02bc	47,42 ± 2,42 ab	164,71 ± 11,67bc	111,58 ± 7,11 ab	19,82 ± 0,49 a
SC	0,44 ± 0,01 b	48,71 ± 1,31 ab	140,37 ± 6,32 c	101,68 ± 3,85 b	10,72 ± 0,26 c
SC+R	0,34 ± 0,02 c	46,04 ± 1,99 b	184,93 ± 9,62 bc	115,68 ± 5,86 ab	19,12 ± 0,40 a
Valor de F	36,10***	4,63***	43,60***	8,48***	147,31***

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey e Kramer, ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05).

\*\*\* P< 0,001

C (caseína); R (rutina); SC (sem caseína)

### 2.3.2.2. Ganho de peso, crescimento, consumo alimentar, eficiência na conversão dos alimentos ingeridos e digeridos em biomassa e assimilação dos alimentos

A análise de covariância indicou não haver efeito interativo entre os tratamentos e as covariáveis peso inicial (Tabela 6a), tempo de alimentação (Tabela 6c) em suas relações com o peso de pupa. Também não ocorreu interação entre os tratamentos e a covariável dieta consumida (Tabela 6e), alimento digerido nas suas relações com o peso de pupa (Tabela 6g), nem das dietas (tratamentos) com tempo de alimentação (covariável) na sua relação com a dieta consumida (Tabela 6c). Assim sendo, efeito interativo foi observado apenas entre os tratamentos e a covariável dieta consumida no peso de fezes (Tabela 6e).



Tabela 6. Análise de covariância (ANCOVA) para verificar o efeito dos diferentes tratamentos no ajuste de peso de pupa pela covariável peso inicial (a, b), peso de pupa pelas covariáveis tempo de alimentação e consumo (c, d, e, f), consumo pela covariável tempo de alimentação (c, d), peso de fezes pela covariável consumo (e), peso de pupa pela covariável alimento digerido (g,h) em *A. gemmatalis*

Variação	GL	Valor de F		
		Peso de pupa	Consumo	Peso de fezes
(a) Peso inicial (covariável)	1	0,77 <sup>NS</sup>	-	-
Tratamento	5	0,71 <sup>NS</sup>	-	-
Peso inicial x Tratamento	5	0,54 <sup>NS</sup>	-	-
Resíduo	231	-	-	-
(b) Tratamento	5	4,74 <sup>**</sup>	-	-
Peso inicial	1	0,77 <sup>NS</sup>	-	-
Resíduo	236	-	-	-
(c) Tempo de alimentação (covariável)	1	0,07 <sup>NS</sup>	0,03 <sup>NS</sup>	-
Tratamento	5	0,17 <sup>NS</sup>	1,89 <sup>NS</sup>	-
Tempo de alimentação x Tratamento	5	0,37 <sup>NS</sup>	0,95 <sup>NS</sup>	-
Resíduo	231	-	-	-
(d) Tratamento	5	2,74 <sup>*</sup>	40,23 <sup>***</sup>	-
Tempo de alimentação	1	0,08 <sup>NS</sup>	0,03 <sup>NS</sup>	-
Resíduo	236	-	-	-
(e) Consumo (covariável)	1	97,27 <sup>***</sup>	-	290,82 <sup>***</sup>
Tratamento	5	0,74 <sup>NS</sup>	-	8,30 <sup>***</sup>
Consumo x Tratamento	5	0,64 <sup>NS</sup>	-	14,26 <sup>***</sup>
Resíduo	231	-	-	-
(f) Tratamento	5	6,76 <sup>***</sup>	-	-
Consumo	1	98,01 <sup>***</sup>	-	-
Resíduo	236	-	-	-
(g) Alimento digerido (covariável)	1	40,81 <sup>***</sup>	-	-
Tratamento	5	1,09 <sup>NS</sup>	-	-
Alimento digerido x Tratamento	5	0,98 <sup>NS</sup>	-	-
Resíduo	231	-	-	-
(h) Tratamento	5	3,96 <sup>**</sup>	-	-
Alimento digerido	1	40,83 <sup>***</sup>	-	-
Resíduo	236	-	-	-

\*P<0,01, \*\*\* P< 0,001, ns- não significativo

O consumo dos insetos foi afetado pelos tratamentos (Tabela 6c), sem interferência do tempo de alimentação (covariável). As lagartas alimentadas com DN consumiram mais alimento, seguido pelas alimentadas com a dieta 7g (Fig. 8). O menor consumo foi observado nas lagartas da dieta sem caseína. Ao analisar as linhas de tendência pode-se observar que as lagartas criadas em dietas contendo rutina

apresentaram um prolongamento no tempo de alimentação, porém sem aumentar o seu consumo.

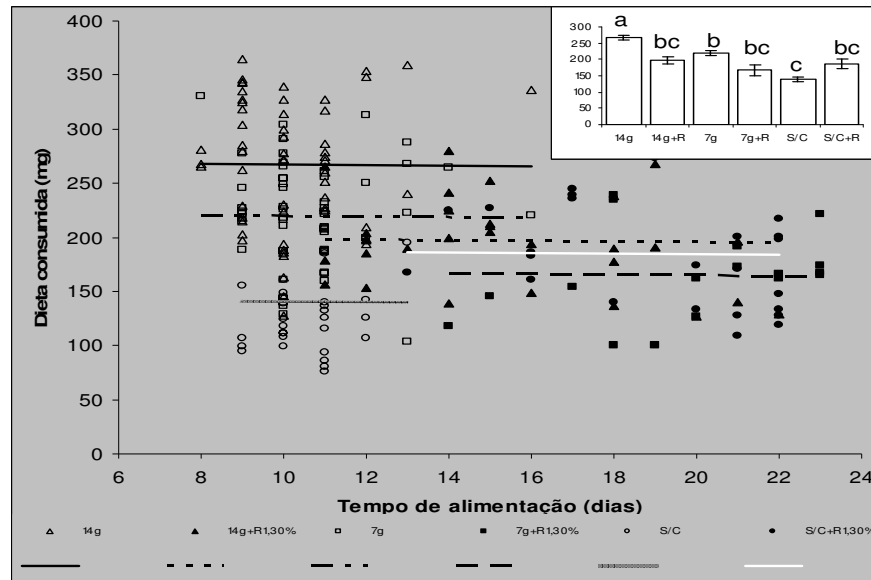


Figura 8. Relação entre dieta consumida (mg) e tempo de alimentação (dias) de *A. gemmatilis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 1,30% de rutina. Gráfico inserido mostra as médias de ANCOVA

A eficiência na conversão do alimento ingerido (peso de pupa X covariável dieta consumida) ou digerido (peso de pupa X covariável dieta digerida) seguiram uma relação positiva (Figs 9 e 10); maior o peso da pupa, maior a quantidade de dietas consumida ou digerida pelas lagartas, sendo aquelas alimentadas em dieta sem caseína mais eficientes na conversão dos alimentos ingeridos quando comparadas com as alimentadas com dieta normal sem (DN) e com rutina (14g + R). Enquanto os insetos alimentados com dieta SC ou 7g de caseína, mas sem rutina converteram mais os alimentos digerido em biomassa do que aqueles que comeram 14g + R.

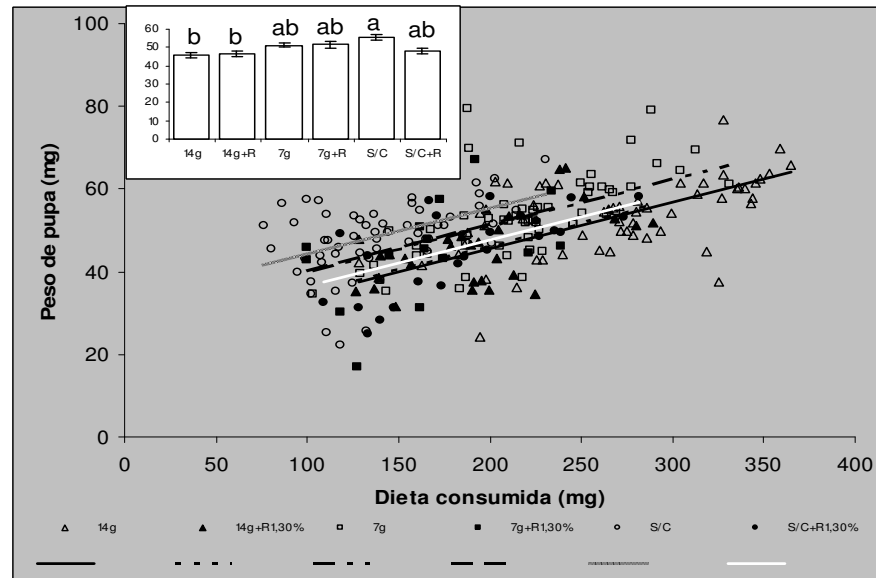


Figura 9. Relação entre peso de pupa (mg) e dieta consumida (mg) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 1,30% de rutina. Gráfico inserido mostra as médias de ANCOVA.

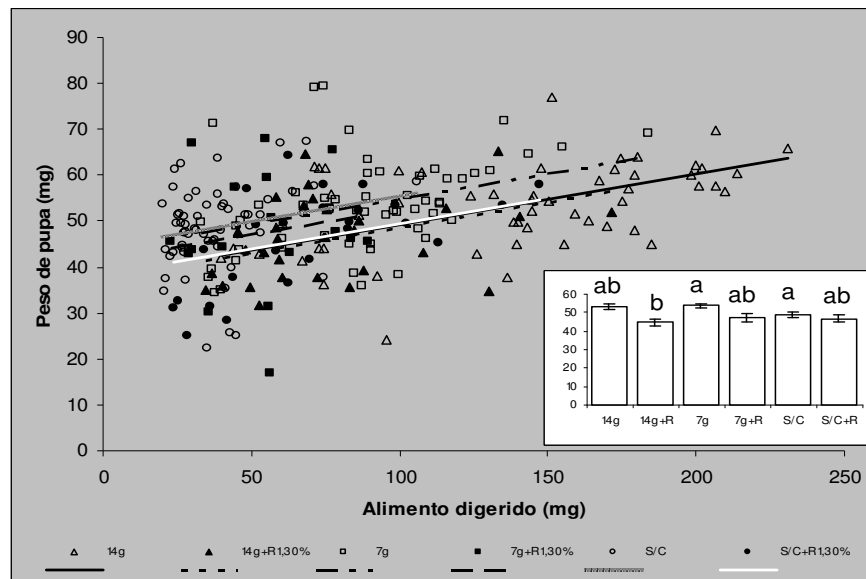


Figura 10. Relação entre peso de pupa (mg) e alimento digerido (mg) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 1,30% de rutina. Gráfico inserido mostra as médias de ANCOVA

A interação entre a covariável dieta consumida e o peso de fezes sugere que a produção de fezes dependeu do tratamento, mas também da quantidade de alimento

consumido (Fig. 11). As linhas de tendência dos dados indicam que a relação foi positiva, ou seja maior o consumo maior a produção de fezes em todos os tratamentos. Porém, a linha de tendência dos dados referentes aos insetos alimentados em DN (14g de caseína) apresentaram inflexão mais baixa, sugerindo uma maior assimilação dos alimentos, considerando-se que mesmo aumentando o consumo, as lagartas produziram quantidades relativamente menores de fezes, provavelmente retendo mais alimentos.

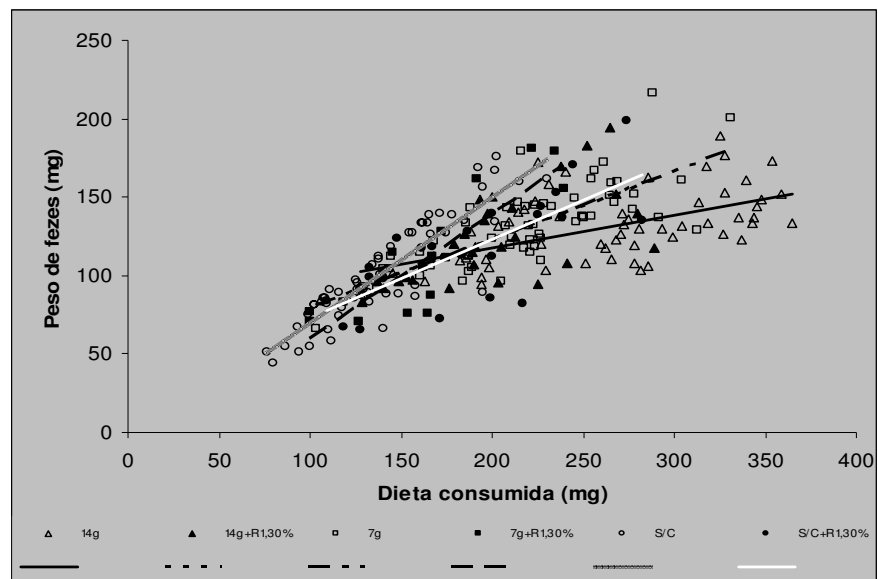


Figura 11. Relação entre peso de fezes (mg) e alimento digerido (mg) de *A. gemmatilis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 1,30% de rutina

### 2.3.3. Experimento 3

#### 2.3.3.1. Efeito de diferentes concentrações de caseína e 0,65% e 1,30% de rutina adicionados a dieta artificial sobre a biologia e fisiologia de *A. gemmatilis*

Lagartas alimentadas com dieta sem caseína com adição de 1,30% de rutina apresentaram a maior mortalidade seguida pelo tratamento DN + 1,30% de rutina. As maiores porcentagens de mortalidade ocorreram no 3º ínstar nesses dois tratamentos (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de mortalidade de *A. gemmatalis* alimentadas em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% e 1,30% de rutina

Tratamento	Ínstar					Total
	2 <sup>o</sup> /3 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	6 <sup>o</sup>	
14g C	0,00	1,54	0,00	0,00	0,00	1,54
14g C + R 0,65 %	0,00	15,38	3,08	0,00	0,00	18,46
14g C + R 1,30 %	15,38	26,15	0,00	1,54	0,00	43,07
SC	0,00	4,62	3,08	0,00	0,00	7,70
SC + R 0,65%	3,08	13,85	9,23	1,54	0,00	27,70
SC + R 1,30%	16,92	36,92	1,54	1,54	3,08	60,00
$\chi^2$	27,57***	41,87***	13,94***	2,52 <sup>ns</sup>	9,72 <sup>ns</sup>	81,60***

ns- não significativo, \*\*\* P < 0,001- $\chi^2$  (5; 0,05)  
C (caseína); R (rutina); SC (sem caseína)

Os menores pesos iniciais foram observados em lagartas alimentadas de SC + R1,30% e 14g+R1,30% (Tabela 8). No entanto, apenas no primeiro a lagarta se manteve com o menor peso de pupa, diferindo dos demais tratamentos; em ambas avaliações o peso das lagartas em dieta normal (14g) foi maior. Nesse tratamento, observou-se também maior consumo e menor tempo de alimentação, quando comparado com o demais tratamentos; lagartas alimentadas de dieta sem caseína apresentaram o menor consumo e menor peso de fezes. O maior tempo de alimentação foi observado em insetos alimentados com dieta SC + 1,30% de rutina (15,0 ± 0,55 dias).

Tabela 8. Peso seco inicial de lagartas 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup> ínstar (mg), peso seco de pupa (mg), dieta consumida (mg), peso seco de fezes (mg), tempo de alimentação (dias) (Média ± EP) de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% e 1,30% de rutina

Tratamento	Peso seco inicial (mg)	Peso seco de Pupa (mg)	Dieta consumida (mg)	Peso de Fezes (mg)	Tempo de Alimentação (dias)
DN (14g C)	0,59 ± 0,01 a	59,58 ± 0,88 a	274,33 ± 5,69 a	140,98 ± 4,11 a	9,05 ± 0,36 d
14g+R 0,65%	0,56 ± 0,01 ab	46,02 ± 0,10 c	206,74 ± 6,41 b	113,92 ± 4,63 bc	14,06 ± 0,40 ab
14g+R 1,30%	0,30 ± 0,01 d	42,64 ± 1,24 c	211,29 ± 7,98 b	131,25 ± 5,77ab	12,90 ± 0,50 bc
SC	0,51 ± 0,01bc	50,90 ± 0,91 b	175,33 ± 5,84 c	107,45 ± 4,22 c	11,46 ± 0,37 c
SC+R0,65%	0,48 ± 0,01 c	44,50 ± 1,11 c	184,55 ± 7,11bc	122,02 ± 5,14 bc	12,56 ± 0,45 bc
SC+R1,30%	0,28 ± 0,01 d	37,25 ± 1,36 d	187,27 ± 8,72 bc	124,53 ± 6,30 abc	15,04 ± 0,55 a
Valor de F	140,80***	54,65***	36,57***	7,74***	26,34***

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey e Kramer, ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05).

\*\*\* P < 0,001 - C (caseína); R (rutina); SC (sem caseína)

### 2.3.3.2. Ganho de peso, crescimento, consumo alimentar, eficiência na conversão dos alimentos ingeridos e digeridos em biomassa e assimilação dos alimentos

Através da ANCOVA, pode-se observar efeito interativo entre o tratamento e as covariáveis peso inicial e dieta consumida nas suas relações com o peso de pupa (Tabela 9a), e com peso de fezes (Tabela 9d), respectivamente.

Não houve efeito interativo de tratamento e covariável tempo de alimentação (Tabela 9b) na sua relação com a dieta consumida. Também não ocorreu interação entre tratamento e dieta consumida (covariável), na conversão do alimentos ingerido em biomassa avaliado pela relação consumo x peso de pupa (Tabela 9d), nem na conversão dos alimentos digeridos em biomassa (alimento digerido x peso de pupa, Tabela 9f). Da mesma forma, não houve efeito significativo das covariáveis, assumindo-se a validade dos dados obtidos pela ANOVA.

Tabela 9. Análise de covariância (ANCOVA) para verificar o efeito dos diferentes tratamentos no ajuste de peso de pupa pela covariável peso inicial (a), peso de pupa pelas covariáveis tempo de alimentação e consumo (b, c, , d, e), consumo pela covariável tempo de alimentação (b, c), peso de fezes pela covariável consumo (d, e), peso de pupa pela covariável alimento digerido (f, g) em *A. gemmatalis*

Variação	GL	Valor de F		
		Peso de pupa	Consumo	Peso de fezes
(a) Peso inicial (covariável)	1	10,58**	-	-
Tratamento	5	2,41*	-	-
Peso inicial x Tratamento	5	2,72*	-	-
Resíduo	251	-	-	-
(b) Tempo de alimentação (covariável)	1	0,01 <sup>NS</sup>	6,94**	-
Tratamento	5	5,01***	3,10**	-
Tempo de alimentação x Tratamento	5	2,14 <sup>NS</sup>	1,44 <sup>NS</sup>	-
Resíduo	251	-	-	-
(c) Tratamento	5	38,30***	27,33***	-
Tempo de alimentação	1	0,01 <sup>NS</sup>	6,88**	-
Resíduo	256	-	-	-
(d) Consumo (covariável)	1	11,22**	-	318,73***
Tratamento	5	0,71 <sup>NS</sup>	-	1,25 <sup>NS</sup>
Consumo x Tratamento	5	1,84 <sup>NS</sup>	-	2,98*
Resíduo	251	-	-	-
(e) Tratamento	5	37,59***	-	-
Consumo	1	11,04**	-	-
Resíduo	256	-	-	-
(f) Alimento digerido (covariável)	1	1,35 <sup>NS</sup>	-	-
Tratamento	5	2,99*	-	-
Alimento digerido x Tratamento	5	1,58 <sup>NS</sup>	-	-
Resíduo	251	-	-	-
(g) Tratamento	5	35,97***	-	-
Alimento digerido	1	1,34 <sup>NS</sup>	-	-
Resíduo	256	-	-	-

\*\*P<0,01, \*\*\* P< 0,001, ns- não significativo

A figura 12 mostra, uma relação positiva entre os fatores (peso inicial e peso de pupa) das lagartas alimentadas com dieta normal (14g), SC+R 0,65 e SC, indicando aumento de peso proporcional do peso inicial. Entretanto, ao analisar as linhas de tendência para os demais tratamentos, pode-se observar uma relação negativa, sugerindo, neste caso, que as lagartas com maior peso inicial não apresentaram proporcional ganho de peso.

O consumo dos insetos (Fig. 13) apresentou-se negativamente relacionado com o tempo de desenvolvimento, ou seja, aqueles insetos que se alimentaram por um período maior (14g+R0,65%, 14g+R1,30% SC+R0,65% e SC+R1,30%) não mostraram aumento proporcional à quantidade de alimento consumido. A média da ANCOVA (gráfico inserido na Fig. 13) indica que insetos provenientes de dieta normal (14g), consumiram mais quando comparados aos demais tratamentos.

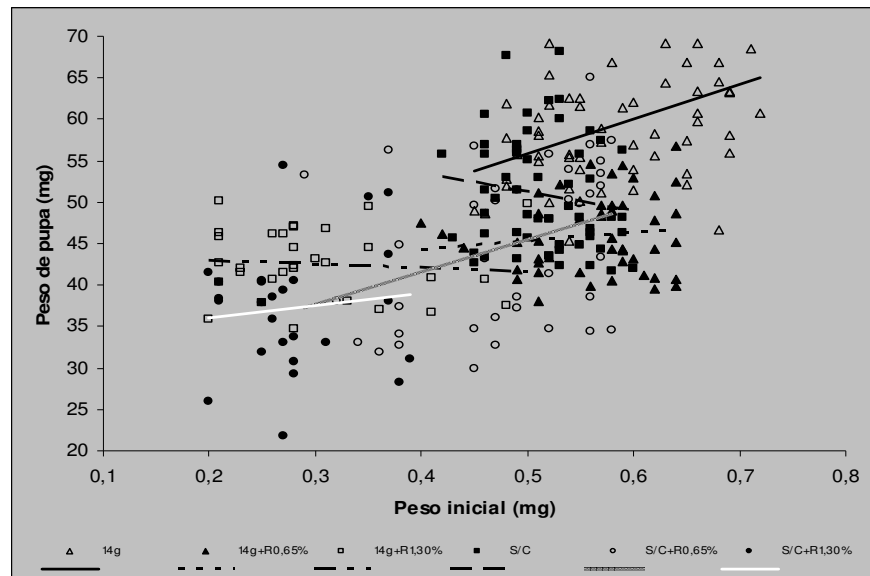


Figura 12. Relação entre peso de pupa (mg) e peso inicial (mg) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% e 1,30% de rutina

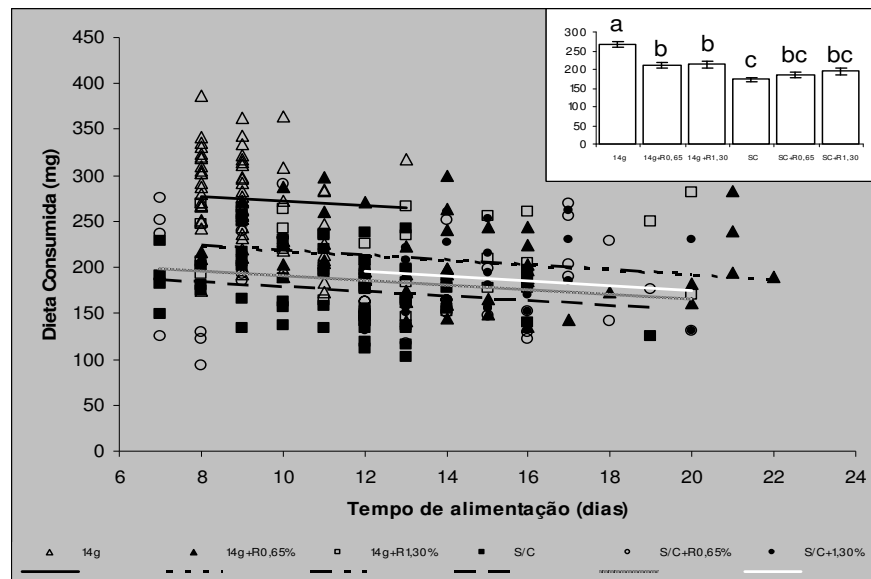


Figura 13. Relação entre dieta consumida (mg) e tempo de alimentação (dias) de *A. gemmatilis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% e 1,30% de rutina. Gráfico inserido mostra as médias de ANCOVA

Na avaliação da eficiência da conversão do alimento ingerido (Fig.14) observou-se uma relação positiva entre os fatores, quanto maior o consumo das lagartas, maior o peso das pupas. Insetos alimentados em dieta normal (14g) foram os mais eficientes na conversão dos alimentos ingeridos em biomassa, enquanto os menos eficientes foram àqueles criados em dieta SC+R1,30, seguido por 14g +R 1,30 (gráfico inserido na Fig. 14).



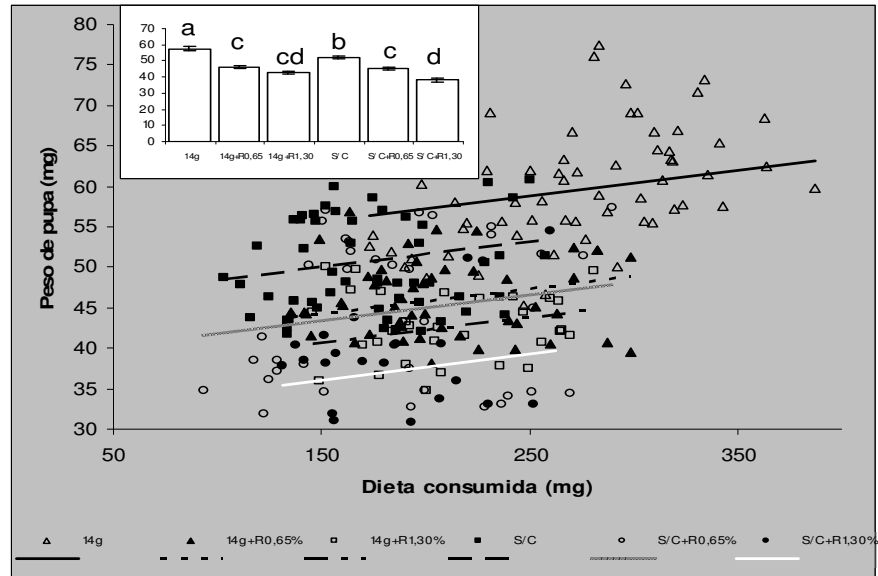


Figura 14. Relação entre peso de pupa (mg) e dieta consumida (mg) de *A. gemmatilis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% e 1,30% de rutina. Gráfico inserido mostra as médias de ANCOVA

A quantidade de dieta consumida (covariável) e os tratamentos afetaram significativamente o peso de fezes, sendo a quantidade de fezes produzidas pelos insetos foi dependente de um efeito interativo entre a covariável e os tratamentos. No gráfico de dispersão bicoordenado (Fig. 15) pode ser observado, novamente, uma relação positiva entre os fatores. Porém, a linha de tendência do gráfico indica que os insetos alimentados de dieta normal, retiveram mais alimentos (14g), produzindo menos fezes, mesmo quando aumentaram o consumo sendo, portanto, mais eficientes na assimilação dos alimentos, o que provavelmente explica a sua melhor desempenho de modo geral.

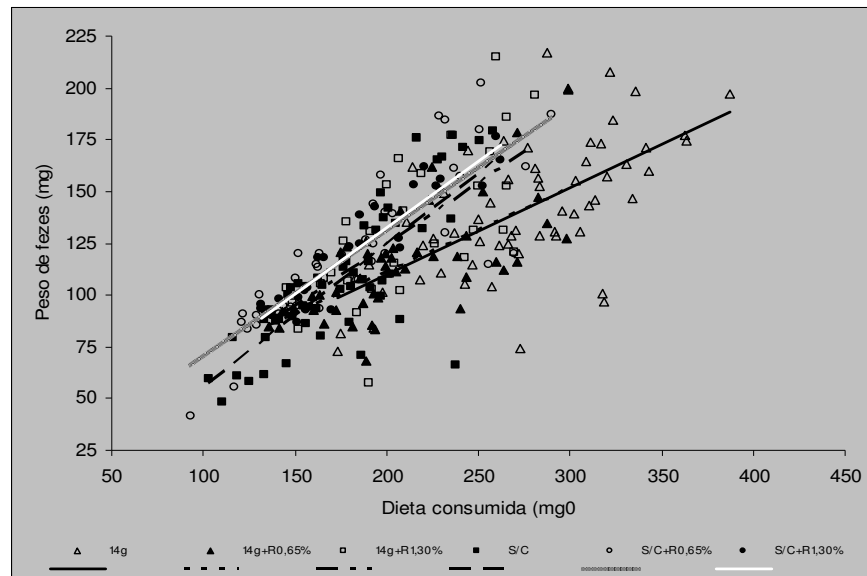


Figura 15. Relação entre peso de fezes (mg) e dieta consumida (mg) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% e 1,30% de rutina

## 2.4. DISCUSSÃO

Dentre todos os tratamentos estudados, as maiores percentagens de mortalidades foram observadas em insetos alimentados de dietas com rutina (7g+R0,65%, 7g+R1,30%) seguidos pelas dietas (SC+R0,65% e SC+R1,30%). Em geral, os insetos apresentaram mortalidade mais acentuada nos últimos ínstaes, quando ocorre o maior consumo alimentar e, conseqüentemente dos aleloquímicos presentes na dieta. Provavelmente, em função dos flavonóides afetarem os insetos desfolhadores principalmente por ocasião da mudança de ínstar (STAMP, 1994). GAZZONI *et al.* (1997), avaliando diversas doses dos flavonóides, rutina (quercitina 3-O-ramnosidio) e quercitina (aglicona) na biologia de *A. gemmatalis*, encontraram que a adição destas substâncias na dieta usualmente utilizada na criação da lagarta-da-soja, contendo 14g de caseína, causou altas mortalidades, principalmente nos últimos ínstaes, sugerindo que os flavonóides prejudicaram a atividade de enzimas e hormônios, bloqueando caminhos bioquímicos e reduzindo a assimilação de

substâncias essenciais ou a formação de reservas. Ainda, nesses tratamentos, pode se observar um prolongamento no tempo de alimentação. Este fenômeno também foi observado por PIUBELLI (2004); HOFFMANN-CAMPO *et al.* (2006) que, estudando aspectos biológicos de *A. gemmatalis* alimentadas com dietas acrescidas de rutina, observaram um prolongamento no tempo de alimentação. O prolongamento da fase larval dos insetos alimentados com rutina pode ocorrer devido ao fato destes tentarem atingir o peso ideal para chegar a fase de pupa e posterior reprodução (PIUBELLI 2004), conseqüentemente, isso os torna mais predispostos a fatores naturais de mortalidade, como a predação e infecção por doenças.

De modo geral, lagartas que se alimentaram de dieta com rutina em qualquer concentração consumiram menor quantidade de dieta. Com a retirada da caseína da dieta das lagartas, observou-se menor consumo nas dietas SC (sem caseína) e sem adição de rutina, quando comparadas a SC+R. BERNAYS *et al.* (1991), em testes com chance de escolha de *Schistocerca americana*, por dietas com baixa concentração de proteína e adição de rutina, observaram que os insetos se alimentaram por um período maior de dietas com baixa concentração de proteína somada a rutina. O menor consumo observado nos tratamentos sem caseína, provavelmente se deve ao fato desta proteína também atuar nas dietas como fagoestimulante. Este fenômeno foi observado por (BECK 1956, citado por PARRA 1979) em *Ostrinia nubilalis* quando caseína funcionou como atraente alimentar.

Em geral, o crescimento e o consumo foram negativamente influenciados pelas dietas com adição de rutina, sendo os tratamentos 7g+R e SC+R os mais afetados; os insetos apresentaram um prolongamento no tempo de alimentação o que não acarretou em aumento proporcional no peso de pupa e dieta consumida. Para todos os experimentos, a assimilação dos alimentos, foi dependente de um efeito interativo das covariáveis dieta consumida e peso de fezes, o que indica que após a remoção do efeito dieta consumida o peso de fezes continuou sendo afetado pelos diferentes tratamentos. Lagartas alimentadas de dieta com adição de rutina, principalmente, dos tratamentos SC+R1,30, em geral foram menos eficientes na conversão do alimento ingerido e digerido em biomassa.

Curto tempo de alimentação, pesos de lagartas e/ou pupas elevados e baixos índices de mortalidade, são parâmetros que indicam adequada taxa de crescimento para insetos (SOO HOO & FRAENKEL 1966). Portanto, os insetos que se alimentaram de dieta contendo rutina, em especial dietas 7g, e sem caseína, não apresentaram taxas adequadas de crescimento. Insetos alimentados de dietas com 14g de caseína (dieta normal) somada a rutina em qualquer concentração, foram menos afetados quando comparados aos insetos alimentados com os demais tratamentos com rutina. Porém, a proteína caseína, adicionada à dieta na concentração de 7g (metade da quantidade utilizada habitualmente), influenciou negativamente e/ou potencializou a ação da rutina. Assim sendo, observa-se que, apenas, ao se alimentar de dieta nutricionalmente desbalanceadas (com baixa concentração ou sem adição caseína), o efeito do flavonóide nos insetos torna-se mais profundo. Considerando-se os resultados obtidos até o momento, pode-se sugerir que utilizando-se a concentração adequada de proteína, não há efeito interativo da proteína com rutina.

## 2.5. REFERÊNCIAS

BANZATTO, D.A.; KRONKA S.N. **Experimentação Agrícola**. Jaboticabal, Funep. 1992, 247p.

BERNAYS, E. A.; RAUBENHEIMER D. Dietary Mixing in Grasshoppers: Changes in Acceptability of Different Plant Secondary Compounds Associated With Low Levels of Dietary Protein (Orthoptera: Acrididae). **J. Insect Behav.** v. 5, p. 545-556, 1991.

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

DUFFEY, S.S.; STOUT M.J. Antinutritive and Toxic Components of Plant Defense Against Insects. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** v. 32, p. 3 -37, 1996.

GAZZONI, D. L.; HULSMEYER A.; HOFFMANN- CAMPO C.B. Efeito de diferentes doses de rutina e quercitina na biologia de *Anticarsia gemmatalis*. **Pesqu. Agropecu. Bras.** v. 32, p. 673- 681, 1997.

GREENE, G.L.; LEPLA N.C.; DICKERSON W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **J. Econ. Entomol.** v. 69, p. 487-488, 1976.

HARBORNE, J.B. 1967. **Comparative biochemistry of the flavonoids**. London, Academic Press, 294p.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA E.B.; MOSCARDI F. **Criação massal da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis***. EMBRAPA-CNPSo, Documentos 10, 23p, 1985.

HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. 165 p. PHD. Dissertation, The University of Reading, Reading.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; HARBONE J.B.; MCAFFERY A.R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomol. Exp. Applic.** v. 98, p. 181-194, 2001.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; RAMOS NETO J.A.; OLIVEIRA M.C.; OLIVEIRA L.J. Detrimental effect of rutina on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesqu. Agropecu. Brás.** v. 41, p. 1453-1459, 2006.

PANIZZI, A.R. & J.R.P PARRA. **Ecologia Nutricional de Insetos e sua Aplicação no Manejo de Pragas**, Sao Paulo: Manole/CNPq, 1991. 359 p.

PARRA, J.R.P. **Biologia dos Insetos** ESALQ, Piracicaba, 1979.

PIUBELLI, G.C. **Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais**. 2004. 152p. Tese Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

RAUBENHEIMER, D.; SIMPSON S.J.. Analysis of covariance: an alternative to nutritional indices. **Entomol. Exp. Appl.** v. 62, p. 221-231, 1992.

SAS Institute. 1996. SAS Proprietary Software Release 6.12. SAS-STAT User's guide. Vol II. SAS Institute, Cary, N.C., 1686p.

SIMMONDS, M.S.J. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. **Phytochemistry** v. 56, p. 245-252, 2001.

SOO HOO, C.F.; FRAENKEL G.. The selection of food plants in a polyphagous insect, *Prodenia eridania* (Cramer). **J. Insect. Physiol.** v. 12, p. 693-709, 1966.

STAMP, N.E.; SKROBOLA C.M. Failure to avoid rutin diets results in altered food utilization and reduced growth rate of *Manduca sexta* larvae. **Entomol. Exp. Applic.** v. 68, p. 127-142, 1993.

STAMP, N.E. Simultaneous effects of potassium, rutin and temperature on performance of *Manduca sexta* caterpillars. **Entomol. Exp. Applic.** v. 72, p. 135-143, 1994.

### **CAPÍTULO 3 – Aspectos biológicos e fisiológicos de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentada com diferentes concentrações de rutina e genistina**

**RESUMO** – A isoflavona genistina (genisteína 7-*O*- $\beta$ -D-glicosídeo) e o flavonól rutina (quercitina 3-*O*-raminoglicosídeo) reconhecido por exercer efeito antibiótico e/ou antinutricional em diversos insetos mastigadores, foram identificados em diferentes genótipos com característica de resistência a insetos. Para avaliar a atividade biológica dessas substâncias sobre populações de *Anticarsia gemmatalis*, rutina 3,68 mg/g (R<sub>1</sub>) e 7,36 mg/g (R<sub>2</sub>), genistina 0,26 mg/g (G<sub>1</sub>) e 0,52 mg/g (G<sub>2</sub>) e a mistura das duas [3,68mg/g de R + 0,26mg/g de G (R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub>)] foram adicionadas à dieta artificial; dietas sem adição das substâncias utilizadas como testemunha. Lagartas ao final do 2º ínstar, criadas desde a eclosão em suas respectivas dietas, foram pesadas, individualizadas e observadas diariamente. O tempo total de alimentação foi afetado pelos diferentes tratamentos, sendo maior em R<sub>2</sub> e R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub>, que também apresentaram respectivamente, os menores pesos iniciais de lagartas e de pupas. Os maiores pesos secos iniciais de lagarta, de pupa e tempo de alimentação mais curto foram observados nas lagartas alimentadas com dietas controle, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, o que indica que isoladamente a genistina não apresentou acentuado efeito antinutricional aos insetos. Na mistura R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> observou-se peso inicial das lagartas, peso de pupa e de fezes, similares ao das lagartas alimentadas em R<sub>2</sub>; estes tratamentos também proporcionaram o menor crescimento, menor eficiência na conversão do alimento ingerido e digerido em biomassa e na assimilação dos alimentos. Os resultados obtidos sugerem um efeito aditivo entre as menores concentrações de rutina e genistina sobre a biologia de *A. gemmatalis*.

**Palavras-chave:** parâmetros biológicos, lagarta-da-soja, eficiência nutricional.



### 3.1. INTRODUÇÃO

Os flavonóides são metabólitos secundários derivados de fenilpropanóides extensamente distribuídos no reino vegetal. Essas substâncias estão relacionadas à proteção de plantas contra insetos, patógenos e raios ultravioletas, bem como na determinação das cores de flores e atração de insetos polinizadores (GRAHAM 1991). De modo geral, os flavonóides possuem uma mesma estrutura básica, composta de dois anéis aromáticos, seis átomos de carbono (anéis A e B) interconectados por um anel heterocíclico (anel C) incluindo três átomos de carbono (MARKHAM 1989). Os anéis aromáticos A e C são conjugados e o anel B ligado ao C por uma ligação simples. Conforme as alterações estruturais, os flavonóides podem ser divididos em diferentes classes, como flavonas, flavonóis, antocianina, isoflavonóides, flavanonas (MARKHAM 1989).

Pesquisas para determinar como os flavonóides podem conferir resistência às plantas contra insetos têm se concentrado nos efeitos antinutricionais destes compostos em pragas de importância agrícola (HARBORNE 1993). Em soja, flavonóides foram identificados em diversas partes da planta (HOFFMANN-CAMPO 1995). Um deles, rutina, adicionado à dieta artificial de *A. gemmatalis*, prolongou o ciclo biológico do inseto e causou maior mortalidade (GAZZONI et al. 1997; HOFFMANN-CAMPO et al. 2006; PIUBELLI et al. 2006). Essa substância também pode afetar outros lepidópteros. STAMP & SKROBOLA (1993) estudando larvas de *Manduca sexta* alimentadas de dieta contendo rutina, observaram que esta teve impacto negativo em seu crescimento. HOFFMANN-CAMPO et al. (2001) constataram que, ao acrescentar 2% de rutina à dieta de *Trichoplusia ni*, a sobrevivência, comportamento e a fisiologia do inseto foram negativamente afetados.

As isoflavonas são uma subclasse distinta de isoflavonóides, e possuem uma distribuição limitada no reino vegetal, sendo restritos principalmente à família Leguminosae (DEWICK, 1994). Demonstram uma grande extensão de propriedades biológicas, mas provavelmente as mais importantes são atividades estrogênicas,

antifúngicas e bactericida, que as isoflavonas, principalmente as fitoalexinas apresentam, além dos rotenóides com atividade inseticida (WILLIAMS & HARBORNE, 1989). Porém, pouco se sabe sobre seus efeitos na preferência alimentar e na biologia de insetos, alguns estudos relatam o efeito dessas substâncias sobre insetos pragas. LANE et al (1987), pesquisando isoflavonoides presentes em extratos de *Lupinus angustifolius*, constataram que estes estão ligados a resistência da planta a insetos e fungos. BURDEN and NORRIS (1992) observaram que, dependendo da concentração utilizada, o isoflavonóide coumestrol pode atuar como deterrente alimentar ao besouro mexicano *Epilachna varivestis*. Ainda, SIMMONDS & STEVENSON (2001), estudando o efeito dos isoflavonóides judaicina 7-O-glicosídeo, judaicina, mamquinaina e 2-methoxyjudaicina isolados de *Cicer arietinum*, *Cicer bijugum* e *Cicer pinnatifidum*, sobre *Helicoverpa armigera*, observaram que todos os compostos testados afetaram negativamente o inseto. PIUBELLI et al. (2003) estudando a resposta de genótipos de soja à injúria de *Nezara viridula* observaram que PI 227687, IAC-100 e PI 274454, que são genótipos com característica de resistência a insetos, e 'BR-16' (suscetível a insetos) aumentaram a concentração de genistina após serem danificados, sendo na sequência menos preferidos pelos percevejos comparando-se com as vagens controle. O acúmulo dos isoflavonóides daidzina e genistina também foram observados em raízes de soja após a inoculação com *Meloidogyne incognita* (CARPENTIERI-PÍPOLO et al. 2005). A presença das substâncias rutina e genistina em folhas de genótipos de soja resistentes a insetos foi constatada por HOFFMANN-CAMPO (1995); HOFFMANN-CAMPO et al. (2001); PIUBELLI et al. (2005).

Considerando a presença de genistina aliado ao flavonóide rutina nas folhas da soja resistente a insetos, PI 227687, e o fato de extratos foliares deste genótipo terem afetado o desenvolvimento de *T. ni* (HOFFMANN-CAMPO et al. 2001). O papel de rutina na resistência da soja a desfolhadores já está relativamente esclarecido (HOFFMANN-CAMPO 1995; HOFFMANN-CAMPO et al. 2001; PIUBELLI et al. 2005), porém o de genistina permanece a ser desvendado. Ainda, HOFFMANN-CAMPO et al. (2001, 2006) sugerem que a resistência do genótipo PI 227687 a desfolhadores pode estar relacionada a um efeito sinérgico ou aditivo dos compostos rutina e genistina; os

estudos realizados com rutina não explicam todo o potencial de defesa da PI 227687 (HOFFMANN-CAMPO et al. 2006; PIUBELLI et al 2005). Assim, este estudo teve como objetivo testar a hipótese sugerida por aqueles autores através da avaliação do efeito dos compostos rutina e genistina, puros de forma isolada e sua interação, na biologia de *A. gemmatalis*.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os bioensaios foram realizados nos laboratórios de Interação Inseto-Planta e Fitoquímica, da Embrapa Soja, Londrina-PR, no ano de 2007. A dieta artificial de GREENE et al. (1976), modificada por HOFFMANN-CAMPO et al. (1985) foram oferecidas às lagartas provenientes do laboratório de criação de insetos da Embrapa Soja. A rutina utilizada nos experimentos foi da marca Sigma. A quantidade de rutina e genistina utilizada no experimento foi baseada respectivamente na concentração encontrada nos genótipos PI 227687 e PI 274454 por PIUBELLI et al. (2005). A genistina foi obtida a partir de um concentrado de isoflavonas (Novasoy, composto por genistina, daidzina e glicitina) cedido pela Archer Daniels Midland Co (ADM), cuja concentração inicial de isoflavonas era de 70%.

### **3.2.1. Processos para obtenção de genistina**

**3.2.1.1. Precipitação ou Cristalização:** Para a cristalização, 20g de concentrado de isoflavonas (Novasoy) foi solubilizado em 1000ml de MEOH e aquecido sob agitação até 50°C, quando adicionou-se 100ml de H<sub>2</sub>O destilada. Após esfriar, na temperatura ambiente, a solução foi colocada na capela em repouso até a precipitação dos cristais de genistina e filtrado. O líquido resultante foi mantido em Becker semiaberto por aproximadamente 12h e, novamente, filtrado (Figura 1).

**3.2.1.2 Recristalização:** A pureza dos precipitados foi monitorada através da análise em HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) e o precipitado com maior teor de genistina solubilizado em MEOH, até a obtenção de uma solução clara e transparente. Esta solução foi aquecida sob agitação até atingir 50°C e adicionado 10% de H<sub>2</sub>O destilada. Este processo foi repetido até que se obteve o teor de pureza de genistina desejado, que neste trabalho foi de 95,8% (Figura 2).

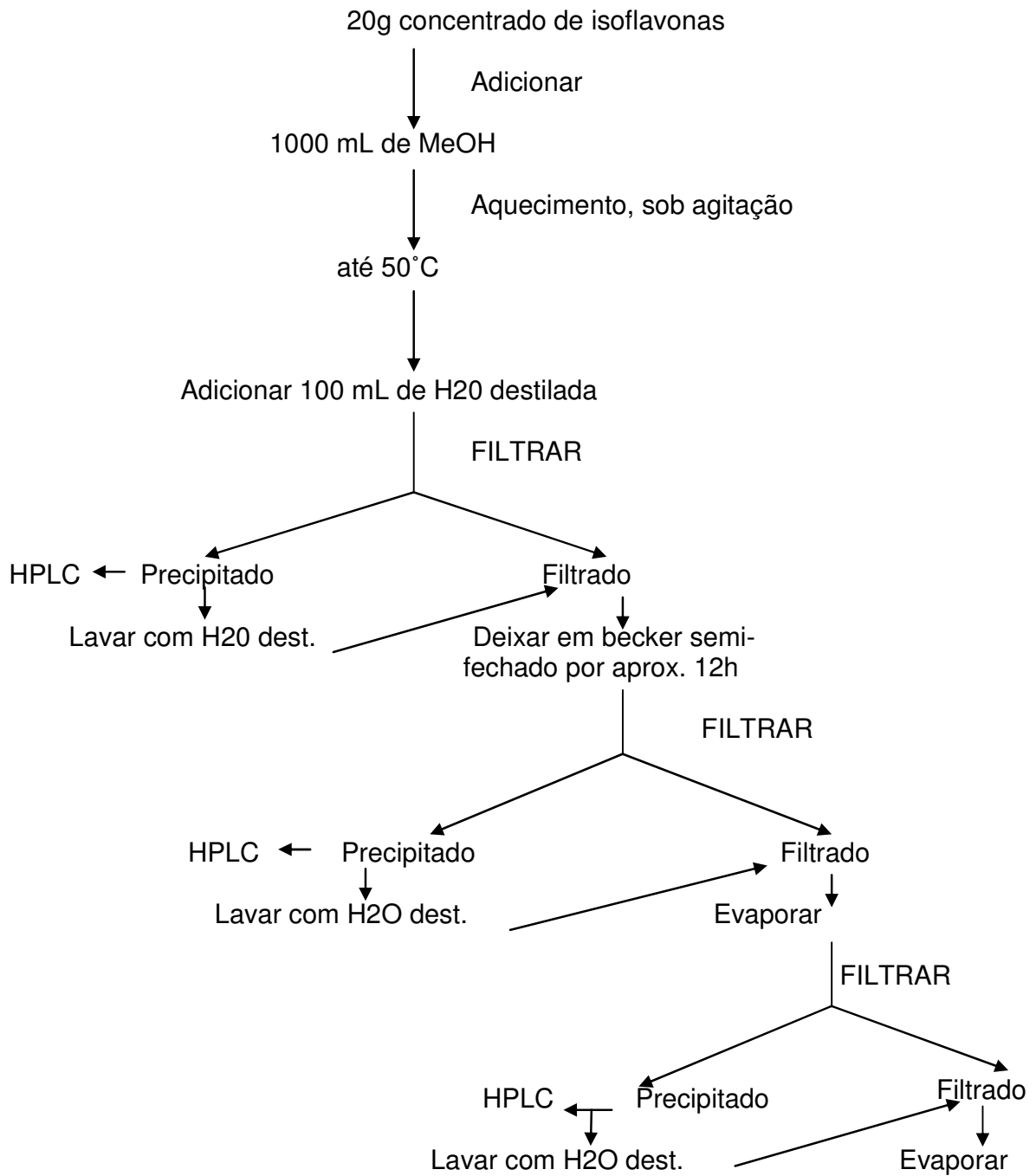


Figura 1. Processo de precipitação para obtenção da genistina

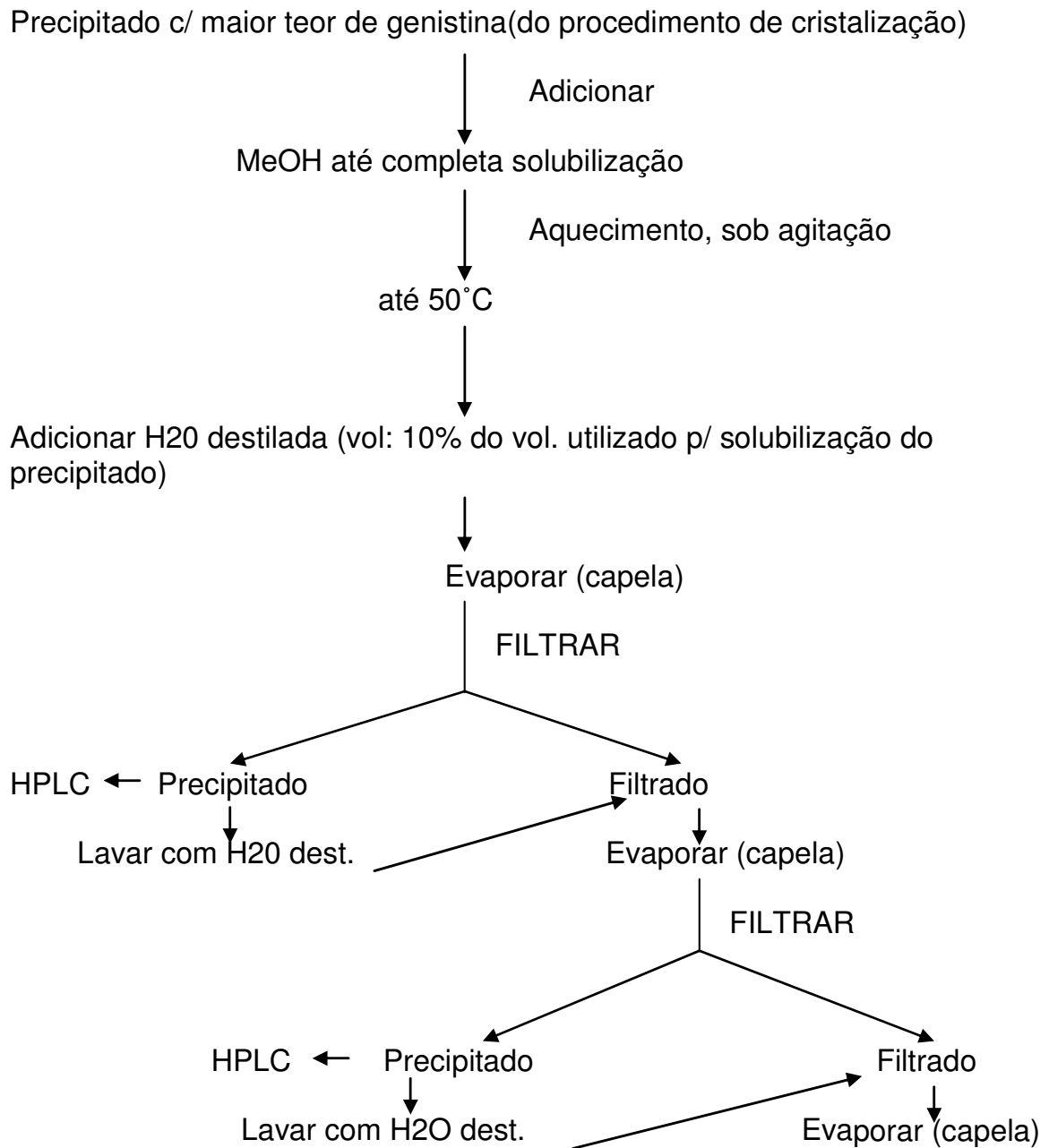


Figura 2. Processo de recrystalização para obtenção da genistina

### **3.2.2 Atividade biológica e interação das substâncias químicas puras: rutina e genistina sobre *Anticarsia gemmatalis***

Na dieta artificial foram utilizadas duas concentrações de rutina, 3,68 mg/g encontrada em PI 227687, e o dobro da concentração encontrada (7,36 mg/g) para que houvesse um parâmetro de comparação; duas concentrações de genistina, 0,26 mg/g encontrada no genótipo de soja PI 274454, e 0,52 mg/g. As concentrações de rutina e genistina, foram baseadas nas obtidas por PIUBELLI et al. 2005.

O trabalho consistiu de seis tratamentos, sendo estes: dieta normal (testemunha), dieta com adição da menor concentração de genistina ( $G_1$ ), dieta com maior concentração de genistina ( $G_2$ ), dieta com menor concentração de rutina ( $R_1$ ), dieta com maior concentração de rutina ( $R_2$ ) e dieta com adição das menores concentrações de rutina e genistina (R+G).

### **3.2.3. Extração dos flavonóides da proteína de soja**

Para assegurar a quantidade dos flavonóides na dieta artificial, e que os efeitos nutricionais e pós-ingestivos observados nas lagartas seriam devido à rutina adicionada à dieta, foi realizada a extração dos flavonóides da proteína de soja (ingrediente da dieta) utilizada para o desenvolvimento dos experimentos.

A extração da proteína de soja foi realizada em metanol 80% (MeOH) na proporção de 10 vezes o volume do solvente para a massa da amostra, sob agitação a 100 r.p.m. por aproximadamente 18h, e o extrato filtrado em funil de Buchner com papel de filtração rápida quantitativa Framex, sendo o processo de extração realizado três vezes para garantir completa extração. Alíquotas de 10 $\mu$ L do extrato foram injetadas em HPLC (marca Shimadzu). As análises realizadas em coluna de fase reversa C18 (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5 micra). A fase móvel foi composta de 2% de ácido acético (HOAc) (A) e uma mistura de metanol, ácido acético e água (MeOH:HOAc:H<sub>2</sub>O; 18:1:1) (B). O sistema inicial do gradiente linear foi

75% de A e 25% de B, atingindo aos 40 min., a situação inversa, ou seja, 25% de B e 75% de A. Aos 45 minutos, voltou à situação inicial, aí permanecendo por cinco minutos. O fluxo do solvente foi de 1 mL/ min. e a absorção de UV foi medida a 260nm.

### **3.2.4. Condução do experimento**

Lagartas no final do 2<sup>o</sup> ínstar, criadas desde a eclosão em suas respectivas dietas, foram individualizadas para a realização dos bioensaios em copos de acrílico pequenos com tampas de papelão esterilizadas. Os copos foram colocados em bandejas com tampa para evitar a perda de umidade. Os tratamentos foram mantidos em B.O.D. sob condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  UR e 12h respectivamente. As lagartas foram avaliadas diariamente, observando-se a mortalidade e o tempo de desenvolvimento de cada estágio. Os flavonóides utilizados foram dissolvidos em água destilada e misturado à dieta artificial (HOFFMANN-CAMPO et al. 1985), em temperatura inferior a  $50^{\circ}\text{C}$ , para evitar sua inativação. Por ocasião da individualização, foi avaliado o peso inicial (fresco e seco). Além disso, avaliou-se, também, peso de pupa (seco), o peso seco do alimento não consumido e das fezes produzidas pelo inseto.

Para a obtenção do peso seco inicial das lagartas, foram retiradas cinco lagartas por tratamento que, após serem pesadas, foram mortas e secas em estufa por 72h ( $60^{\circ}\text{C}$ ) e novamente pesadas. O fator de correção médio, calculado pela divisão entre os pesos seco e fresco das lagartas, foi multiplicado pelo peso fresco de cada lagarta do experimento, obtendo-se, assim, o seu peso seco inicial. O mesmo procedimento foi adotado para o cálculo do peso seco da dieta oferecida aos insetos; após a pesagem, as dietas contidas em cinco copos por tratamento foram secas (72h,  $60^{\circ}\text{C}$ ), e novamente pesadas para a obtenção do fator de correção peso fresco/peso seco. Após o consumo das lagartas, a dieta remanescente no copo foi separada das fezes, sendo ambas secas em estufa, nas condições descritas anteriormente, e pesadas. A obtenção da quantidade de dieta consumida pelas lagartas foi feita subtraindo-se do peso seco



da dieta colocada em cada copo, a quantidade de dieta restante nos copos. Após 48h da transformação em pupa, as pupas foram mantidas em estufa por 72h a 60°C, para se obter o peso seco.

### **3.2.5. Análise estatística**

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos, especificados anteriormente e 65 repetições. As variáveis consideradas neste trabalho foram: mortalidade de lagartas nos cinco ínstaes, mortalidade total de lagartas, peso inicial de lagartas (fresco e seco, em mg), peso de pupa (fresco e seco, em mg), tempo de alimentação (dias), dieta consumida (mg) e peso de fezes (mg).

As porcentagens de mortalidade foram comparadas pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), conforme proposto por BANZATTO & KRONKA (1992), ao nível de 5% de probabilidade. As demais variáveis foram analisadas considerando-se três etapas. Na primeira, realizaram-se os testes estatísticos que verificaram se todos os pressupostos requeridos pela análise de variância (ANOVA) foram atendidos. Em seguida, realizaram-se as análises de variâncias com testes de médias de Tukey e Kramer para tratamentos, ao nível de 5% de probabilidade e, na última etapa, foram realizadas as análises de covariância (ANCOVA), para testar se as variáveis mensuradas estavam interferindo no efeito de outra variável. Para as análises estatísticas deste trabalho foi utilizado o pacote estatístico SAS- Statistical Analysis System (SAS Institute 1996).

A análise de covariância (ANCOVA), proposta por RAUBENHEIMER & SIMPSON (1992) foi utilizada para estimar o crescimento, consumo alimentar, eficiência na assimilação e conversão dos alimentos ingeridos e digeridos em biomassa, além do ganho de peso. Todas as análises de covariância foram realizadas utilizando-se os pesos secos.

O crescimento e o consumo para os diferentes tratamentos foram obtidos pelo ajuste, respectivamente, do peso de pupa e quantidade de dieta consumida pela covariável tempo de alimentação. O ganho de peso foi estimado através do ajuste de

peso de pupa pela covariável peso inicial. O peso de pupa, nos diferentes tratamentos, foi ajustado pela quantidade de dieta consumida e digerida (quantidade de dieta consumida menos a quantidade de fezes produzida pelas lagartas) com objetivo de determinar a eficiência de conversão dos alimentos ingeridos e digeridos, respectivamente, em biomassa. A assimilação dos alimentos foi obtida através da correção da quantidade de fezes produzida pela covariável quantidade de dieta consumida.

Após a realização da ANCOVA considerou-se o efeito dos tratamentos ajustados pela covariável, quando a interação entre a covariável e o tratamento foi significativo. Entretanto, quando a interação (covariável x tratamento) não foi significativa, utilizou-se o modelo de linhas paralelas, considerando-se somente o efeito dos tratamentos. Nesse caso, as médias foram comparadas através das médias da ANCOVA, ou médias dos quadrados médios.

### **3.3. RESULTADOS**

#### **3.3.1. Efeito de diferentes concentrações de rutina e genistina adicionados a dieta artificial sobre a biologia e fisiologia de *A. gemmatalis***

A mortalidade da lagarta-da-soja ocorreu em intensidades variáveis em todos os instares. No entanto, o teste de  $\chi^2$  (5 graus de liberdade,  $P < 0.05$ ) indica que, apenas as porcentagens de mortalidade observada a partir do 5º instar foram dependentes dos tratamentos. A maior mortalidade total ocorreu quando as lagartas foram alimentadas com dieta artificial contendo a maior concentração de rutina ( $R_2$ ) seguida pelas lagartas alimentadas de dieta  $R_1+G_1$  (Tabela 1). As maiores porcentagens de mortalidade ocorreram no 4º e 5º instares, para os dois tratamentos.

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade de *A. gemmatalis* alimentadas em dieta artificial contendo diferentes concentrações de rutina e genistina

Tratamento	Ínstar					Total
	2 <sup>o</sup> /3 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	6 <sup>o</sup>	
Test.	1,54	0,00	1,54	0,00	0,00	3,08
G <sub>1</sub>	0,00	1,54	4,61	3,08	0,00	9,23
G <sub>2</sub>	0,00	1,54	3,08	0,00	0,00	4,62
R <sub>1</sub>	0,00	0,00	1,57	6,15	4,61	12,33
R <sub>2</sub>	3,08	4,61	10,77	15,38	4,61	38,45
R <sub>1</sub> +G <sub>1</sub>	0,00	1,54	7,69	6,15	1,54	16,92
$\chi^2$	6,69 <sup>ns</sup>	6,28 <sup>ns</sup>	10,60 <sup>ns</sup>	31,30 <sup>***</sup>	11,55 <sup>***</sup>	40,88 <sup>***</sup>

ns- não significativo, \*\*\* P < 0,001- $\chi$  (5; 0,05)

Test.= testemunha; G<sub>1</sub>= genistina 0,26mg/g; G<sub>2</sub>= genistina 0,52 mg/g; R<sub>1</sub>= rutina 3,68 mg/g; R<sub>2</sub> = rutina 7,36 mg/g e R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> = 3,68mg/g de rutina + 0,26 mg/g de genistina.

Através da ANOVA, pode ser observado o efeito significativo dos tratamentos em todas as nas variáveis analisadas (Tabela 2). O peso inicial das lagartas foi negativamente afetado pelas dietas R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, enquanto lagartas alimentadas de genistina G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e DN apresentaram os maiores pesos secos iniciais (0,61, 0,62 e 0,60 mg, respectivamente). Insetos alimentados com dieta normal (DN) e G<sub>2</sub> apresentaram os maiores pesos de pupa quando comparadas as dietas R<sub>2</sub> e R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub>. O maior consumo foi observado nos tratamentos G<sub>2</sub> quando comparado com o dos insetos alimentados em dietas que continham rutina em sua constituição (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub>). Quanto à produção de fezes, apenas G<sub>2</sub>, responsável pela maior média, diferiu de R<sub>2</sub>, que teve a menor produção de fezes. O tempo de alimentação, em geral, foi maior quando as lagartas se alimentaram da dietas R<sub>2</sub> e R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> que diferiram dos demais tratamentos. O menor tempo de alimentação pode ser observado em insetos que se alimentaram de dieta normal (DN).

Tabela 2. Peso seco inicial de lagartas 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup> ínstar (mg), peso seco de pupa (mg), dieta consumida (mg), peso seco de fezes (mg), tempo de alimentação (dias) (Média ± EP) de *A. gemmatalis* alimentadas em dieta artificial contendo diferentes concentrações de caseína e 0,65% de rutina

Tratamento	Peso Inicial (mg)	Peso de Pupa (mg)	Dieta Consumida (mg)	Peso de Fezes (mg)	Tempo de Alimentação (dias)
DN	0,60 ± 0,01 ab	63,27 ± 0,81 a	302,76 ± 5,88 ab	179,21 ± 4,58 ab	7,03 ± 0,14 e
G <sub>1</sub>	0,61 ± 0,01 a	59,53 ± 0,84 b	299,40 ± 6,13 abc	171,67 ± 4,78 ab	8,04 ± 0,15 d
G <sub>2</sub>	0,62 ± 0,01 a	60,17 ± 0,83 ab	322,90 ± 6,03 a	187,46 ± 4,70 a	9,26 ± 0,14 c
R <sub>1</sub>	0,57 ± 0,01 bc	54,16 ± 0,84 c	277,74 ± 6,08 c	182,41 ± 4,74 ab	10,28 ± 0,14 b
R <sub>2</sub>	0,53 ± 0,01 cd	49,16 ± 1,41 d	274,75 ± 10,27 bc	156,79 ± 8,00 b	11,65 ± 0,24 a
R <sub>1</sub> +G <sub>1</sub>	0,52 ± 0,01 d	51,53 ± 0,93 cd	284,30 ± 6,77 bc	169,51 ± 5,27 ab	10,96 ± 0,16 a
Valor de F	16,85***	31,92***	7,56***	3,23***	115,67***

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey e Kramer, ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05).

\*\*\* P< 0,001

Test.= testemunha; G<sub>1</sub>= genistina 0,26mg/g; G<sub>2</sub>= genistina 0,52 mg/g; R<sub>1</sub>= rutina 3,68 mg/g; R<sub>2</sub> = rutina 7,36 mg/g e R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> = 3,68mg/g de rutina + 0,26 mg/g de genistina.

### 3.3.2. Ganho de peso, crescimento, consumo alimentar, eficiência na conversão dos alimentos ingeridos e digeridos em biomassa e assimilação dos alimentos

A análise de covariância indicou não haver efeito interativo entre os tratamentos (dietas) com as covariáveis, peso inicial, na sua relação com o peso de pupa (Tabela 3a), nem do tempo de alimentação nas suas relações com o peso de pupa e o consumo (Tabela 3c), e do consumo, na sua relação como o peso de pupa.(Tabela 3e). Assim, essas relações puderam ser representadas pelo modelo de linhas paralelas. No caso da conversão do alimento ingerido em biomassa (peso de pupa x consumo), no entanto, o efeito da covariável não foi significativo, não justificando a aceitação desse modelo, optando-se pela validade dos dados obtidos pela ANOVA.

Tabela 3. Análise de covariância (ANCOVA) para testar o efeito dos diferentes tratamentos no ajuste de peso de pupa pela covariável peso inicial (a, b), peso de pupa pelas covariáveis tempo de alimentação e consumo (c, d, e, f), consumo pela covariável tempo de alimentação (c, d), peso de fezes pela covariável consumo (e), peso de pupa pela covariável alimento digerido (g) em *A. gemmatilis*

Variação	GL	Valor de F		
		Peso de pupa	Consumo	Peso de fezes
(a) <b>Peso inicial (covariável)</b>	1	7,25**	-	-
<b>Tratamento</b>	5	2,29*	-	-
<b>Peso inicial x Tratamento</b>	5	1,88 <sup>NS</sup>	-	-
<b>Resíduo</b>	286	-	-	--
(b) <b>Tratamento</b>	5	22,03***	-	-
<b>Peso inicial</b>	1	7,15**	-	-
<b>Resíduo</b>	291	-	-	-
(c) <b>Tempo de alimentação (covariável)</b>	1	0,96 <sup>NS</sup>	0,18 <sup>NS</sup>	-
<b>Tratamento</b>	5	1,62 <sup>NS</sup>	0,52 <sup>NS</sup>	-
<b>Tempo de alimentação x Tratamento</b>	5	1,14 <sup>NS</sup>	0,62 <sup>NS</sup>	-
<b>Resíduo</b>	286	-	-	-
(d) <b>Tratamento</b>	5	0,96 <sup>NS</sup>	5,73***	-
<b>Tempo de alimentação</b>	1	10,80***	0,18	-
<b>Resíduo</b>	291	-	-	-
(e) <b>Consumo (covariável)</b>	1	1,84 <sup>NS</sup>	-	15,75***
<b>Tratamento</b>	5	0,55 <sup>NS</sup>	-	1,80 <sup>NS</sup>
<b>Consumo x Tratamento</b>	5	0,26 <sup>NS</sup>	-	2,22*
<b>Resíduo</b>	286	-	-	-
(f) <b>Tratamento</b>	5	28,23***	-	-
<b>Consumo</b>	1	1,87 <sup>NS</sup>	-	-
<b>Resíduo</b>	291	-	-	-
(g) <b>Alimento digerido (covariável)</b>	1	3,49 <sup>NS</sup>	-	-
<b>Tratamento</b>	5	6,29***	-	-
<b>Alimento digerido x Tratamento</b>	5	3,04*	-	-
<b>Resíduo</b>	286	-	-	-

\*\*P<0,01, \*\*\* P< 0,001, ns- não significativo

Entretanto, observou-se interação entre os tratamentos e as covariáveis alimento digerido e consumo, nas suas relações com peso de fezes (Tabela 3e) e o peso de pupa (Tabela 3g) respectivamente.

O ganho de peso (Fig.1) apresenta uma relação positiva entre os fatores (peso inicial e peso de pupa), indicando um aumento proporcional de peso. A média da ANCOVA (gráfico de barras inserido na fig. 1) indica que insetos alimentados com dietas com adição de rutina ( $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_1+G_1$ ), apresentaram o menor ganho de peso.

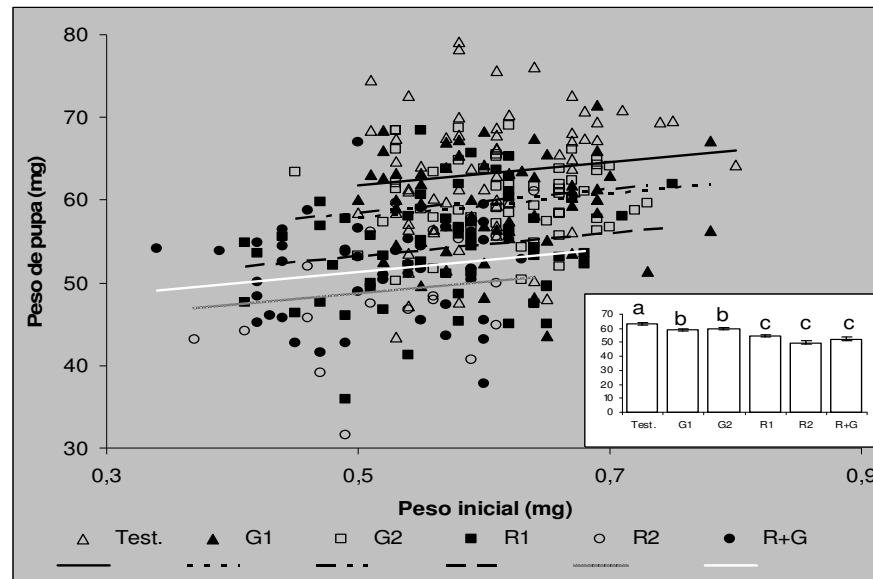


Figura 1. Relação entre peso de pupa (mg) e peso inicial (mg) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de rutina e genistina. Gráfico inserido mostra as médias de ANCOVA. Para análise estatística ver Tabela 3.

O crescimento (peso de pupa x tempo de alimentação) e o consumo (alimento ingerido x tempo de alimentação) dos insetos (Fig. 2 e 3) apresentaram uma relação negativa com o tempo de alimentação, ou seja, lagartas que prolongaram o seu tempo de alimentação ( $R_1$ ,  $R_2$  e  $R+G$ ) não apresentaram aumento proporcional no peso de pupa e no consumo. O peso de pupa não foi afetado pelos tratamentos ( $F=0,96^{ns}$ ), mas apenas pela covariável indicando que o peso de pupa foi inteiramente dependente do tempo de alimentação ( $F=10,80$   $P<0,001$ ). Insetos alimentados com dieta normal,  $G_1$  e  $G_2$ , (gráfico de barras inserido na Fig. 3) apresentaram maior consumo.

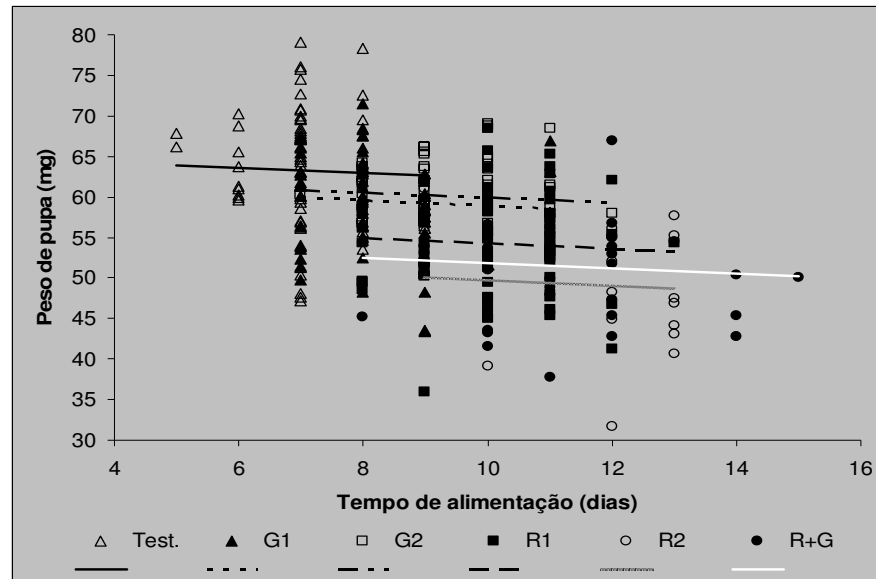


Figura 2. Relação entre peso de pupa (mg) e tempo de alimentação (dias) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de rutina e genistina

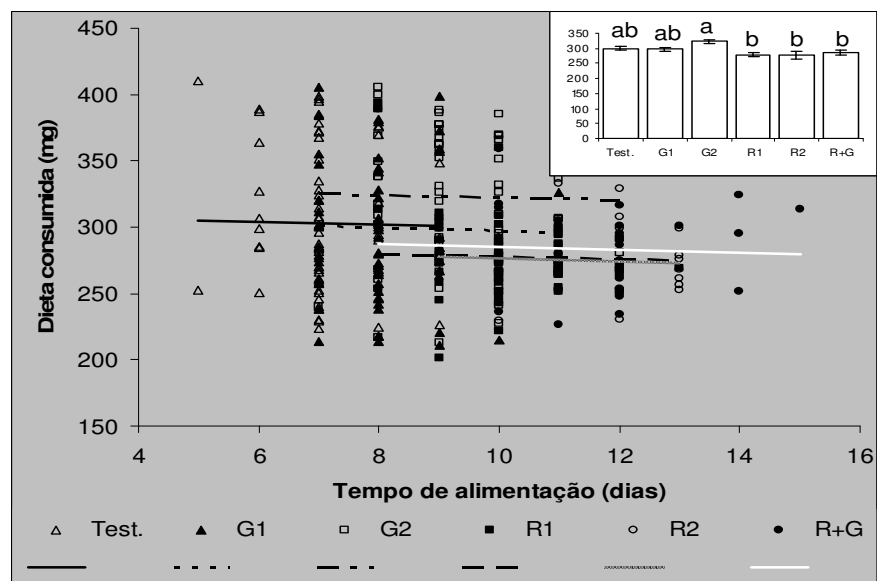


Figura 3. Relação entre dieta consumida (mg) e tempo de alimentação (dias) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de rutina e genistina. Gráfico inserido mostra as médias de ANCOVA. Para análise estatística ver Tabela 3.

A eficiência na conversão do alimento digerido em biomassa [peso de pupa ajustado pela covariável alimento digerido (consumo – fezes)] é mostrada na Figura 4, onde a tendência das linhas de ajuste dos dados sugerem que as lagartas alimentadas

em dieta  $R_1+G_1$  foram menos eficientes na conversão do alimento digerido em biomassa. No caso de  $R_2$ , observa-se uma forte queda na linha de tendência, indicando que mesmo digerindo mais alimento, não houve reflexo no aumento do seu peso de pupa.

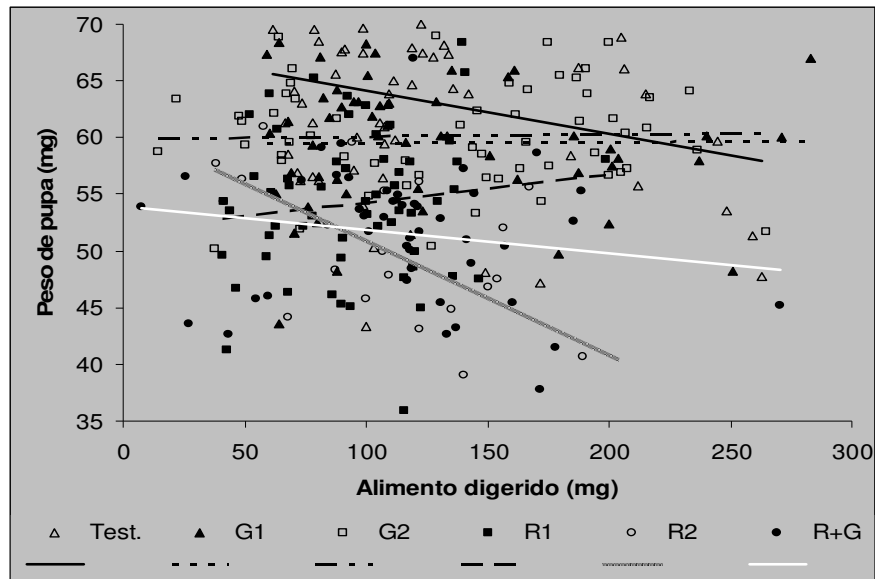


Figura 4. Relação entre peso de pupa (mg) e alimento digerido (mg) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de rutina e genistina

A interação significativa entre tratamentos (dietas) e a covariável (dieta consumida) no peso de fezes sugere que a produção de fezes dependeu do tratamento, mas também da quantidade de alimento consumido (Fig. 5). As linhas de tendência dos dados indicam que, em geral, a relação foi positiva, ou seja maior o consumo maior a produção de fezes em todos os tratamentos. No entanto, a relação entre os fatores foi estável ou negativa, para as lagartas alimentadas em  $R_1+G_1$  e  $R_2$ , respectivamente indicando que mesmo aumentando o consumo, não excretaram de maneira proporcional, retendo maior quantidade de alimento.



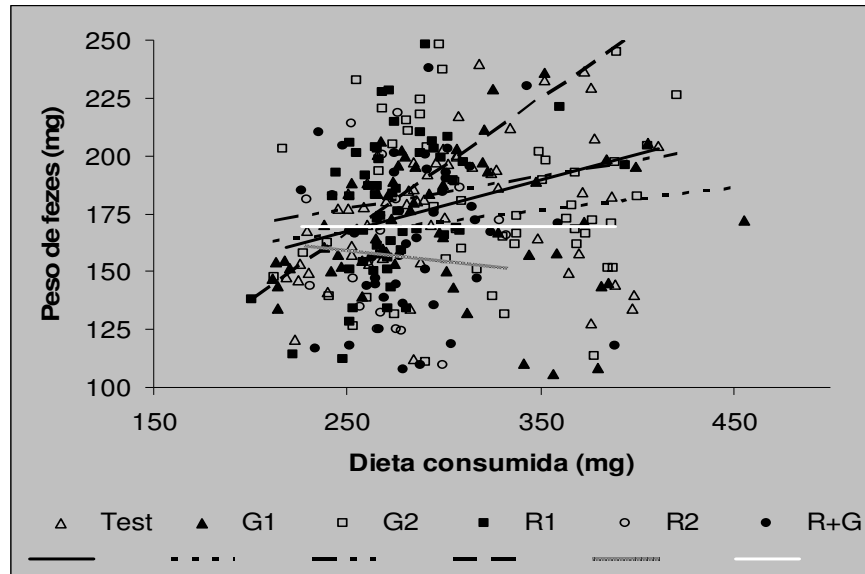


Figura 5. Relação entre peso de fezes (mg) e dieta consumida (mg) de *A. gemmatalis* alimentada em dieta artificial contendo diferentes concentrações de rutina e genistina

### 3.4. DISCUSSÃO

Ao analisar a porcentagem de mortalidade dos insetos, pode se observar que, dentre as dietas oferecidas, R<sub>2</sub> seguida de R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub>, causaram os maiores índices de mortalidade. Em ambas as mortalidades foram mais elevadas a partir do 4<sup>o</sup> ínstar até a fase de pupa, sendo menos intensa no 6<sup>o</sup> ínstar, o que confirma os resultados obtidos por GAZZONI et al (1997) ao estudarem diferentes doses de rutina e quercitina na biologia de *A. gemmatalis*. Segundo LEPPLA et al. (1977) menores mortalidades no 3<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> ínstar são devido ao baixo consumo alimentar do insetos nestes ínstars; no 3<sup>o</sup>, a quantidade de alimento ingerido é inferior a 3% do total consumido durante o ciclo e no 6<sup>o</sup>, a lagarta inicia a fase de pré - pupa, reduzindo drasticamente a ingestão de alimento. Conseqüentemente, isso acarreta também em menor ingestão de toxinas presentes nas dietas, causando menor mortalidade. A maioria das lagartas morreram nos 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> ínstars, ou seja, no período de maior consumo alimentar envolvendo maior ingestão de toxinas.

Em insetos alimentados com dietas  $R_2$  e  $R_1+G_1$ , observou-se também um prolongamento no tempo de alimentação, o que indica que estes tratamentos foram menos adequados aos insetos. De acordo com PANIZZI (1991), o alongamento do ciclo é uma das formas do inseto contornar deficiências da dieta, buscando armazenar mais lipídios que estarão diretamente envolvidos no desempenho dos adultos. Ainda, comparando-se com os demais, os insetos alimentados com dietas com adição de rutina, consumiram menos alimento. Esse fenômeno pode estar relacionado ao fato de os aleloquímicos atuarem como bloqueadores de consumo foliar, inibidores da digestão e formadores de radicais livres. O efeito bloqueador está relacionado à sensação adstringente, decorrente da capacidade dos compostos fenólicos em precipitar proteínas (APPEL 1994). Redução de consumo com efeito deletério a lepidopteros, também foram observados em *A. gemmatalis* alimentadas com dieta artificial contendo rutina (HOFFMANN-CAMPO et al. 2006; PIUBELLI et al. 2006).

Apesar do tratamento  $R_1+G_1$  ter apresentado mortalidade inferior ao tratamento  $R_2$ , estes dois tratamentos não diferiram nos aspectos biológicos, como peso inicial, peso de pupa, dieta consumida, peso de fezes e tempo de alimentação, sugerindo que a ação conjunta das substâncias rutina e genistina em baixa concentração equivalem ao efeito observado em alta concentração de rutina. O fato da maior concentração de rutina ( $R_2$ ), ter sido estabelecida como um parâmetro de comparação, sendo esta o dobro da concentração real encontrada em folhas de genótipos com característica de resistência, dificulta a utilização desta informação em programas de melhoramento. No entanto, as concentrações de rutina e genistina do tratamento  $R_1+G_1$ , foram baseadas na concentração encontrada por PIUBELLI et al. (2005) nos genótipos de soja, PI 227687 (rutina) e PI 274454 (genistina), destacando assim, a possibilidade destas substâncias atingirem estas concentrações nas folhas de cultivares de soja, através de um programa de melhoramento genético de plantas.

Em insetos alimentados com dieta contendo rutina na maior concentração ( $R_2$ ) e dieta com rutina e genistina em menor concentração ( $R_1+G_1$ ) pode-se também, observar uma relação negativa entre consumo o tempo de alimentação. As lagartas prolongaram o seu desenvolvimento, mas não aumentaram o consumo, provavelmente

pela presença de deterrente alimentar. Segundo HARBORNE & GRAYER (1993), muitos flavonóides podem agir como deterrente alimentar para insetos fitófagos, inclusive em concentrações relativamente baixas.

A redução no consumo indica que a ação de rutina e rutina mais genistina foi um dos fatores preponderantes na inibição no ganho de peso e no peso de pupa desses insetos. Porém não há como descartar os efeitos pós-ingestivos (GLENDINNING 2002), pois as dietas com rutina, principalmente em maior concentração, foram responsáveis pelas menores conversão do alimento digerido em biomassa e assimilação.

Os insetos alimentados com dieta contendo a menor concentração de rutina e genistina ( $R_1+G_1$ ), além de alongamento do ciclo biológico, apresentaram maior mortalidade, menor eficiência na conversão dos alimentos digeridos em biomassa, na assimilação dos alimentos, do crescimento e do consumo, quando comparados com os das dietas contendo essas substâncias de forma isolada, ou seja,  $R_1$  e  $G_1$ . Esse fato, sugere que a hipótese inicial foi comprovada e que existe um efeito aditivo de rutina e genistina interferem negativamente na biologia de *A. gemmatalis*.

### 3.5. REFERÊNCIAS

APPEL, H.M. The chewing herbivore gut lumen: Physicochemical condction and then impact on plant nutrients, alelochemicals and insect pathogens. p. 209–223, In: E. A. BERNAYS (ed.) **Insect–Plant Interactions**, 1994.

BANZATTO, D.A.; KRONKA S.N. **Experimentação Agrícola**. Jaboticabal, Funep. 1992, 247p.

BURDEN AND NORRIS. Role of the isoflavonoid coumestrol in the constitutive antixenotic properties of “davis” soybeans against an oligophagous insect, the Mexican bean beetle. **J. Chem. Ecol.** v. 18, p. 1069-1081, 1992.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; MANDARINO, J.M.G.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; SOUZA, A.; KIKUCHI, A.. Association of isoflavonoids with the inconpatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita* race 3. **Nematropica**, v. 35, p. 103-110, 2005.

DEWICK, P. M. Isoflavonoids. In: HARBONE, J.B.**The flavonoids. Advances in research since 1986**. London, Chapman & Hall. 1994. 676p. p.117.

GAZZONI, D. L.; HULSMEYER A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.. Efeito de diferentes doses de rutina e quercitina na biologia de *Anticarsia gemmatalis*. **Pesqu. Agropecu. Bras.** v. 32, p. 673- 681, 1997.

GRAHAM, T.L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soyabean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**. v. 95, p. 594-603, 1991.

GLENDINNING JI How do herbivorous insects cope with noxious secondary plant compounds in their diet? **Entomol. Exp. Appl.** 104: 15-25, 2002.

GREENE, G.L.; LEPPLA N.C.; DICKERSON W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **J. Econ. Entomol.** v. 69, p. 487-488, 1976.

HARBORNE, J.B. & GRAYER, R.J. Flavonoids and insects. In: HARBORNE, J.B (ed). **The Flavonoids**: advances in research since, London: Chapman & Hall, 1993.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA E.B.; MOSCARDI F. **Criação massal da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis***. EMBRAPA-CNPSo, Documentos 10, 1985, 23p.

HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. 165 p. PHD. Dissertation, The University of Reading, Reading.

HOFFMANN-CAMPO, C.B., J.B. HARBONE & A.R. MCAFFERY. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomol. Exp. Applic.** v.98., p. 181-194, 2001.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; RAMOS NETO J.A; OLIVEIRA M.C.; OLIVEIRA L.J. Detrimental effect of rutina on *Anticarsia gemmatalis*., **Pesqu. Agropecu. Bras.** v.41, p. 1453-1459, 2006.

LANE, G.A.; SUTHERLAND, O.R.W.; SKIPP, R.A. Isoflavonoid as insect feeding deterrents and antifungal components from root of *Lupinus angustifolius*. **J. Chem. Ecol.** v. 13, p. 771-783, 1987.

LEPPLA, N. C.; ASHLEY, T. R.; GUY, R. H.; BUTLER, G. D. Laboratory life history of the velvetbean caterpillar. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 70, n. 2, p. 217-220, 1977.

MARKHAM K.R. Flavones, flavonols and their glycosides, p. 197-235. In: P.M. DEY & J.B. HARBONE (eds.), **Methods in plant biochemistry**. London, Academic Press, 1989. 552p.

PANIZZI, A.R. Ecologia nutricional de insetos sugadores de sementes, p.253-278. In: A.R. PANIZZI & J.R.P PARRA (eds.), **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo integrado de pragas**. São Paulo, Manole, 1991. 359p.

PIUBELLI, G.C., et al. Augmentation of flavonoid production in soybean genotypes as response of *Nezara viridula* injury and its role on the insect feeding preference. **J. Chem. Ecol.** 29, p. 1223-1233, 2003.

PIUBELLI, G.C. et al. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*. **J. Chem. Ecol.** v. 31, p. 1515-1531, 2005.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. de Baculovirus-resistant *Anticarsia gemmatalis* responds differently to dietary rutin. **Entomol. Exp. Appl.** v. 119, p. 53-60, 2006.

RAUBENHEIMER, D.; SIMPSON S.J. Analysis of covariance: an alternative to nutritional indices. **Entomol. Exp. Appl.** v. 62, p. 221-231, 1992.

SAS Institute. SAS Propriety Software Release 6.12. SAS-STAT User's guide. Vol II. SAS Institute, Cary, N.C., 1996, 1686p.

SIMMONDS, M.S.J & STEVENSON . Effects of isoflavonoids from *Cicer* on larvae of *Heliocoverpa armigera*. **J. Chem. Ecol.**, 27: p. 965-977, 2001.

STAMP N.E. & C.M. SKROBOLA. Failure to avoid rutin diets results in altered food utilization and reduced growth rate of *Manduca sexta* larvae. **Entomol. Exp. Appl.** 68, 127-142, 1993.

WILLIAMS, C.A. & HARBORNE, J.B. Isoflavonoids, In: **Methods in Plant Biochemistry**. Academic Press Limited, 1989.

#### **CAPÍTULO 4 – Aspectos biológicos e fisiológicos de *A. gemmatalis* em diferentes genótipos de soja e identificação e quantificação de rutina e genistina nos genótipos estudados.**

**RESUMO** - Bioensaios foram realizados para comparar o efeito de diferentes dietas naturais e artificiais na biologia de *A. gemmatalis*. Assim, o desempenho de *A. gemmatalis* em folhas de soja dos genótipos PI 227687, PI274454, 'IAC-100', 'Dowling' (resistentes a insetos) e 'BR-16' (suscetível), foi comparado com o seu desempenho em dieta artificial padrão para o desenvolvimento do inseto (DN), com 7,36 mg/g de rutina ( $R_2$ ) e com 3,68 mg de rutina e 0,26 mg de genistina ( $R_1+G_1$ ). A concentração de rutina e genistina nos genótipos estudados também foi avaliada. Lagartas no final do 2º ínstar, criadas desde a eclosão em suas respectivas dietas, foram pesadas, individualizadas e observadas diariamente. A maior mortalidade pode ser observada quando os insetos se alimentaram com 'IAC-100' (34,00%),  $R_2$  (26,00%), PI 227687 e R+G (ambos, 20,00%). Prolongamento no tempo de alimentação foi observado em lagartas alimentadas com 'IAC 100' (12,00 dias), PI 227687 (11,90 dias) e  $R_1+G_1$  (11,24 dias). Os menores pesos iniciais foram observados quando lagartas de *A. gemmatalis* foram alimentadas com folhas de 'IAC-100' (0,16 mg),  $R_2$  (0,22 mg) e PI 227687 (0,24 mg). 'Dowling' apresentou a maior concentração de genistina. As maiores concentrações de rutina foram observadas em PI 227687 e PI 274454; no entanto, estes genótipos apresentaram as menores concentrações de genistina e a cultivar IAC-100 apresentou concentrações intermediárias de rutina e uma das maiores concentrações de genistina. Desta forma, conclui-se que tanto a rutina quanto a genistina estão relacionadas à defesa da soja a insetos, ressaltando a importância da manutenção desses compostos em cultivares de soja.

**Palavras-chave:** lagarta-da-soja, flavonóides, resistência constitutiva.



#### 4.1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, numerosas substâncias ativas que atuam no controle populacional de insetos têm sido identificadas em diversas espécies vegetais. A maioria dessas substâncias tem origem no metabolismo secundário. Metabólitos secundários como os flavonóides podem causar uma série de efeitos antibióticos e/ou antinutricionais em diversos insetos-pragas (HARBORNE & GRAYER, 1993). Em soja HOFFMANN-CAMPO (1995) observou que, constitutivamente, extratos de folhas da PI 227687 contem isoflavonóide genistina e sete flavonóis glicosídicos, entre eles rutina. PIUBELLI et al (2005), ao estudar extrato foliar dos genótipos resistentes a insetos PI 274454, 'IAC-100' e PI 229358, identificaram e quantificaram o flavonol rutina e o isoflavonóide genistina. Estas substâncias têm sido associadas à resistência de soja a desfolhadores, e sua identificação, e papel que desempenham nas interações dos insetos com as plantas podem orientar os melhoristas no sentido de mantê-las nas gerações descendentes, uma vez que fazem parte do arsenal de defesa das plantas contra herbívoros.

Em geral, os processos de melhoramento genético dirigido apenas para o aumento da produtividade, podem modificar os mecanismos de resistência, tornando as plantas mais vulneráveis a doenças e insetos-praga (LUSTOSA, 1994). Entretanto, esforços têm sido realizados por alguns grupos de pesquisa para se obter linhagens e cultivares com resistência a insetos. Em experimentos a campo, o genótipo PI 227687 (LUEDDERS & DICKERSON 1977) e linhagens com a PI 274454 (REZENDE et al. 1980) em sua genealogia apresentaram menor desfolhamento do que as cultivares suscetíveis, sendo consideradas fontes adequadas para programas de melhoramento visando resistência a insetos pragas. Essas PIs não apresentam características agronômicas adequadas para a pronta utilização, porém, por meio de trabalhos realizados por melhoristas, já foram obtidas e desenvolvidas linhagens, delas descendentes, que foram utilizadas como fontes de resistência (HATCHETT *et al.* 1979; HARTWIG et al. 1984; KILLEN 1990).

O cultivar IAC-100, lançado em 1988 pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), apresenta característica de resistência a percevejos fitófagos e desfolhadores da soja, possuindo, também, boas características agronômicas. Este genótipo também tem se mostrado resistente a mosca - branca (LIMA & LARA, 2004). Sua resistência provavelmente, é herdada, em sua maioria das introduções PI 274454 e PI 229358 (ROSSETTO et al. 1990; ROSSETTO et al. 1995; VEIGA et al. 1999).

O genótipo 'Dowling' (PI 548663) tem sido reportado como resistente a afídeos (LI et al, 2007), tem apresentado efeito antibiótico e/ou antinutricional nestes insetos, reduzindo a sobrevivência, longevidade e fecundidade, sendo ainda menos preferido em testes com chance de escolha (HILL et al, 2006).

O aumento da área cultivada e o cultivo sucessivo da cultura da soja, tem propiciado um crescimento na incidência de insetos-praga, acarretando no uso sem critérios de inseticidas químicos. Esses fatos destacam a importância de se investir no aumento da resistência genética plantas a insetos, que pode se transformar em um componente importante do manejo integrado de pragas e essencial a agricultura orgânica. Nessa, insumos sintéticos para o controle de pragas não são utilizados.

Para estudar se a resistência a insetos dos genótipos PI 227687, PI 274454 e 'IAC 100' é devido a substâncias químicas presentes em sua constituição, utilizaram-se extratos desses genótipos misturados à dieta artificial. Pelos resultados obtidos, constatou-se que aqueles extratos afetam negativamente a biologia de *A. gemmatalis* (PIUBELLI, 2004). No entanto, ainda não foram definidos os efeitos das folhas desses genótipos sobre a biologia do inseto. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da alimentação em folhas de diferentes genótipos de soja e, em dietas artificiais, conteúdo rutina e genistina, sobre alguns aspectos biológicos e fisiológicos da lagarta-da-soja, *A. gemmatalis*.e também, quantificar a concentração de rutina e genistina nos genótipos estudados.

## 4.2. Material e Métodos

### 4.2.1. Genótipos de soja

Os genótipos 'BR-16', PI 227687, PI 274454, 'IAC-100' e 'DOWLING' foram utilizados nos experimentos. Sua genealogia ou origem é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Genealogia ou origem dos genótipos de soja utilizados nos testes de resistência de *Anticarsia gemmatalis*

Genótipo	Origem
'BR-16'	D 69-1310-M58 (D 49-772 x D 49-2491) x 'Davis'
PI 227687	Okinawa, Japão
PI 274454	Okinawa, Japão
'IAC-100'	IAC 78-2318 x IAC-12
'Dowling'	Semmes x PI 200492

Fonte: Valle & Lourenção (2002)

Os genótipos de soja com característica de resistência a insetos (PI 227687, PI 274454, 'IAC-100' e 'Dowling') e 'BR-16' (suscetível) foram semeados em casa de vegetação da Embrapa Soja, em vasos com capacidade de cinco litros, na quantidade de 10 sementes por vaso, deixando-se após desbaste, apenas cinco plantas. Para garantir plantas em estágio V5, em todo o desenvolvimento da lagarta, foram realizados seis plantios por semana, de forma escalonada, em 20 vasos por genótipo em cada plantio. As folhas foram colhidas no estágio V5 (FEHR & CAVINESS 1977), conduzidas ao laboratório, lavadas em hipoclorito de sódio a 5%, enxaguadas com água destilada e secas em papel filtro antes de serem oferecidas as lagartas.

## 4.2.2. Quantificação de rutina e genistina

### 4.2.2.1 Preparo das amostras

A identificação e quantificação dos compostos rutina e genistina foi realizada utilizando-se o 4<sup>o</sup> trifólio de cada genótipo, colhidos no estádio V5. Para o preparo das amostras, depois de retirados os pecíolos, alíquotas de cada amostra (300 a 500 mg) foram pesadas e maceradas em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e transferidas para tubos de vidro, adicionando-se uma solução de 80% MeOH em água, no volume de 10 vezes a massa da amostra. Os tubos foram levados ao ultrassom por 20 min. Posteriormente, as amostras foram filtradas e secas em nitrogênio gasoso. Após secagem, houve ressolubilização em 1,5 ml de 80% MeOH. As amostras foram, então, transferidas para tubos de amostrador automático e analisadas em cromatógrafo Shimadzu, HPLC- Cromatógrafo Líquido de Alta Performance, (Prominence com controlador CBM-20A; detetor SPD-20A; degaseificador DGU 20A5; Bomba LC-20AT; auto sampler SIL-20A e forno CTO 20A).

### 4.2.2.3 Análises cromatográficas

Alíquotas de 10 $\mu$ L do extrato foram injetadas no HPLC, sendo as análises realizadas em coluna de fase reversa (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno), preenchida pelo suporte C18 (partículas de 5 micra). A fase móvel foi composta de 2% de ácido acético (HOAc), solvente A, e uma mistura de metanol, ácido acético e água (MeOH:HOAc:H<sub>2</sub>O; 18:1:1), solvente B. O sistema inicial do gradiente linear foi 75% de A e 25% de B, atingindo aos 40 min., a situação inversa, ou seja, 25% de A e 75% de B. Aos 45 minutos, voltou à situação inicial, aí permanecendo por 5 min, antes da próxima injeção. O fluxo do solvente foi de 1 mL/ min. e a absorção pelo detector UV foi medida a 260nm. Os padrões de flavonóides utilizados foram rutina (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>) (quercitina 3-O-raminoglicosídeo) e genistina (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>) (genisteína, 7-O- $\beta$ -D-

glicosídeo), ambos da marca Sigma. Para a obtenção das áreas das substâncias padrões, sete concentrações de rutina (0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,32 e 0,64 mg/ml) e quatro de genistina (0,01, 0,02, 0,04 e 0,08 mg/ml) foram injetadas em cromatógrafo, conforme descrito anteriormente. Com os valores das áreas das substâncias padrão e de suas respectivas concentrações, foi construído um gráfico de dispersão e a obtenção de uma equação de regressão linear. Após injeção das amostras, a área das substâncias rutina e genistina foi obtida, aplicando este valor na equação, obteve-se a concentração das substâncias (mg/mL) em cada genótipo. A concentração das substâncias em mg/g de folha fresca foi calculada através da divisão da concentração obtida (mg/mL) pela massa da folha de cada genótipo, considerando o volume de ressolubilização.

#### **4.2.3. Análise estatística**

##### **4.2.3.1. Extração de Flavonóides**

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos ('Br-16', 'IAC-100', PI 227687, PI 274454 e 'Dowling') e três repetições. As variáveis respostas consideradas neste trabalho foram: concentração de genistina e rutina (mg/g). Foram realizadas análises de variâncias com testes de médias de Tukey para tratamentos, ao nível de 5% de probabilidade.

##### **4.2.3.2. Aspectos Biológicos de *Anticarsia gemmatalis***

O delineamento estatístico utilizado foi blocos ao acaso, com oito tratamentos (alimentos) [Dieta normal (DN), DN com 7,36 mg de rutina (R<sub>2</sub>), DN com 3,68 mg de rutina + 0,26 mg de genistina (R+G), folhas de 'BR-16', PI 227687, PI 274454, 'IAC-100', 'Dowling'] e 50 repetições. As variáveis respostas consideradas neste trabalho

foram: mortalidade de lagartas, peso inicial de lagartas (mg) (fresco e seco), peso de pupa (mg) (seco), e tempo de alimentação (dias).

A mortalidade foi comparada pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), conforme BANZATTO & KRONKA (1992), ao nível de 5% de probabilidade. As demais variáveis foram analisadas considerando-se três etapas. Na primeira, realizaram-se os testes estatísticos que verificaram se todos os pressupostos requeridos pela análise de variância (ANOVA) foram atendidos. Em seguida, foram feitas as análises de variância com testes de médias de Tukey e Kramer para tratamentos, ao nível de 5% de probabilidade e, na última etapa, foram realizadas as análises de covariância (ANCOVA), para os casos dos tratamentos estarem interferindo (ou interagindo) com das covariáveis nas suas relações com as variáveis respostas. Para as análises estatísticas deste trabalho foi utilizado o pacote estatístico SAS- Statistical Analysis System (SAS Institute 1996).

O ganho de peso e o crescimento foi estimado através da ANCOVA, ajustando-se o peso de pupa pela covariáveis peso inicial e tempo de alimentação respectivamente.

Após a realização da ANCOVA, considerou-se o efeito dos tratamentos ajustados pela covariável, quando a interação entre a covariável e o tratamento foi significativa. Entretanto, se a interação (covariável x tratamento) não foi significativa, utilizou-se o modelo de linhas paralelas, considerando-se somente o efeito dos tratamentos. Quando nesse modelo, o valor de F das covariáveis não foi significativo, utilizaram-se os resultados obtidos pela ANOVA.

#### **4.2.4. Condução do experimento**

Lagartas de *A. gemmatalis* de final do 2º ínstar, provenientes do laboratório de criação massal da Embrapa Soja, criadas desde a eclosão em seus respectivos alimentos (dietas ou folhas de soja), foram individualizadas, em copos de acrílico pequenos com tampas de papelão esterilizadas (dietas), e placas de Petri (folhas). Os tratamentos foram mantidos em câmara de criação tipo B.O.D., sob condições

controladas de temperatura, umidade e fotofase de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  UR e 12h. As lagartas foram avaliadas diariamente, observando-se a mortalidade e o tempo de desenvolvimento de cada estágio. Por ocasião da individualização, foi avaliado o peso inicial. Além disso, avaliou-se também, peso de seco de pupa. Para a obtenção do peso seco inicial das lagartas, foram retiradas cinco lagartas por tratamento que, após serem pesadas, foram mortas e secas em estufa por 72h ( $60^\circ\text{C}$ ) e novamente pesadas. O fator de correção médio, calculado pela divisão entre o peso seco e fresco das lagartas, foi multiplicado pelo peso fresco de cada lagarta do experimento, obtendo-se, assim, o seu peso seco inicial.

Após 48h da transformação em pupa, estas foram mantidas em estufa por 72h a  $60^\circ\text{C}$ , para obtenção do peso seco.

### **4.3. RESULTADOS**

#### **4.3.1. Efeito de diferentes genótipos de soja e dietas artificiais contendo diferentes concentrações de rutina e genistina sobre a biologia e fisiologia de *A. gemmatalis***

A mortalidade das lagartas ocorreu em intensidade variável durante os diferentes instares, mas apenas as diferenças observadas na porcentagem de mortalidade total ocorreram em função dos tratamentos, conforme resultado do teste de  $\chi^2$  (7;  $p > 0,05$ ). A maior mortalidade pode ser observada quando os insetos foram alimentados com o genótipo 'IAC-100', R2, PI 227687 e R+G (Tabela 2). Nesses tratamentos as maiores porcentagens de mortalidade ocorreram entre o 4º e o 6º ínstar.

Tabela 2. Porcentagem de mortalidade de *A. gemmatilis* alimentadas em diferentes genótipos de soja e em dieta artificial contendo diferentes concentrações de rutina e genistina

Tratamento	Ínstar					Total
	2º/3º	3º	4º	5º	6º	
Test.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R <sub>1</sub> +G <sub>1</sub>	2,00	0,00	4,00	10,00	4,00	20,00
R <sub>2</sub>	0,00	2,00	4,00	16,00	4,00	26,00
'BR-16'	0,00	2,00	2,00	4,00	2,00	10,00
PI227687	0,00	2,00	6,00	8,00	4,00	20,00
'IAC-100'	0,00	6,00	6,00	14,00	8,00	34,00
PI274454	0,00	2,00	6,00	8,00	2,00	18,00
'Dowling'	0,00	0,00	2,00	4,00	6,00	12,00
$\chi^2$	7,02 <sup>NS</sup>	7,10 <sup>NS</sup>	4,94 <sup>NS</sup>	12,59 <sup>NS</sup>	4,94 <sup>NS</sup>	35,14 <sup>***</sup>

ns- não significativo, \*\*\* P < 0,001- $\chi^2$  (7; 0,05)

Test.= testemunha; R<sub>2</sub> = rutina 7,36 mg/g e R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> = 3,68mg/g de rutina + 0,26 mg/g de genistina

O peso inicial da lagarta, o peso das pupas e o tempo de alimentação (Tabela 3) foram afetados pelos diferentes tratamentos (ANOVA). O peso inicial foi negativamente afetado quando as lagartas foram alimentadas com 'IAC-100', R<sub>2</sub> e PI 227687. Os tratamentos DN e R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> proporcionaram os maiores pesos secos iniciais. Porém, apesar de insetos alimentados com R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> terem apresentado um dos maiores pesos iniciais, isto não refletiu no peso de pupa; lagartas alimentadas neste tratamento, juntamente com R<sub>2</sub> e PI 227687, apresentaram os menores pesos de pupa.

Tabela 3. Peso seco inicial de lagartas 2º/3º ínstar (mg), peso seco de pupa (mg) e tempo de alimentação (dias) (Média ± EP) de *A. gemmatilis* alimentadas em dieta artificial contendo diferentes concentrações de rutina e genistina e genótipos de soja

Tratamento	Peso Inicial (mg)	Peso de Pupa (mg)	Tempo de Alimentação (dias)
DN	0,51 ± 0,01 a	65,98 ± 1,17 a	7,96 ± 0,16 c
Rutina + genistina	0,41 ± 0,01 b	45,52 ± 1,45 cd	11,24 ± 0,20 ab
Rutina em alta conc.	0,22 ± 0,01 d	40,83 ± 1,68 d	10,85 ± 0,23 b
BR-16	0,35 ± 0,01 c	60,02 ± 1,28 b	8,23 ± 0,17 c
PI -227687	0,24 ± 0,01 d	47,54 ± 1,65 cd	11,90 ± 0,23 a
IAC-100	0,16 ± 0,01 c	48,54 ± 1,79 c	12,00 ± 0,24 a
PI-274454	0,34 ± 0,01 c	55,69 ± 1,41 b	11,03 ± 0,19 b
Dowling	0,35 ± 0,01 c	57,88 ± 1,30 b	8,57 ± 0,18 c
Valor de F	12,82 <sup>***</sup>	5,82 <sup>***</sup>	12,02 <sup>***</sup>

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey e Kramer, ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05).

\*\*\* P < 0,001

Test.= testemunha; R<sub>2</sub> = rutina 7,36 mg/g e R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> = 3,68mg/g de rutina + 0,26 mg/g de genistina.



#### 4.3.2. Ganho de peso e crescimento, em populações de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta artificial e com diferentes genótipos de soja com característica de resistência

A análise de covariância não indicou efeito interativo entre os tratamentos e as covariáveis peso inicial (Tabela 4a) e tempo de alimentação (Tabela 4c) em suas relações com o peso de pupa. Tampouco, detectou-se efeito significativo das covariáveis, evidenciando a validade da ANOVA, apenas o efeito dos tratamentos. Assim, observou-se que o ganho de peso (peso inicial ajustado pelo peso de pupa) e o crescimento (peso de pupa ajustado pelo tempo de alimentação) do inseto ocorreu apenas em função das dietas alimentares (dietas artificiais e folhas de soja), sem nenhum efeito adicional das covariáveis.

Tabela 4. Análise de covariância (ANCOVA) para verificar o efeito dos diferentes tratamentos no ajuste de (a) peso de pupa pelas covariáveis peso inicial e peso de pupa, pela covariável tempo de alimentação (c) em *A. gemmatalis*.

Variação	GL	Valor de F
		Peso de pupa
(a) Peso inicial (covariável)	1	0,14 <sup>NS</sup>
Tratamento	7	1,51 <sup>NS</sup>
Peso inicial x Tratamento	7	0,60 <sup>NS</sup>
Resíduo	227	-
(b) Tratamento	7	24,74***
Peso inicial	1	0,15 <sup>NS</sup>
Resíduo	233	-
(c) Tempo de alimentação (covariável)	1	1,37 <sup>NS</sup>
Tratamento	7	2,74 <sup>NS</sup>
Tempo de alimentação x Tratamento	7	1,72 <sup>NS</sup>
Resíduo	227	-
(d) Tratamento	7	35,70***
Tempo de alimentação	1	2,68 <sup>NS</sup>
Resíduo	233	-

\*\*P<0,01, \*\*\* P< 0,001, ns- não significativo

### 4.3.3. Identificação e quantificação de rutina e genistina

A isoflavona genistina foi observada em todos os cromatogramas dos extratos foliares dos genótipos estudados (Tabela 5). Comparando-se os genótipos, observou-se que as folhas da cultivar Dowling, continham a maior concentração e, folhas de PI 274454 , 'BR-16' e PI 227687 as menores concentrações desta isoflavona .

Rutina, entretanto, não foi observada nos extratos preparados de folhas de 'Dowling' e 'BR-16'. As maiores concentrações de rutina foram observadas em PI 227687 (0,3508 mg/g). A cultivar IAC-100 apresentou concentrações intermediárias de rutina e uma das maiores concentrações de genistina.

Tabela 5. Concentração de rutina e genistina (Média  $\pm$  EP) baseado no peso fresco de genótipos de soja com característica de resistência e suscetibilidade a insetos

Genótipos	Concentração mg/g	
	Genistina	Rutina
PI 227687	0,019 $\pm$ 0,002 b	0,3508 $\pm$ 0,04 a
PI 274454	0,015 $\pm$ 0,003 b	0,1477 $\pm$ 0,05 b
'IAC-100'	0,044 $\pm$ 0,008 a	0,0952 $\pm$ 0,02 b
'Dowling'	0,058 $\pm$ 0,003 a	-
'BR-16'	0,017 $\pm$ 0,003 b	-

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

## 4.4. DISCUSSÃO

As maiores mortalidades foram observadas em lagartas do 5<sup>o</sup> instar que se alimentaram de folhas de 'IAC-100', dietas artificiais contendo R<sub>2</sub> ou R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> e folhas da PI 227687. De modo geral, esses tratamentos causaram efeito negativo mais acentuado na lagarta-da-soja, provocando desde prolongamento no tempo de alimentação até a formação de pupas menores. Em geral, o aumento no período de desenvolvimento dos insetos é provocado por alimento com baixa qualidade nutricional, ou pela presença de toxinas (SCRIBER & SLANSKI Jr. 1981). Como possivelmente a qualidade nutricional das folhas de soja oferecidas aos insetos são semelhantes e a dieta normal (DN) sem

adição de flavonóides foi adequada para o desenvolvimento de *A. gemmatalis*, sugere-se que os efeitos adversos tenham ocorrido em função da presença de toxinas no alimento oferecido às lagartas. Nenhuma morte foi registrada entre as lagartas alimentadas em DN, que também apresentaram maiores pesos tanto no final do 2º instar e como na fase de pupas, quando comparadas com os demais tratamentos.

A cultivar IAC-100 causou 34% de mortalidade, menor peso larval e prolongamento do tempo de alimentação; estes resultados confirmam os obtidos por PIUBELLI et al. (2005). Estes autores observaram, ao estudarem a biologia de *A. gemmatalis* em dieta artificial contendo extrato foliar de 'IAC-100', alta mortalidade (33,4%), além de efeito deletério na fisiologia e biologia do inseto. A similaridade dos efeitos observados em insetos alimentados com extrato de 'IAC-100' adicionado à dieta artificial e alimentados com folhas deste genótipo, indicam que a resistência desta cultivar a insetos desfolhadores deve estar relacionada, principalmente, às substâncias químicas. Ainda, a adição do extrato de 'IAC-100' a dieta artificial descartou a possibilidade de características morfológicas estarem atuando nos resultados. Além disso, VALLE & LOURENÇÃO (2002) analisando as densidades de tricomas nas folhas de genótipos resistentes a insetos observaram que 'IAC-100' apresentou uma das mais baixas densidades de tricomas. Porém, ao quantificar rutina e genistina nesse genótipo observou-se a presença de concentrações intermediárias de rutina e uma das maiores concentrações de genistina, quando comparadas aos demais genótipos, indicando que a sua resistência a lagarta-da-soja pode estar relacionada a uma ação conjunta de rutina e genistina. No entanto deve-se ainda considerar a presença de outras substâncias químicas nas folhas. A lipoxigenase foi observada em folhas deste genótipo por SILVA et al. (2002). Segundo estes autores, esta enzima tem sido relacionada com o aumento da expressão de genes de defesa da planta, principalmente aqueles que expressam para inibidores de proteases. HILDER et al. (1987) sugerem que os inibidores de proteases estão envolvidos na proteção de plantas a lepidópteros.

Os presentes resultados indicam que as folhas da PI 227687 também afetaram a biologia do inseto. Este genótipo tem sido estudado como fonte de resistência a diferentes insetos-praga. Em testes de não preferência para *A. gemmatalis*, ficou entre

os menos preferidos pelos insetos (HOFFMANN-CAMPO et al. 1994). Em bioensaios, observou-se que a fração extraída de PI227687, denominada FrA, composta por uma mistura de quercitina 3-O-glucosilactosídio, rutina e genistina afetou tanto a biologia como a fisiologia de *Trichoplusia ni* (HOFFMANN-CAMPO et al. 2001). KHAN et al. (1986), ao estudar a biologia de *T. ni* em discos foliares da cultivar 'Davis', considerada testemunha susceptível, "pincelados" com extrato de PI227687, concordam que a resistência deste genótipo pode ser atribuída a fatores químicos. No entanto, esses autores consideraram características morfológicas como os tricomas, dominantes na sua resistência. Embora a PI 227687 tenha apresentado alta densidade de tricomas foliares (VALLE & LOURENÇÃO 2002), quando comparada a diversos genótipos de soja com característica de resistência, os efeitos adversos observados em *T. ni* (HOFFMANN-CAMPO et al. 2001) e *A. gemmatilis* (PIUBELLI et al 2005) não podem ser atribuídos à presença de pelos, pois para a realização dos experimentos, esses autores adicionaram apenas o extrato foliar à dieta artificial.

Apesar de 'Dowling' apresentar a maior concentração de genistina não provocou acentuado efeito antinutricional no inseto. Ainda, considerando que os tratamentos R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub>, 'IAC-100'(com concentrações intermediárias de rutina e uma das maiores concentrações de genistina) e PI227687, causaram efeitos biológicos e fisiológicos equivalentes aos causados por R<sub>2</sub>, cuja concentração de rutina é semelhante ao dobro da estimada na PI 227687 os resultados permitem sugerir que, tanto a rutina quanto a genistina, atuam na resistência de plantas a insetos. As informações obtidas nesse trabalho indicam que a resistência da cultivar IAC 100 pode estar relacionada a um efeito aditivo destas substâncias. Entretanto, para o completo entendimento dessa interação, estudos adicionais envolvendo as enzimas, como as lipoxigenases, devem ser realizados.

#### 4.5. REFERÊNCIAS

BANZATTO, D.A.; KRONKA S.N. **Experimentação Agrícola**. Jaboticabal, Funep. 1992, 247p.

FEHR, W.R. & C.E. CAVINESS. **Stages of soybean development**. Special Report 80. Ames, Iowa State University of Science and Technology, 11p.,1977.

HARBORNE, J.B.; GRAYER, R.J. Flavonoids and insects. In: HARBORNE, J.B (Ed) **The flavonoids advances in research since 1986**. Chapman & Hall, London, 1993.

HATCHETT, J.H.; BELAND G.L.; KILLEN T.C. Identification of multiple insect resistant soybean lines. **Crop Sci**. v.19, p. 557-559, 1979.

HARTWIG, E.E.; TURNIPSEED S.G.; KILLEN T.C. Registration of soybean germoplasm line D75-10169. **Crop Sci**. v. 24, p. 214-215, 1984.

HILDER, V.A; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEREMAN,S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, v.330, p. 160-163,1987.

HILL, C.B; LI, Y.; HARTMAN, G.L. A single dominant gene for resistance to the soybean aphid in the soybean cultivar dowling. **Crop. Sci**. v.46, p. 1601-1605, 2006.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MAZZARIN, R.M.; LUSTOSA, P.R. Mecanismos de resistência de genótipos de soja: teste de não preferência para *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lep.: Noctuidae). **Pesq. Agrop. Bras**. v. 29, p. 513-519, 1994.

HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. 165 p. PHD. Dissertation - The University of Reading, Reading.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; HARBONE J.B.; MCAFFERY A.R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomol. Exp. Applic.** v. 98, p. 181-194, 2001.

KHAN, Z. R.; WARD J. T.; NORRIS D. M. Role of trichomes in soybean resistance to cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Entomol. Exp. Applic.** v. 42, p. 109-117, 1986.

KILLEN, T.C. Multiple insect resistance in soybean germoplasm line. **Soybean Genetic Newsl.** v.17, p.103-105,1990.

LI , Y.; HILL, C.B.; CARLSON, S.R. Soybean aphid resistance genes in the soybean cultivars dowling and Jackson map to linkage group M. **Mol Breeding** v. 19, p. 25-34, 2007.

LIMA, A.C.S; LARA, F.M. Resistência de genótipos de soja à mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemíptera: Alerodidae). **Neotrop. Entomol.** v.33, p. 71-75,2004.

LUEDDERS, V.D; DICKERSON, W.A. Resistance of selected soybean genotypes and segregating population to cabbage looper feeding. **Crop Sci.** v.17, p. 395-396, 1977.

LUSTOSA, P.R. **Qualidade da semente e senescência de genótipos de soja *Glinine max* (L.) Merrill, sob infestação de percevejos (Hemíptera: Pentatomidae)** 1994. 43p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

PIUBELLI, G.C. **Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais.** 2004. Tese Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

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 gemmatilis*? **J. Chem. Evol.** v. 31, p. 1515-1531, 2005.

REZENDE, J.A.M.; MIRANDA DE M.A.C; MASCARENHAS H.A.A. Comportamento de cultivares de soja em relação à área foliar comida por lagartas das folhas. **Bragantia** v.39, p.161-165, 1980.

ROSSETTO, C.J.; TISSELLI FILHO O.; CIONE J.; GALLO P.B.; RAZERA L.F., TEIXEIRA, J.P.F.; N. BERTOLETTO. Cultivar de soja 'IAC-100'. Campinas, IAC, (folder), 1990.

ROSSETTO, C.J.; GALLO P.B.; RAZERA L.F.; BERTOLETTO N.; IGUE T.; MEDINA P.F.; TISSELLI FILHO O.; AGUILERA V.; VEIGA R.F.A.; PINHEIRO J.B. Mechanisms of resistance to stink bug complex in the soybean cultivar 'IAC-100'. **An. Soc. Entomol. Brasil** v. 24, p. 517-522, 1995.

SAS Institute. 1996. SAS Propriety Software Release 6.12. SAS-STAT User's guide. Vol II. SAS Institute, Cary, N.C., 1686p.

SCRIBER, J.M.; SLANSKY F. JR. The nutritional ecology of immature insects. **Ann. Rev. Entomol.** 26: 183-211, 1981.

SILVA, F.B.; OLIVEIRA, M.G.; BATISTA, R.B.; PIRES, C.V.; XAVIER, L.P.; PIOVESAN, N.D.; OLIVEIRA, J.A.; JOSÉ, I.C.; MOREIRA, M.A. Função fisiológica de lipoxigenases

de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hubner). **Arq. Inst. Biol.** v. 69, p. 67-74, 2002.

VALLE, G.E.; LOURENÇÃO A.L. Resistência de genótipos de soja a *Bemisia tabaci* (genn.) biótipo B (Hemíptera: Aleyrodidae). **Neotrop. Entomol.** v. 31, p. 297-303, 2002.

VEIGA, R.F.A.; ROSSETTO C.J.; RAZERA L.F.; GALLO P.B.; BERTOLETTO N.; MEDINA P.F.; TISSELLI FILHO O.; CIONE J. **Caracterização morfológica e agronômica do cultivar de soja 'IAC-100'**. Campinas, Instituto Agrônomo, Boletim Técnico 177, 1999 23p.



**CAPÍTULO 5 - Efeitos de flavonóides adicionados a dietas e de flavonóides constitutivos de genótipos resistentes à insetos no epitélio do intestino médio em lagartas de *Anticarsia gemmatalis***

**RESUMO** – Na soja, as substâncias constitutivas de defesa da planta mais prováveis são os flavonóides sendo o flavonól rutina e a isoflavona genistina, as substâncias mais evidentes associadas à resistência de soja a desfolhadores. O modo de ação desses compostos no organismo dos insetos ainda não está esclarecido, mas estudos indicam o intestino médio (IM) como principal local de atuação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de alterações morfológicas no epitélio do IM de *Anticarsia gemmatalis* após ingestão da rutina (R) e genistina (G). As substâncias foram adicionadas a dietas artificiais em diferentes concentrações 3,68mg/g (R<sub>1</sub>); 7,36mg/g (R<sub>2</sub>); 0,26mg/g (G<sub>1</sub>); 0,52mg/g (G<sub>2</sub>) e a mistura das duas 3,68mg/g+0,26mg/g; (R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub>); dietas sem adição das substâncias (DN) foram consideradas testemunha. Ainda, foram avaliados os efeitos de genótipos de soja resistente a insetos (PI 227687, 'IAC-100', PI274454 e 'Dowling'), que apresentam rutina e genistina em sua constituição, e ('BR-16') suscetível, sem rutina em sua composição foi utilizado como controle. O IM de lagartas de 3<sup>o</sup> instar foi fixado em Bouin, processado e analisado rotineiramente para microscopia de luz. Tanto a R como a G provocaram alterações focais no IM; ou seja, existem regiões alteradas em meio a regiões íntegras. O efeito de R sempre foi maior que o de G, em qualquer concentração. Insetos que consumiram PI 227687 e 'IAC-100' apresentaram maiores alterações, quando comparados aos demais genótipos. Efeito aditivo das substâncias rutina e genistina foi observado nos tratamentos R<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> e 'IAC-100', representado por uma desestruturação do IM bastante evidente.

**Palavras chave:** soja, lagarta-da-soja, rutina, genistina, efeito aditivo.

## 5.1. INTRODUÇÃO

A resistência de plantas, quando resultante de fatores químicos, é em geral devido à metabólitos secundários presentes na planta (KUBO & HANKE 1986). Sendo assim, a detecção, o isolamento e a caracterização dessas substâncias de defesa naturalmente presentes nas plantas, fornece importantes informações para o desenvolvimento de genótipos resistentes a pragas ou doenças responsáveis pela redução na produção agrícola. Apesar de diversas substâncias de defesa terem sido caracterizadas, o modo de ação no organismo da grande maioria ainda permanece desconhecido (BILLINGSLEY & LEHANE, 1996).

Dentre os metabólitos secundários presentes nas plantas hospedeiras, e que estão relacionadas a defesa da planta estão os flavonóides (KUBO & HANKE 1986). O flavonól rutina (quercitina 3-*O*-rutinosídeo), reconhecido por atuar na proteção de plantas a lepidópteros (GAZZONI et al. 1997; HOFFMANN-CAMPO et al. 2001, 2006; PIUBELLI et al. 2006) e a isoflavona genistina (genisteína 7-*O*- $\beta$ -D-glicosídeo), foram identificados em extratos foliares de PI 227687 e PI 274454 ((HOFFMANN-CAMPO 1995; PIUBELLI et al. 2005), genótipos que apresentam moderada resistência a insetos. O efeito destes compostos no organismo dos insetos ainda não está esclarecido, mas estudos indicam o intestino médio (IM) como principal local de atuação.

O sistema digestivo nos insetos, bem como nos demais seres vivos heterotróficos, tem a função de hidrolizar o alimento consumido na forma de macromoléculas complexas e transformá-lo em moléculas mais simples, capazes de serem absorvidas pelo organismo (MEYER, 2006). É formado por um canal alimentar ou tubo digestivo, que percorre o corpo em sentido longitudinal desde a boca até o ânus. De modo geral, o canal alimentar compreende três regiões: intestino anterior ou estomodeu, o intestino médio ou mesêntero e o intestino posterior ou proctodeu (GALLO et al., 2002).

O intestino médio (IM), considerado o estômago funcional propriamente dito, é o local de síntese e secreção das enzimas digestivas (TERRA, 1990). Nesta região ocorre

a digestão e absorção dos alimentos, e é a principal via de acesso dos inseticidas químicos e biológicos (MOSCARDI & CARVALHO, 1993).

Em *A. gemmatalis* o IM é formado por um epitélio pseudoestratificado colunar, com pelo menos quatro tipos celulares distintos: células colunares, calciformes, regenerativas e endócrinas (LEVY 2004; LEVY et al. 2007). As células colunares, predominantes ao longo do epitélio, estão presentes em larvas de todos os insetos; a elas são atribuídas as seguintes funções: produção e secreção de enzimas digestivas, absorção de água e de nutrientes (BILLINGSLEY & LEHANE, 1996). As células calciformes são assim denominadas por apresentarem forma de cálices, são responsáveis pelo transporte ativo de íons de potássio da hemolinfa para o lúmen intestinal (KLEIN et al. 1991). As células regenerativas possuem a função de substituir células eliminadas, estas se desenvolvem em ninhos de regeneração e podem ser observadas sozinhas, em pares ou formando grupos na base do epitélio (MARANHÃO, 1978). As células endócrinas possuem funções semelhantes às células endócrinas do intestino dos vertebrados; são células neurosecretoras que sintetizam e liberam uma grande variedade de hormônios e polipeptídeos (MARTOJA & BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984). Além dos tipos celulares anteriormente citados, o epitélio apresenta uma membrana de revestimento, estrutura acelular denominada de membrana peritrófica cuja principal função é proteção do epitélio contra abrasão. São barreiras permeáveis às enzimas digestivas e produtos da digestão (MARTIN et al. 2006), além de atuar como barreira física a entrada de microorganismos (TERRA, 1990).

Embora existam estudos sobre a ação dos flavonóides na biologia e comportamento dos insetos, pouco se sabe sobre o modo de ação destas substâncias no sistema digestivo dos insetos. Portanto, o objetivo deste trabalho é verificar se há alterações morfológicas no epitélio do IM em *Anticarsia gemmatalis* em decorrência da ingestão da rutina e genistina, e de folhas de genótipos de soja, com e sem característica de resistência à insetos, que apresentam essas substâncias em sua constituição química.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram realizados nos laboratórios de Interação Inseto-Planta e Fitoquímica, da Embrapa Soja, Londrina-PR, no ano de 2007. Este trabalho foi dividido em dois experimentos, no primeiro dietas artificiais (GREENE et al. 1976, modificada por HOFFMANN-CAMPO et al. 1985), contendo os flavonóides foram oferecidas às lagartas e, no segundo, os insetos foram alimentados com folhas dos genótipos resistentes a insetos, PI 227687, PI 274454, 'IAC 100', 'Dowling' e o genótipo suscetível, 'BR 16'. Em ambos experimentos foram utilizadas lagartas provenientes do laboratório de criação de insetos da Embrapa Soja. Os insetos foram mantidos em câmaras climatizadas tipo B.O.D. sob condições controladas de temperatura  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade  $70 \pm 10\%$  UR e fotofase de 12h. Lagartas de 3<sup>o</sup> ínstar foram selecionadas para a análise morfológica que foi realizada no Departamento de Histologia da Universidade Estadual de Londrina.

### 5.2.1 Experimento 1

As lagartas foram alimentadas, desde a eclosão, em dietas artificiais contendo duas concentrações de rutina ( $R_1= 3,68\text{mg/g}$ ,  $R_2=7,36\text{mg/g}$ ), genistina ( $G_1=0,26\text{mg/g}$ ,  $G_2=0,52\text{mg/g}$ ) e a mistura das duas ( $R_1+G_1= 3,68\text{mg/g}+0,26\text{mg/g}$ ); dietas sem adição das substâncias foram consideradas controle. As menores concentrações de rutina e genistina ( $R_1$  e  $G_1$ ) utilizadas neste trabalho foram baseadas em concentrações obtidas por PIUBELLI et al. (2005) nos genótipos resistentes PI 227687 e PI 274454 respectivamente, para que houvesse um parâmetro de comparação essas quantidades foram dobradas, obtendo-se, assim, concentrações denominadas  $R_2$  e  $G_2$ .

### 5.2.2 Experimento 2

Para verificar possíveis alterações morfológicas no IM de *A. gemmatalis* causadas pelas substâncias químicas R e G *in natura*, foram utilizados os genótipos PI 227687 ( $R=0,3508 \text{ mg/g}$  e  $G=0,019 \text{ mg/g}$ ), PI 274454 ( $R=0,1477 \text{ mg/g}$  e  $G=0,015 \text{ mg/g}$ ), 'IAC 100' ( $R=0,0952 \text{ mg/g}$  e  $G=0,044 \text{ mg/g}$ ), 'Dowling' sem R, com a maior

concentração de G=0,058mg/g e 'BR 16' (sem R e G em baixa concentração (0,017 mg/g); utilizado como testemunha. Para obtenção das concentrações de rutina e genistina foi realizada extração, utilizando-se folhas do mesmo plantio e estágio das oferecidas as lagartas desde a eclosão.

### **5.2.3. Cultivo das plantas e preparo das amostras**

Os genótipos foram semeados em casa de vegetação em vasos de cinco litros, na quantidade de dez sementes por vaso, deixando após o desbaste, cinco plantas. Para o preparo das amostras, o 4<sup>o</sup> trifólio, oriundo de plantas do estágio V5, de cada genótipo foi retirado e levado ao laboratório de Fitoquímica. Depois de retirados os pecíolos, alíquotas de cada amostra (300 a 500 mg) foram pesadas e maceradas em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido, transferidas para tubos de vidro, onde foi adicionado uma solução aquosa com 80% de MeOH, no volume de 10 vezes a massa da amostra.

Os tubos foram levados ao ultrassom por 20 min para homogeneização e, posteriormente, as amostras foram filtradas, secas em nitrogênio gasoso, e ressolubilizadas em 1,5 ml de MeOH (80%). As amostras foram transferidas para tubos de amostrador automático e analisadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Performance - HPLC (Shimadzu).

### **5.2.4 Análises cromatográficas**

Alíquotas de 10µL do extrato foram injetadas em HPLC (marca Shimadzu, Prominence com controlador CBM-20A; detetor SPD-20A; degaseificador DGU 20A5; Bomba LC-20AT; auto sampler SIL-20A e forno CTO 20A). As análises realizadas em coluna de fase reversa C18 (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5 micra). A fase móvel foi composta de 2% de ácido acético (HOAc) -

solvente A e de uma mistura de metanol, ácido acético e água (MeOH:HOAc:H<sub>2</sub>O; 18:1:1) solvente B. O sistema inicial do gradiente linear foi 75% de A e 25% de B, atingindo aos 40 min, a situação inversa, ou seja, 25% de A e 75% de B. Aos 45 minutos, voltou à situação inicial, aí permanecendo por 5 min, antes da injeção da próxima amostra. O fluxo do solvente foi de 1 mL/ min. e a absorção de UV foi medida a 260nm. Os padrões de flavonóides utilizados foram rutina (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>; quercitina 3-*O*-raminoglicosídeo) e genistina (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>; genisteína, 7-*O*-β-D-glicosídeo), ambos da marca Sigma. Para a obtenção das áreas das substâncias padrões, sete concentrações de rutina (0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,32 e 0,64 mg/ml) e quatro de genistina (0,01, 0,02, 0,04 e 0,08 mg/mL) foram injetadas no HPLC, conforme descrito anteriormente. Com os valores das áreas das substâncias padrão e de suas respectivas concentrações, foi construído um gráfico de dispersão e a obtenção de uma equação de regressão linear. Após injeção das amostras, a área das substâncias rutina e genistina foi obtida, aplicando este valor na equação, obteve-se a concentração das substâncias (mg/mL) em cada genótipo. A concentração das substâncias em mg/g de folha foi obtida através da divisão da concentração obtida (mg/mL) pela massa da folha de cada genótipo, considerando o volume de ressolubilização.

### **5.2.3. Processamento do material para microscopia de luz**

As lagartas, após serem rapidamente limpas em álcool 70%, foram anestesiadas por resfriamento (0°C), por aproximadamente 5 min., e mantidas em gelo até a dissecação, realizada sob microscópio estereoscópico. As lagartas foram presas pelas extremidades, por alfinetes entomológicos, em placa de Petri, parcialmente preenchida com parafina, em seguida com o auxílio de uma tesoura oftalmológica, foi realizada uma incisão longitudinal ao longo da região ventral, o tegumento externo foi rebatido e preso com alfinetes entomológicos, e em seguida, retirou-se o tecido gorduroso e as traquéias, para facilitar a identificação e retirada do IM.

As porções do IM foram fixadas em solução de Bouin alcoólico (75ml de solução saturada de ácido pícrico; 25ml de formaldeído 40% e 5ml de ácido acético glacial), desidratados em séries crescentes de álcool (70% por 12h; 95% por 1 e 1/2h; álcool 100% por 2 e 1/2h), diafanizados em xilol (três banhos de 15 min.), infiltrados em paraplast (três banhos de 25 min. e um de 30min) e incluídos em paraplast. Os cortes de 7µm foram realizados com navalha de aço em micrótomo Leica, colocados em banho Maria (44°C) com gelatina em pó para distensão e para facilitar a adesão nas lâminas histológicas. Os cortes foram posteriormente corados com hematoxilina e eosina alcoólica, montadas em Bálsamo e fotografadas ao microscópio de luz Axiphot (Zeiss II).

### **5.3. RESULTADOS**

#### **5.3.1. EXPERIMENTO 1**

##### **5.3.1.1. Análise histológica do epitélio do IM de *A. gemmatalis* alimentadas com dietas contendo rutina e genistina**

###### A) Dieta artificial normal, sem adição de flavonóides.

Em larvas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta normal (DN), o IM era constituído (da luz para a periferia) pela membrana peritrófica, pela camada epitelial apoiada em uma membrana basal, e pela camada muscular, formada por feixes de músculos circulares e longitudinais (Fig. 1A). A parede exibia um epitélio pseudoestratificado prismático com bordadura estriada em sua porção apical, onde foi possível identificar três tipos celulares: as células colunares, calciformes e regenerativas, sem qualquer tipo de alteração (Fig. 1B).

As células colunares foram observadas em maior número, de forma prismática, com citoplasma basófilo, as vezes granuloso, com núcleo alongado situado no terço superior da célula. Na superfície livre das células colunares pode ser observada uma região mais acidófila, que constituía a bordadura estriada, típica em células absortivas (Fig. 1B). Raramente, foi possível observar pequenas protusões citoplasmáticas

desprendendo-se da bordadura estriada em direção ao espaço ectoperitrófico. As células caliciformes eram menos numerosas, sendo facilmente identificadas pela sua forma de cálice e pela presença de uma cavidade central, denominada de câmara caliciforme. No interior desta câmara, observou-se uma região bastante acidófila, semelhante à bordadura estriada das células colunares. Ainda notou-se um núcleo achatado, localizado na base celular (Fig. 1A e 1B). As células regenerativas apareceram em grupos, denominadas de ninhos de regeneração, ou isoladas. São células pequenas, arredondadas ou ovais, com citoplasma basófilo e núcleo central. Ainda foi possível observar a membrana peritrófica representada por uma membrana fina, acelular, de coloração basófila, revestindo e protegendo o epitélio. Esta membrana dividia o lúmen do IM em dois compartimentos: o espaço endoperitrófico, localizado entre a membrana peritrófica e a luz intestinal, e o espaço ectoperitrófico localizado entre a membrana peritrófica e o epitélio do intestino médio (Fig. 1A e 1B).

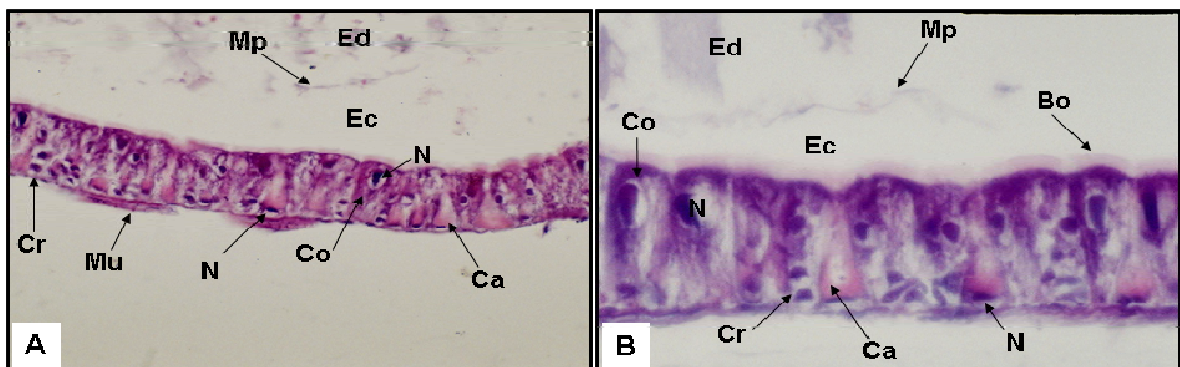


Fig. 1. Fotomicrografia do IM de *A. gemmatilis* alimentada de dieta normal: células colunares (Co), bordadura estriada (Bo), células caliciformes (Ca), células regenerativas (Cr), núcleo (N), membrana peritrófica (Mp), espaço endoperitrófico (Ed), espaço ectoperitrófico (Ec), camada muscular (Mu). Fig.s 1 A , aumento 250 vezes, 1B, aumento 500 vezes.

#### B) Alimentadas com dieta artificial contendo flavonóides

Tanto a rutina quanto a genistina afetam o IM; no entanto foram alterações focais, ou seja, com regiões de epitélio alterado em meio a outras íntegras (Figs. 2, 3, 4



e 5). Lagartas alimentadas de dietas com adição rotina sempre apresentaram mais alterações que as alimentadas com genistina, em qualquer concentração.

Os insetos alimentados com dieta R<sub>1</sub> apresentaram alterações evidentes na parede do IM. Porém, observou-se raros pontos de ruptura na lâmina basal e musculatura da parede, mas intensa desorganização celular e espaçamento intercelular. No entanto, essas alterações não foram detectadas em todo IM, mas em alguns pontos (Fig. 2A). As células colunares foram as mais afetadas, observando-se um o citoplasma mais vacuolizado e porções do citoplasma destas células sendo eliminadas em direção ao lúmen (Fig, 2A e 2B). Não houve alterações significativas nas células caliciformes e regenerativas, como também não observamos na membrana peritrófica (Fig.s 2A e B).

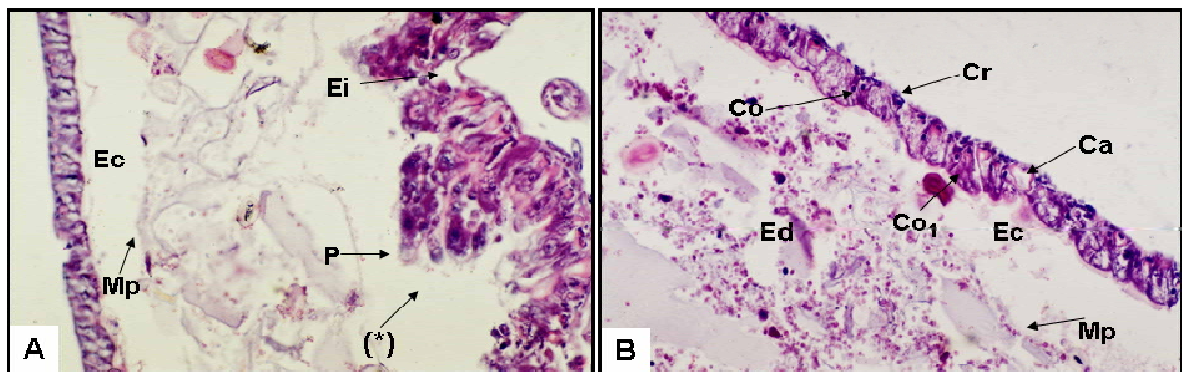


Fig. 2. Fotomicrografia do IM de *A. gemmatalis* alimentada de dieta R<sub>1</sub>: células colunares (Co), células caliciformes (Ca), células regenerativas (Cr), membrana peritrófica (Mp), espaço endoperitrófico (Ed), espaço ectoperitrófico (Ec). Notar a desestruturação da parede (\*), aumento do espaçamento intercelular (Ei), células colunares alteradas (Co<sub>1</sub>) e porções citoplasmáticas (P). Aumento figura 250 vezes.

As alterações detectadas em R<sub>1</sub> foram mais brandas que as observadas em R<sub>2</sub>. Nessa maior concentração (R<sub>2</sub>), os vazios citoplasmáticos foram observados com maior frequência, bem como fragilidade das junções celulares culminando no aumento do espaçamento intercelular (Fig. 3). As células colunares sempre foram as mais afetadas, mostrando rarefação citoplasmática, intensa atividade secretora com liberação grande parte do conteúdo celular, incluindo núcleo (Figura 3A). As células caliciformes não sofreram aparentes alterações; já nas células regenerativas observou-se uma

proliferação atípica, aumentando a regeneração celular. A lâmina basal e a camada muscular também foram alteradas, levando a uma fragmentação da parede do IM (Fig. 3B).

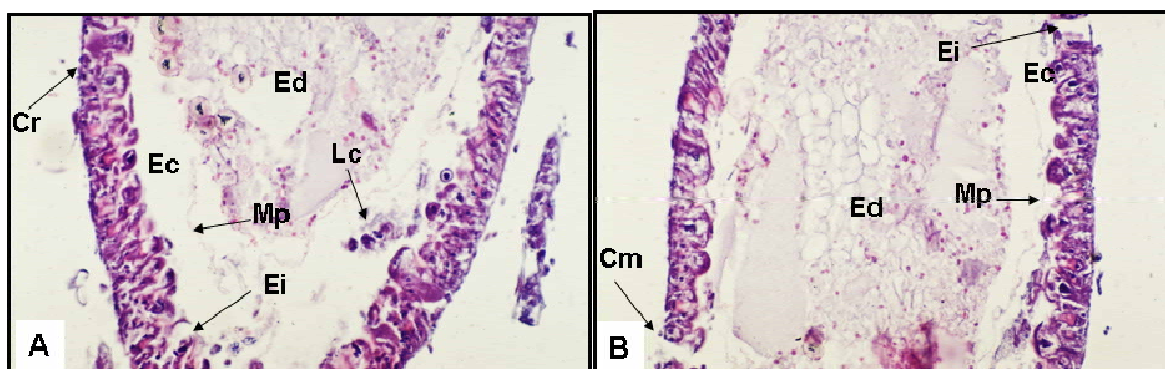


Fig. 3. Fotomicrografia do IM de *A. gemmatilis* alimentada de dieta  $R_2$ : grande espaço intercelular (Ei), liberação de conteúdo citoplasmático das células colunares (Lc), ruptura da camada muscular (Cm). Células regenerativas (Cr), membrana peritrófica (Mp), espaço endoperitrófico (Ed), espaço ectoperitrófico (Ec). Aumento figura 250 vezes.

O IM apresentou poucas alterações, e raramente detectou-se desestruturação de sua parede, quando as lagartas se alimentaram em dieta artificial contendo a menor concentração de genistina ( $G_1$ ). Assim como se observou algumas regiões epiteliais alteradas também foram visualizadas outras praticamente íntegras (Fig. 4A). Embora em menor proporção, quando comparadas com o flavonól rutina ( $R_1$  e  $R_2$ ), o isoflavonóide genistina também afetou as células colunares. Essas alterações podem ser representadas por um citoplasma mais rarefeito e pelo aumento de protusões citoplasmáticas (Fig. 4B). Nenhuma alteração foi detectada nas células calciformes, regenerativas e na membrana peritrófica das lagartas alimentadas com dieta contendo  $G_1$  (Fig. 4).

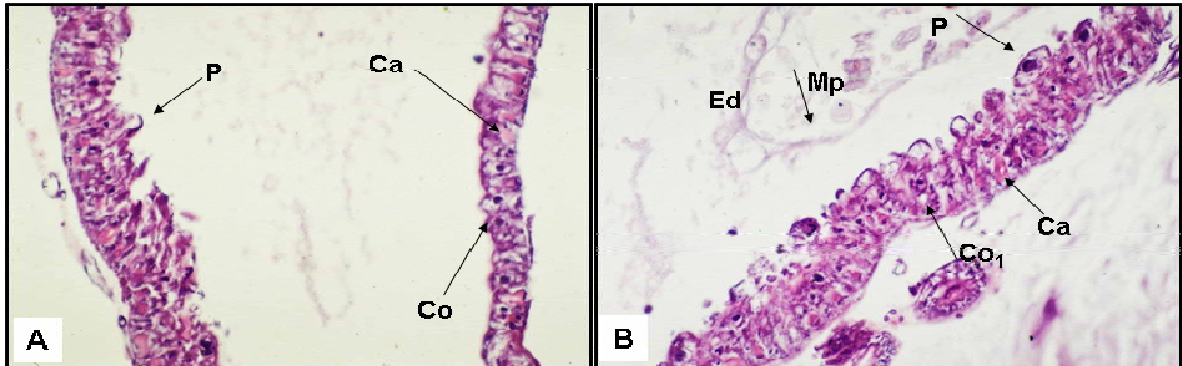


Fig. 4. Fotomicrografia do IM de *A. gemmatalis* alimentada de dieta  $G_1$ . Notar desestruturação epitelial com células colunares alteradas ( $Co_1$ ) e liberação de protusões (P). Células colunares (Co), células caliciformes (Ca), células regenerativas (Cr), membrana peritrófica (Mp), espaço endoperitrófico (Ed), espaço ectoperitrófico (Ec). Aumento figura 250 vezes.

No IM de insetos que consumiram dieta com maior concentração de genistina ( $G_2$ ), notou-se maior número de protusões citoplasmáticas quando comparadas a  $G_1$ , e aumento de células regenerativas. As células caliciformes e a membrana peritrófica não apresentaram alterações aparentes. (Fig. 5).

Alterações epiteliais intensas foram observadas ao longo de grande parte do IM dos insetos alimentados com dieta artificial contendo  $R_1+G_1$  (Fig. 6). Desestruturação da parede do IM foi observada, sendo, evidenciadas por nítidos vazios citoplasmáticos, aumento do espaçamento intercelular e intensa atividade secretora, com liberação de parte do conteúdo celular (Fig. 6A). Contração celular, separação das células vizinhas foram características observadas, que sugerem que neste tratamento algumas células epiteliais entraram em apoptose (Fig. 6B). Porém estas estruturas somente podem ser comprovadas através de microscopia eletrônica. As células regenerativas foram detectadas em intensa atividade mitótica. Em geral, as células caliciformes e a membrana peritrófica não foram afetadas (Fig. 6).

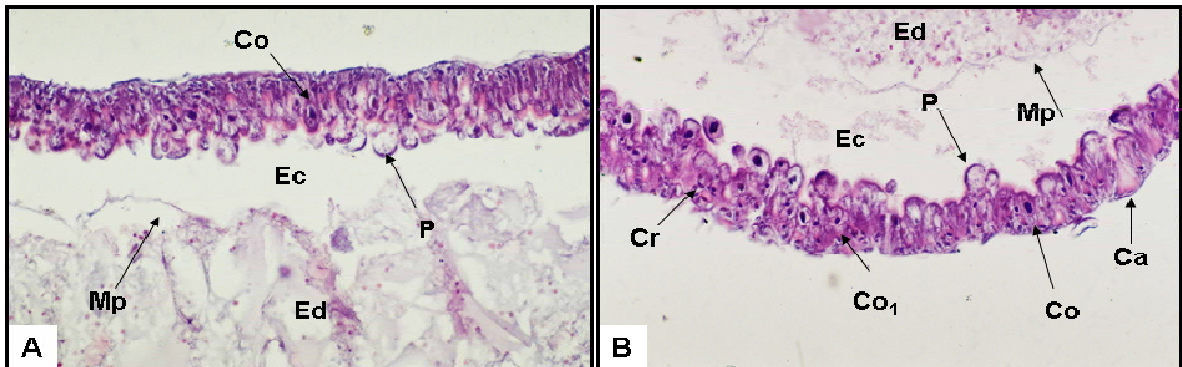


Fig. 5. Fotomicrografia do IM de *A. gemmatalis* alimentada de dieta G<sub>2</sub>. Notar células colunares alteradas (Co<sub>1</sub>) em meio a células colunares (Co) saudáveis e grande quantidade de protusões citoplasmáticas (P). Células caliciformes (Ca), células regenerativas (Cr), membrana peritrófica (Mp), espaço endoperitrófico (Ed), espaço ectoperitrófico (Ec). Aumento figura 250 vezes.

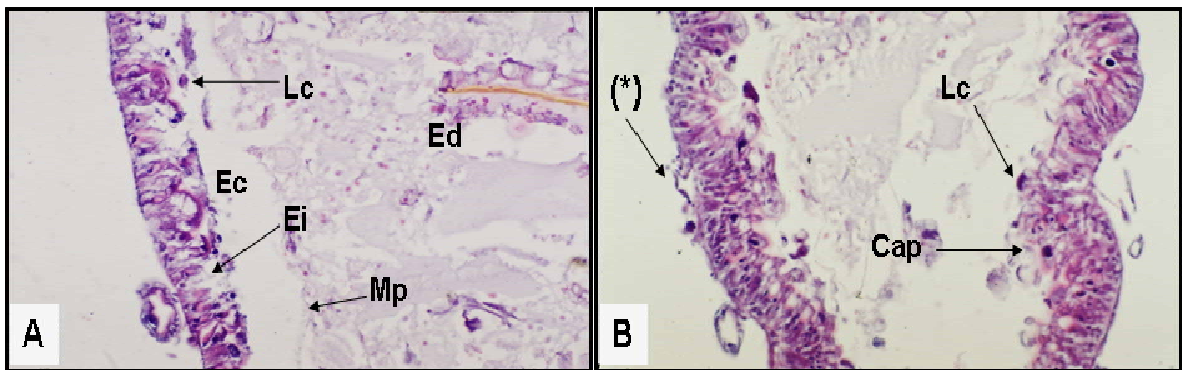


Fig. 6. Fotomicrografia do IM de *A. gemmatalis* alimentada de dieta R+G: Notar aumento do espaço intercelular (Ei), rompimento da lamina basal (\*), liberação de conteúdo celular (Lc), células apoptóticas (Ap). Membrana peritrófica (Mp), espaço endoperitrófico (Ed), espaço ectoperitrófico (Ec), células apoptóticas (Cap). Aumento figura 250 vezes.

### 5.3.2. EXPERIMENTO 2

#### 5.3.2.1. Análise histológica do epitélio do IM de *A. gemmatalis* alimentadas de diferentes genótipos com característica de resistência

As alterações sofridas pela parede do IM em lagartas alimentadas com os genótipos de característica resistente foram muito semelhantes às detectadas no

experimento 1. Dependendo do genótipo utilizado, estas modificações estruturais apresentaram maior ou menor grau de intensidade e, em pontos focais, ao longo do intestino. Novamente, como no experimento 1, as células colunares foram as mais atingidas; já as células caliciformes e regenerativas não mostraram modificações morfológicas aparentes.

Apesar de ser um genótipo suscetível a pragas, lagartas alimentadas de 'BR-16' apresentaram algumas alterações ao longo do epitélio do IM, como desarranjo na sua estrutura e espaçamento entre as células. Entre as células, as colunares também foram as mais afetadas apresentando um aumento na liberação de protusões citoplasmáticas em direção ao espaço ectoperitrófico (Fig. 7).

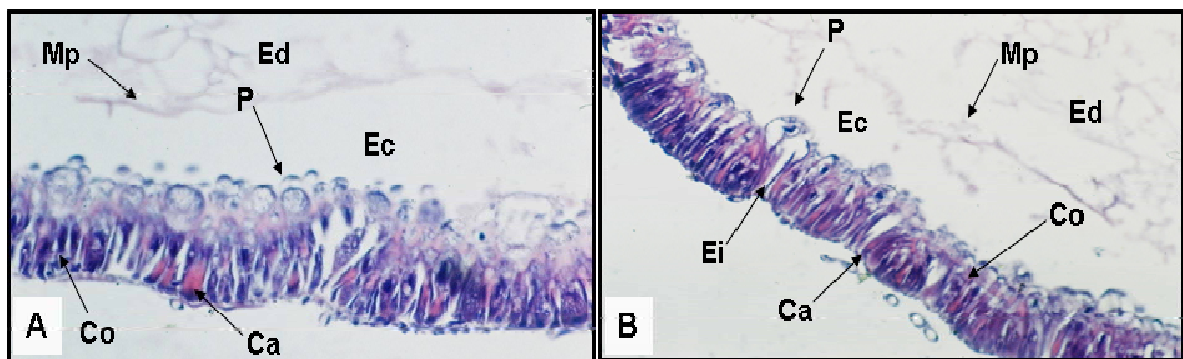


Fig. 7. Fotomicrografia do IM de *A. gemmatilis* alimentada com 'BR-16' com poucas modificações na parede intestinal. Notar aumento do espaço intercelular (Ei) e protusões citoplasmáticas (P). Células colunares (Co), células caliciformes (Ca), membrana peritrófica (Mp), espaço endoperitrófico (Ed), espaço ectoperitrófico (Ec). Aumento 250 vezes

No genótipo PI 227687, com maior concentração de rutina em sua constituição e uma das menores concentrações de genistina, a parede do IM mostrou-se, em geral, muito alterada com desprendimento do epitélio da lamina basal (Fig. 8B); no entanto havia locais com características normais (Fig. 8A). Entre as células epiteliais, as colunares foram muito afetadas (Fig. 8B), com intensa liberação das protusões citoplasmáticas (Fig. 8) em comparação ao 'BR-16' (Fig 7A e 7B).

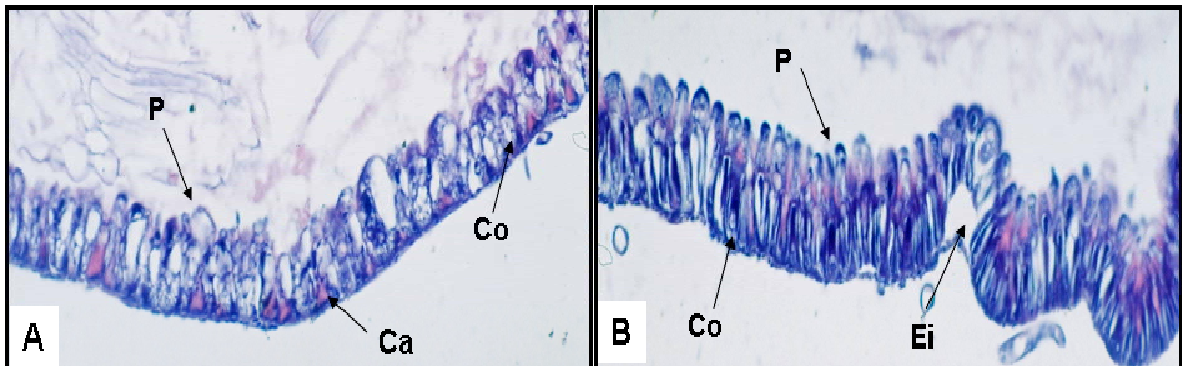


Fig. 8. Fotomicrografia do IM de *A. gemmatalis* alimentada com PI 227687. A- Epitélio com poucas alterações morfológicas. B- Desprendimento do epitélio (Ei), protusões citoplasmáticas (P). Células colunares (Co), células caliciformes (Ca), liberação do conteúdo celular (Lc). Aumento 250 vezes.

Nos insetos alimentados do genótipo 'IAC100', que contém menor concentração de rutina que a PI227687, mas uma das maiores concentrações de genistina, o IM apresentou alterações ainda mais evidentes que PI 227687 (Fig. 9). Houve intensa liberação de protusões citoplasmáticas, algumas delas contendo núcleos celulares e grande espaçamento intercelular. Entre as células epiteliais, as colunares foram as mais afetadas, com citoplasma bastante vacuolizado (Fig. 9); já as células caliciformes e regenerativas não apresentaram alterações aparentes.

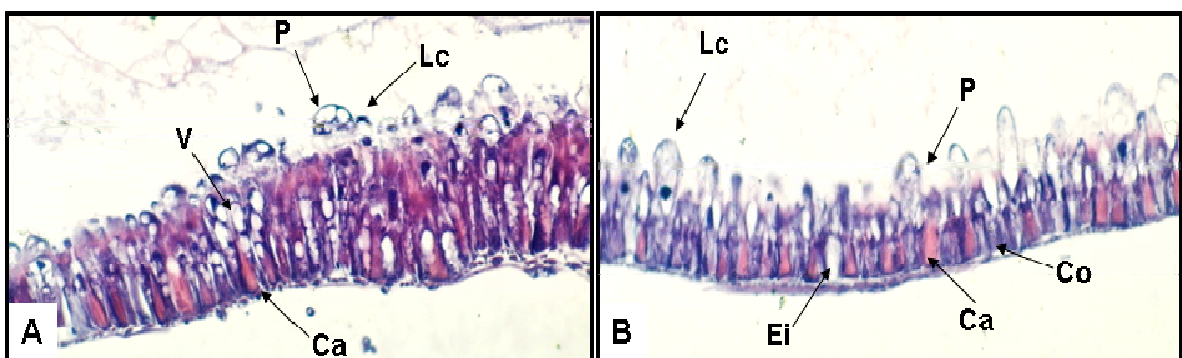


Fig. 9. Fotomicrografia do IM de *A. gemmatalis* alimentada com 'IAC100'. Liberação de conteúdo celular (Lc), epitélio com vacúolos citoplasmáticos (V) e espaço intercelular (Ei), células colunares (Co), células caliciformes (Ca). Aumento 250 vezes

Em lagartas alimentadas com PI 274454, com  $R=0,1477$  e a menor concentração de genistina  $G=0,015$ , observou-se alterações discretas no epitélio do IM, sendo aparentemente este o genótipo que menos alterou o IM de *A. gemmatalis* (Fig. 10).

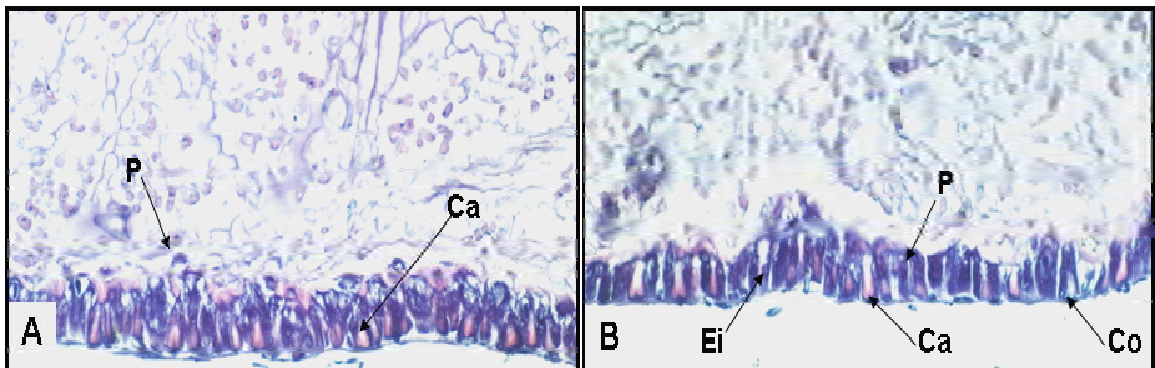


Fig. 10. Fotomicrografia do IM de *A. gemmatalis* alimentada com PI 274454. Espaçamento intercelular (Ei), protusões citoplasmáticas (P), células colunares (Co), células caliciformes (Ca). Aumento 250 vezes

As lagartas que consumiram 'Dowling' (ausência de rutina e maior concentração de genistina), apresentaram o epitélio do IM mais afetado, quando comparados com os que se alimentaram de PI274454 e 'BR-16', apresentando maior número de protusões citoplasmáticas e espaçamento entre as células (Fig.11).

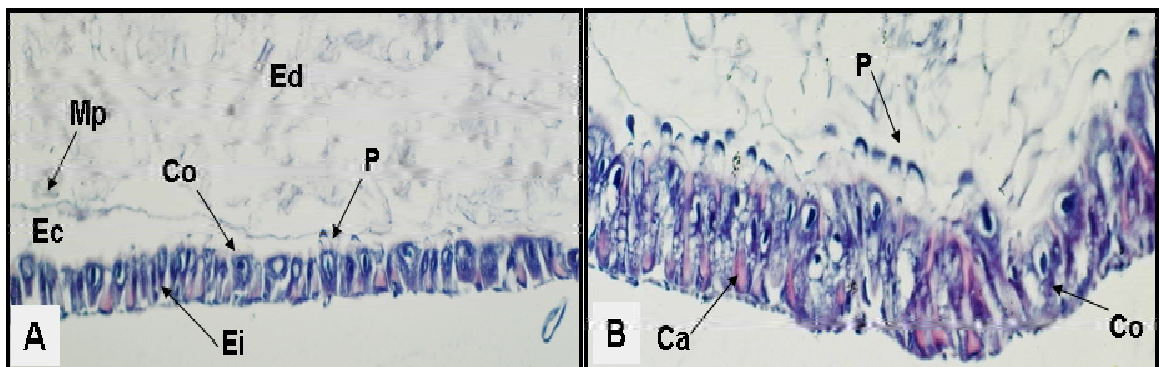


Fig. 11. Fotomicrografia do IM de *A. gemmatalis* alimentada com 'Dowling'. Células colunares (Co), células caliciformes (Ca), membrana peritrófica (Mp), espaço endoperitrófico (Ed), espaço ectoperitrófico (Ec), aumento do espaço intercelular (Ei) e protusões citoplasmáticas (P). Aumento 250 vezes.

#### 5.4. DISCUSSÃO

As alterações morfológicas ocorridas no IM foram bastante semelhantes nos dois experimentos testados, ou seja, em lagartas alimentadas com dieta artificial e naquelas que ingeriram folhas de soja. O que diferenciou um tratamento do outro foi à intensidade destas alterações morfológicas, variando de modificações brandas como um ligeiro aumento na liberação de protusões citoplasmáticas, até as alterações mais intensas como o rompimento da parede do IM. Outro aspecto bastante interessante foi que as modificações morfológicas ao longo do IM foram focais, isto é, havia regiões muito alteradas nas proximidades de locais sadios.

As alterações ao longo do epitélio do IM foram mais evidentes nas lagartas que consumiram dietas com adição de rutina, comparadas com as que ingeriram genistina. Já em insetos alimentados com dieta contendo as duas substâncias em menor concentração ( $R_1+G_1$ ), a intensidade de reação foi ainda maior. Entre os genótipos estudados este fato também foi observado. Folhas de 'IAC100', genótipo que contém concentrações intermediárias de rutina e uma das maiores concentrações de genistina, provocaram maior efeito nas células epiteliais do IM. Alterações semelhantes pela ingestão de aleloquímicos também foram observadas por outros autores. RHARRABE et al (2007) observaram que  $\beta$ -carbonilas identificadas em *Peganum harmala*, causaram severa citotoxicidade nas células epiteliais do intestino médio em lagartas de 4º instar de *Plodia interpunctella*, como intensa vacuolização citoplasmática, ruptura e fragmentação celular. A ativação dos compostos fenólicos ocorre por oxidação e os radicais de hidroxila formados durante o processo possuem ação tóxica, sendo responsáveis pela ruptura da integridade da membrana e por distúrbios de metabolismo no epitélio intestinal do inseto (APPEL 1994), como observado neste estudo, reduzindo assim, as condições de extração e absorção de nutrientes.

No presente estudo, dentre as às células epiteliais, as colunares sempre foram as mais afetadas ao longo do IM. As alterações mais expressivas detectadas foram intensa vacuolização citoplasmática, aumento na formação de protusões citoplasmáticas, rupturas da membrana apical, indicando a diminuição na absorção de



nutrientes. Estes resultados confirmam os obtidos por LEVY (2005), que ao estudar o tubo digestivo de *A. gemmatalis* resistentes e suscetíveis ao baculovírus encontrou maior variabilidade nas células colunares, neste caso causado pelo vírus. Protusões citoplasmáticas sendo liberadas do epitélio em direção ao lúmen foram observadas em todos os tratamentos. Estas estruturas, conhecidas e descritas desde o século XIX, não têm a sua função ainda bem definida. Segundo ANDERSON & HARVEY (1966), as protusões podem estar associadas às células colunares e são manifestações de processo de secreção apócrina. O papel destas protusões na secreção de enzimas foi contestado por DAY & POWNING (1949), citado por JIMENEZ & GILLIAM (1990). Liberação de protusões com processo de degeneração celular, tanto entre as ecdises quanto na metamorfose sofridas pelos insetos, foi observado em *Calliphora erythrocephala* (De PRIESTER, 1971). Além disso, a formação de protusões pode ocorrer devido à ingestão de substâncias nocivas ou mesmo por infecção por microorganismos, garantindo a limpeza do epitélio de células doentes e lesadas (BROOKS et al 2002). Este processo é caracterizado ultraestruturalmente por vesiculação do RER, desaparecimento de complexo de Golgi, aumento no número e volume de vacúolos autofágicos e corpos residuais, além da rarefação do citoplasma (MARTOJA & BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984).

As células caliciformes tanto de lagartas alimentadas com dietas com adição de flavonóides quanto em insetos que consumiram folhas de genótipos com característica de resistência não apresentaram variações morfológicas. Já nas células regenerativas detectou-se um ligeiro aumento na sua atividade mitótica em insetos alimentados com dietas com rutina e genistina em maior concentração. ARRUDA et al (2003) estudando a ação do extrato etanólico da casca do tronco de *Magonia pubescens* em larvas de *Aedes aegypti*, também observaram intensa proliferação de células regenerativas. Segundo CRUZ-LANDIM et al (1996), esse processo também pode estar relacionado à duração do ciclo biológico dos insetos; aqueles que apresentam ciclo de vida longo apresentam menor quantidade. Em holometábolos cujo desenvolvimento é rápido, as células regenerativas são encontradas em maior quantidade, devido à necessidade de uma rápida renovação celular.

As células endócrinas não foram consideradas neste estudo devido à dificuldade de identificá-las através da microscopia de luz, sendo necessária a utilização de técnicas mais específicas para sua identificação.

A membrana peritrófica, composta por quitina, proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos (LEHANE, 1997), não foi alterada em nenhum dos tratamentos. Segundo LEHANE (1997), esta estrutura protege insetos herbívoros dos aleloquímicos tóxicos das plantas, através da ligação ao material tóxico; em *Schistocerca gregaria* cerca de 30% dos taninos com potencial tóxico ingeridos em suas dietas estão ligados à membrana e são excretados junto dela. Em *Spodoptera litura*, aproximadamente 50% de rutina consumida em dieta artificial foram eliminadas através da excreta (GHUMARE et al. 1989). O fato de o inseto excretar parte da rutina ingerida, indica que possivelmente a dose letal necessária para causar alterações na sua biologia é ainda menor.

Outro aspecto a considerar, é que a ação dos flavonóides no metabolismo dos insetos pode estar relacionada à degradação de lipídios. PIUBELLI (2004), ao estudar porcentagem de lipídios acumulada nas pupas de *A. gemmatalis*, observou menor quantidade de lipídios em pupas provenientes de lagartas que se alimentaram de dieta contendo rutina. Portanto, a integridade da membrana peritrófica está provavelmente relacionada à ausência de lipídios em sua constituição. Este fato também pode explicar a desestruturação das microvilosidades das células colunares, uma vez que, a membrana celular é composta de lipídeos.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem um efeito aditivo de rutina e genistina. Lagartas alimentadas com dietas  $R_1+G_1$  e folhas do genótipo 'IAC100', apresentaram maior desestruturação das células do epitélio do IM quando comparadas a insetos que se alimentaram com dietas com apenas rutina ou genistina, de forma isolada, e com genótipos que possuem em sua constituição somente uma dessas substâncias. Apesar dos flavonóides apresentarem efeitos pós-ingestivos evidentes, este estudo é o primeiro a abordar o modo de ação desses compostos no IM de *A. gemmatalis*. Ensaio como os realizados indicam várias alterações estruturais; no

entanto, estudos morfológicos histoquímicos e ultraestruturais serão necessários para o melhor entendimento da atuação dos flavonóides no trato intestinal da lagarta-da-soja.

## 5.5. REFERÊNCIAS

ANDERSON, E.; HARVEY, W.R. Active transport by the cecropia midgut, fine structure of midgut epithelium. **J. Cell Biol.**, v. 31, 107-134, 1966

APPEL, H.M. The chewing herbivore gut lumen: Physicochemical condition and then impact on plant nutrients, allelochemicals and insect pathogens. p. 209–223, In: E. A. BERNAYS (ed.) **Insect–Plant Interactions**, 1994.

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.C; SILVA, I.G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, p. 17-25, 2003.

BILLINGSLEY, P.F.; LEHANE, M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut, In: LEHANE, M.J; BILLINGSLEY, P.F. (Eds). **Biology of the Insect Midgut**. Londres: Chapman & Hall, 1996, p.3-30.

BROOKS, E.M.; GORDON, K.H.J.; DORIAN, S.J. Infection of its lepidopteran host by the *Helicoverpa armigera* stunt virus (Tetraviridae). **J. Inv. Pathol.**, v. 80, p.97-111, 2002.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA de MORAES, R.L.M.; SERRÃO, J.E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera: Apidae). **J. Comp. Biol.** v.1, p. 29-40, 1996.

De PRIESTER, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Calliphora erythrocephala*. **J.Ultrastruct. Res.** v.36, p.783-805, 1971.

GALLO, D.; NAKANO O.; NETO S.S.; CARVALHO R.P.L.; BATISTA G.C.; FILHO E.B.; PARRA J.R.P.; ZUCCHI R.A.; ALVES S.B.; VENDRAMIM J.D.; MARCHINI L.C.; LOPES J.R.S.; OMOTO C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, FEALQ, 2002. 920p.

GAZZONI, D. L.; HULSMAYER, A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.. Efeito de diferentes doses de rutina e quercitina na biologia de *Anticarsia gemmatalis*. **Pesqu. Agropecu. Bras.** v. 32, p. 673- 681, 1997.

GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A.. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **J. Econ. Entomol.** v. 69, p. 487-488, 1976.

GHUMARE, S.S.; MUKHERJEE, S.N.; SHARMA, R.N. Effect of rutin on the neonate sensitivity, dietary utilization and midgut carboxylesterase activity of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). **Proc. Indian Acad. Sci.** v. 98, p. 399-404, 1989.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA E.B.; MOSCARDI F. **Criação massal da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis***. EMBRAPA-CNPSO, Documentos 10, 23p, 1985.

HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. 165 p. PHD. Dissertation, The University of Reading, Reading, UK.

HOFFMANN-CAMPO, C.B., HARBONE, J.B. & MCAFFERY, A.R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomol. Exp. Applic.** v.98., p. 181-194, 2001.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; RAMOS NETO J.A; OLIVEIRA M.C.; OLIVEIRA L.J. Detrimental effect of rutina on *Anticarsia gemmatalis*., **Pesqu. Agropecu. Bras.** v.41, p. 1453-1459, 2006.

JIMENEZ, D.R. & GILLIAM, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. **Cell. Tissue Res.** v. 261, p. 431-443, 1990.

KLEIN, U.; LOFFELMANN, G., WIECZOREC, H. The midgut as a model system for insect K<sup>+</sup> transporting epithelia: immunocytochemical localization of a vacuolar-type H<sup>+</sup> pump. **J. Exp. Biol.** v.161, p.61-75,1991.

KUBO, I. & F.G. HANKE. Chemical methods for isolating and identifying phytochemicals biologically active in insects. In: MILLER, J.R.; MILLER, T.A. (eds.), **Insect-plant interactions**. New York, Spring-Verlag, p. 225-249, 1986 ,374p.

LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. **Ann. Rev. Entomol.** v. 42, p. 525-550, 1997.

LEVY, S.M.; FALLEIROS, A.M.F; GREGÓRIO, E.A.; ARREBOLA, N.R. & TOLEDO, L.A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): lighth and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Braz. J. Biol.** v. 64, p. 633-638, 2004.

LEVY, S.M. **Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovírus (AgMNPV): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio.** 2005, 172p. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LEVY, S. M.; FALLEIROS, A. M. F.; MOSCARDI, F.; GREGÓRIO, E. A. Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): Structural study of the peritrophic membrane. **J. Invertebr. Pathol.** v. 96, p. 183-186, 2007.

MARTIN, G.G.; SIMCOX, R.; NGUYEN, A.; AMAIAK, C. Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: structure, formation and permeability, **Biol. Bull.** 211: 275-285, 2006.

MARTOJA, R.; BALLAN DUFRANÇAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: KING, R.C.; AKAI, H. (Eds). **Insect Ultrastructure**. New York: Plenum Press, v.2, p.119-261,1984.

MEYER, J. Insect physiology IN: **General Entomology**. Disponível em: [http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/library/tutorials/internal\\_anatomy/digestive.html](http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/library/tutorials/internal_anatomy/digestive.html)  
Acessado em: 15/12/2007.

MOSCARDI F.; CARVALHO, R.C.Z. Consumo e utilização de por *Anticarsia gemmatalis* Hub. (Lepidoptera:Noctuidae) infectada, em diferentes estádios larvais, por seu vírus de poliedrose nuclear. **An. Soc. Entomol. Bras.** v.22, p. 267-280, 1993.

PIUBELLI, G.C. **Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais**. 2004. 152p. Tese Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

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*?. **J. Chem. Evol.** v. 31, p. 1515-1531, 2005.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. de Baculovirus-resistant *Anticarsia gemmatalis* responds differently to dietary rutin. **Entomol. Exp. Appl.** v. 119, p. 53-60, 2006.

RHARRABE, K.; BAKRIM, A.; GHAILANI, N.; SAYAH, F. Bioinsecticidal effect of harmaline on *Plodia interpunctella* development (Lepidoptera: Pyralidae) **Pesticide Biochem. Physiol.** [v. 89](#), p. 137-145, 2007.

TERRA, W.R. Evolution of digestive systems of insects. **Annu. Rev. Entomol.** v. 35, p. 181-200, 1990.



## IMPLICAÇÕES

- 1- Dietas nutricionalmente desbalanceadas (com baixa concentração ou sem adição caseína), podem acentuar o efeito do flavonol rutina;
- 2- Tanto a rutina quanto a genistina estão relacionadas à defesa da soja a insetos, ressaltando a importância da manutenção desses compostos em cultivares de soja;
- 3- Em dieta artificial ou em genótipos de soja contendo rutina e genistina observou-se efeito aditivo entre as substâncias;
- 4- Entre os genótipos avaliados, PI227687 possui a maior concentração de rutina e a cultivar 'Dowling' apresentou maior concentração de genistina;
- 5- As concentrações intermediárias de rutina e uma das maiores concentrações de genistina observadas em 'IAC-100', e os dados da biologia e fisiologia de *A. gemmatalis* nesta cultivar indicam que sua resistência a insetos pode estar relacionada a essas substâncias;
- 6- Alterações morfológicas mais intensas nas células epiteliais do intestino médio, foram observadas em lagartas alimentadas com dietas contendo maior concentração de rutina ( $R_2$ ) e dietas com adição de  $R_1+G_1$ ;
- 7- Dentre os genótipos estudados, PI227687 e 'IAC-100' foram os que mais afetaram a biologia do inseto, além de provocarem maiores alterações morfológicas no IM de *A. gemmatalis*;
8. Dos genótipos testados, 'IAC-100' e PI 227687 apresentaram características de resistência mais acentuadas a *A. gemmatalis*;