

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FATORES E MECANISMOS QUE INFLUENCIAM A
RESISTÊNCIA EM SOJA A *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER
E *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)**

**Bruno Henrique Sardinha de Souza
Biólogo**

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**FATORES E MECANISMOS QUE INFLUENCIAM A
RESISTÊNCIA EM SOJA A *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER
E *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)**

Bruno Henrique Sardinha de Souza

Orientador: Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Michael Joseph Stout

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

2014

S729f Souza, Bruno Henrique Sardinha de
Fatores e mecanismos que influenciam a resistência em soja a
Anticarsia gemmatalis Hübner e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) /
Bruno Henrique Sardinha de Souza. -- Jaboticabal, 2014
viii, 142 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Arlindo Leal Boiça Júnior

Coorientador: Michael Joseph Stout

Banca examinadora: José Djair Vendramim, Valter Arthur,
Francisco Jorge Cividanes, Ricardo Antonio Polanczyk

Bibliografia

1. Antibiose. 2. Antixenose. 3. Enzimas oxidativas. 4. Flavonoides.
5. Inibidor de tripsina. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.9:595.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: FATORES E MECANISMOS QUE INFLUENCIAM A RESISTÊNCIA EM SOJA A
Anticarsia gemmatilis HÜBNER E Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH)

AUTOR: BRUNO HENRIQUE SARDINHA DE SOUZA

ORIENTADOR: Prof. Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MICHAEL J. STOUT

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA
(ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. JOSÉ DJAIR VENDRAMIM

USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / Piracicaba/SP

Prof. Dr. VALTER ARTHUR

USP / Centro de Energia Nuclear na Agricultura / Piracicaba/SP

Prof. Dr. FRANCISCO JORGE CIVIDANES

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 28 de novembro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BRUNO HENRIQUE SARDINHA DE SOUZA – Filho de Wilson José de Souza e Maria Shirley Sardinha de Souza, natural de Araçatuba, SP, nascido no dia 28 de novembro de 1984. Graduado no curso de Ciências Biológicas, modalidade em Licenciatura, pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – FEIS, no ano de 2008. Durante a graduação, realizou estágios nas áreas de Entomologia Veterinária por um ano, trabalhando com ecologia e taxonomia de besouros coprófagos, e em Entomologia Agrícola durante dois anos, trabalhando com resistência de plantas a insetos e manejo integrado de pragas. Em março de 2010, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Entomologia Agrícola pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, SP, atuando em pesquisas em resistência de plantas a insetos e inseticidas botânicos, sob orientação do Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Aprovado na seleção de Doutorado na mesma instituição, com início em agosto de 2011, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, e orientado novamente pelo Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior. Durante o curso de Doutorado, realizou estágio sanduíche em Louisiana State University – LSU, em Baton Rouge, LA, EUA, entre julho e dezembro de 2013, sob supervisão do Prof. Dr. Michael Joseph Stout, com auxílio do Programa Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE/CAPES. Atualmente, realiza pós-doutorado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, conduzido na FCAV/UNESP e LSU, na linha de pesquisa de resistência constitutiva e induzida em plantas ao ataque de insetos.

Dedico

Aos meus pais, irmã e sobrinho,
Wilson José de Souza e Maria
Shirley Sardinha de Souza,
Andressa Maira Sardinha de
Souza e Guilherme de Souza
Pansani, pelo amor, incentivo e
apoio, imprescindíveis para
minha chegada até aqui.

Ofereço

À minha mulher, Bruna Bazzon
Devasio, por todo amor,
carinho e cumplicidade, e ao
nosso filho, Pietro Bazzon
Sardinha, que nos presenteou
este ano e completou nossa
família. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, e ao Departamento de Fitossanidade, pela oportunidade de cursar a Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), em uma das melhores escolas do país.

Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior, pela oportunidade de trabalho desde o início, por toda confiança depositada em mim, por sua excelente orientação prestada, e por todos os conhecimentos transmitidos durante todos esses anos, os quais foram imprescindíveis para a minha formação profissional e pessoal.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola, pelos ensinamentos transmitidos durante suas respectivas disciplinas, os quais foram fundamentais para o meu crescimento profissional: Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior (Resistência de Plantas a Pragas e Fisiologia dos Insetos), Prof. Dr. Antonio Carlos Busoli (Manejo Integrado de Artrópodes Pragas), Prof^a. Dr^a. Nilza Maria Martinelli (Morfologia de Insetos), Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli (Biologia dos Insetos), Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk (Controle Microbiano de Artrópodes Pragas), Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes (Controle Biológico de Artrópodes Pragas), Prof. Dr. Júlio Cesar Galli (Controle Químico e Seletividade para Artrópodes), Prof. Dr. Francisco Jorge Cividanes (Ecologia e Etologia dos Insetos), Prof. Dr. Marcelo da Costa Ferreira (Tecnologia de Aplicação de Produtos Fitossanitários), Prof. Dr. José Carlos Barbosa (Métodos Estatísticos Aplicados à Entomologia), Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos e Prof. Dr. Pedro Luiz Martins Soares (Nematologia Agrícola).

Ao Prof. Dr. Michael Joseph Stout, de Louisiana State University – LSU, Department of Entomology, pela oportunidade de realização do estágio sanduíche, ensinamentos, e contribuição na condução e qualidade desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, e seu orientado MSc. Bruno Perlatti, pelas análises quantitativas dos flavonoides em soja.

À Prof^a. Mara Cristina Pessoa da Cruz, do Departamento de Solos e Adubos da FCAV/UNESP, pelas análises de macro e micronutrientes nas folhas de soja.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos, Wellington Ivo Eduardo, Renato Franco Oliveira de Moraes, Mirella Marconato Di Bello, Juno Ferreira Silva Diniz, Luciano Nogueira e Jeane Dayse Veloso dos Santos, pelo convívio diário, e principalmente a Zulene Antônio Ribeiro e Eduardo Neves Costa, por toda ajuda nos trabalhos e às constantes discussões sobre Resistência de Plantas e Entomologia.

À minha mulher, Bruna Bazzon Devasio, por todo o amor, compreensão, paciência e companheirismo proporcionados, e por estar sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando nessa jornada.

Aos amigos de república, Felipe Escudeiro Pavani, Darcio Zangirolami Filho, Steffan Edward Octavio de Oliveira, Donovan Filipe Henrique Pinto e Diego Henrique Vinche, pelos cinco anos de convivência e grande amizade.

A todos os funcionários do Departamento de Fitossanidade, em especial à Roseli Pessoa, Lígia Dias Fiorezzi, Alex Antônio Ribeiro e José Altamiro de Souza, pela convivência e colaboração.

À empresa SGS-Gravena, em especial às funcionárias do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos, pela disponibilização dos insetos utilizados nesse trabalho.

Aos colegas e alunos do Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola, pela convivência e participação junto às disciplinas e cursos realizados.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
2.1. A cultura da soja	3
2.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i>	5
2.3. <i>Spodoptera frugiperda</i>	8
2.4. Resistência de genótipos de soja a insetos-praga	12
2.5. Fatores que podem influenciar a expressão de resistência nas plantas	16
2.6. Possíveis mecanismos responsáveis pela resistência nas plantas.....	18
2.6.1. Concentração de flavonoides	18
2.6.2. Concentração de nutrientes.....	19
2.7. Resistência induzida.....	20
3. Referências.....	22
CAPÍTULO 2 – Fatores que influenciam a expressão de antixenose em soja a <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i>	44
Resumo	44
Abstract.....	45
1. Introdução	46
2. Material e métodos.....	47
2.1. Experimento 1: uma lagarta <i>versus</i> duas lagartas por disco foliar.....	48
2.2. Experimento 2: uso de lagartas sem suspensão de alimentação <i>versus</i> com suspensão de alimentação por três horas antes do ensaio	48

2.3. Experimento 3: disco foliar <i>versus</i> folíolo inteiro	49
2.4. Experimento 4: parte superior <i>versus</i> parte inferior da planta	49
2.5. Experimento 5: estágio vegetativo <i>versus</i> estágio reprodutivo	49
2.6. Análise estatística	50
3. Resultados	50
3.1. Experimento 1: uma lagarta <i>versus</i> duas lagartas por disco foliar	50
3.2. Experimento 2: uso de lagartas sem suspensão de alimentação <i>versus</i> sem alimento por três horas antes do ensaio	52
3.3. Experimento 3: disco foliar <i>versus</i> folíolo inteiro	54
3.4. Experimento 4: parte superior <i>versus</i> parte inferior da planta	56
3.5. Experimento 5: estágio vegetativo <i>versus</i> estágio reprodutivo	58
4. Discussão	60
5. Conclusões	65
6. Referências	65
CAPÍTULO 3 – Influência de partes e idades de plantas de soja na expressão da antibiose à lagarta-da-soja e lagarta-militar	70
Resumo	70
Abstract	71
1. Introdução	72
2. Material e métodos	74
2.1. Parâmetros biológicos de <i>A. gemmatalis</i> e <i>S. frugiperda</i> alimentadas com folhas de partes e idades de plantas de genótipos de soja	75
2.2. Quantificação de macro e micronutrientes em partes e idades de plantas de genótipos de soja	76
2.3. Concentração de flavonoides em partes e idades de plantas de genótipos de soja	77
2.4. Análise estatística	78
3. Resultados	79

3.1. Parâmetros biológicos de <i>A. gemmatalis</i> e <i>S. frugiperda</i> alimentadas com folhas de partes e idades de plantas de genótipos de soja	79
3.2. Quantificação de macro e micronutrientes em partes e idades de plantas de genótipos de soja	88
3.3. Concentração de flavonoides em partes e idades de plantas de genótipos de soja.....	89
4. Discussão.....	91
5. Conclusões	97
6. Referências.....	97
CAPÍTULO 4 – Resistência induzida em soja pela lagarta-militar: efeitos no consumo foliar, proteínas, compostos fenólicos, inibidor de tripsina, peroxidase e polifenol oxidase.....	105
Resumo	105
Abstract.....	106
1. Introdução	107
2. Material e métodos.....	109
2.1. Indução de resistência no consumo de lagartas de <i>S. frugiperda</i> e efeitos na concentração de proteínas totais, compostos fenólicos totais e inibidor de tripsina	109
2.1.1. Efeitos na preferência alimentar de lagartas de <i>S. frugiperda</i>	110
2.1.2. Efeitos na concentração de proteínas totais.....	111
2.1.3. Efeitos na concentração de compostos fenólicos totais.....	111
2.2. Efeitos na atividade do inibidor de tripsina	112
2.3. Indução de resistência nas atividades de POX e PPO em diferentes posições da planta e dias após a injúria	113
3. Resultados	114
3.1.1. Efeitos no consumo de lagartas de <i>S. frugiperda</i>	114
3.1.2. Efeitos na concentração de proteínas totais.....	115
3.1.3. Efeitos na concentração de compostos fenólicos totais.....	116
3.2. Efeitos na atividade do inibidor de tripsina	117

3.3. Indução de resistência nas atividades de POX e PPO em diferentes posições da planta e dias após a injúria	117
4. Discussão	123
5. Conclusões.....	129
6. Referências	129
CAPÍTULO 5 – Considerações finais	137
Referências	141

FATORES E MECANISMOS QUE INFLUENCIAM A RESISTÊNCIA EM SOJA A *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER E *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)

RESUMO – A lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner e a lagarta-militar *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) são duas das principais pragas desfolhadoras da cultura da soja. Entre os métodos disponíveis para seu controle destaca-se o uso de genótipos que apresentam moderada e alta resistência a insetos. No entanto, diversos fatores, inerentes à planta ou ao inseto, podem influenciar a expressão da resistência nas plantas. Desse modo, esse trabalho teve o objetivo de avaliar possíveis fatores que possam influenciar a expressão da resistência em soja, testando-se as hipóteses de que flavonoides, nutrientes, enzimas oxidativas, compostos fenólicos, proteínas e inibidores de proteinase possam ser alguns dos mecanismos responsáveis pela resistência à lagarta-da-soja e lagarta-militar. Três experimentos foram realizados a fim de elucidar essas questões. O primeiro experimento avaliou a influência dos seguintes fatores na expressão de antixenose nos genótipos resistente IAC 100 e suscetível BRSGO 8360 a ambas as espécies de insetos em testes de preferência alimentar com e sem chance de escolha: uma lagarta *versus* duas lagartas por disco foliar; uso de lagartas sem interrupção de alimentação *versus* com suspensão de alimentação por três horas antes do ensaio; disco foliar *versus* folíolo inteiro; parte superior *versus* parte inferior da planta; e estágio vegetativo *versus* estágio reprodutivo. O segundo experimento avaliou a influência da parte superior *versus* inferior da planta e de plantas em estágio vegetativo *versus* plantas em estágio reprodutivo na expressão de antibiose a *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* nos genótipos resistente PI 227687 e suscetível IGRA RA 626 RR. Além disso, foram avaliadas as concentrações de nutrientes e flavonoides como possíveis mecanismos responsáveis pela resistência em soja. Os macronutrientes quantificados nas folhas dos genótipos de soja provenientes dos respectivos tratamentos foram N, P, K, Ca, Mg e S; os micronutrientes quantificados foram B, Cu, Fe, Mn e Zn; dentre os flavonoides, foram quantificados rutina, isoquercetrina, daidzina, daidzeína, hesperidina, naringina, naringenina, quercetina e umbeliferona. O terceiro experimento avaliou a resistência induzida em plantas de soja do genótipo P 4906 RR após a injúria prévia por lagartas de *S. frugiperda* em subsequentes testes de preferência alimentar com chance de escolha com lagartas da mesma espécie, comparando-se o consumo nos discos foliares de plantas injuriadas por *S. frugiperda* com plantas não injuriadas. As concentrações totais de compostos fenólicos e proteínas, e concentração de inibidores de tripsina foram quantificadas. A atividade das enzimas oxidativas peroxidase e polifenol oxidase foram avaliadas nas folhas da parte inferior, mediana e superior das plantas injuriadas e não injuriadas e após dois, três e seis dias da injúria pelas lagartas de *S. frugiperda*. No primeiro experimento, a utilização de duas lagartas por disco foliar, sem suspensão de alimentação antes dos ensaios, utilizando-se discos foliares provenientes da parte superior das plantas em estágio reprodutivo proporcionou a melhor diferenciação na expressão da antixenose em genótipos de soja a *A. gemmatalis*; para *S. frugiperda*, o uso de uma lagarta por disco foliar, sem

suspensão de alimentação antes dos ensaios, utilizando-se discos foliares retirados da parte inferior das plantas em estágio reprodutivo proporcionou resultados mais adequados para os testes de preferência alimentar. No segundo experimento, a alimentação de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* com o genótipo de soja resistente PI 227687, folhas da parte inferior das plantas, ou plantas no estágio reprodutivo afetaram negativamente seu desenvolvimento; os efeitos adversos nos insetos foram relacionados às menores concentrações dos nutrientes N, P, K e S; maiores concentrações de Cu, Fe e Ca; e maiores concentrações dos flavonoides rutina, isoquercetrina, daidzina, daidzeína e hesperidina nas folhas das plantas de soja. No terceiro experimento, plantas de soja previamente injuriadas por *S. frugiperda* foram menos preferidas por lagartas dessa espécie a plantas não injuriadas. As enzimas peroxidase e polifenol oxidase apresentaram maiores concentrações nas plantas previamente injuriadas por *S. frugiperda*. A atividade da enzima peroxidase foi superior na folha que recebeu a injúria, e essa atividade apresentou um aumento entre três e seis dias após injúria; porém, esses fenômenos não ocorreram para polifenol oxidase. Espera-se que os resultados obtidos nesse trabalho possam contribuir para o entendimento dos mecanismos de defesa das plantas de soja às lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, gerando subsídios para o aperfeiçoamento do Manejo Integrado de Pragas nessa cultura.

Palavras-chave: antibiose, antixenose, enzimas oxidativas, flavonoides, inibidor de tripsina

FACTORS AND MECHANISMS INFLUENCING THE RESISTANCE IN SOYBEANS TO *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER AND *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)

ABSTRACT – The velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner and the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) are two of the major defoliating pests of soybeans. Among the methods available for their control, the use of genotypes possessing moderate and high resistance stands out. However, numerous factors, inherent to the plant or to the insect, may influence the expression of resistance in plants. Thus, this work aimed to evaluate potential factors influencing the expression of resistance in soybeans, and we tested the hypotheses that flavonoids, nutrients, oxidative enzymes, phenolics, proteins, and proteinase inhibitors may be some of the mechanisms responsible for resistance to the velvetbean caterpillar and fall armyworm. Three experiments were performed in order to elucidate these issues. The first experiment evaluated the influence of the following factors on the expression of antixenosis in the resistant genotype IAC 100 and susceptible genotype BRSGO 8360 to both insects in free-choice and no-choice feeding assays: one larva versus two larvae per leaf disc; use of non-starved larvae versus larvae starved for three hours prior to the assay; leaf disc versus entire leaflet; upper part versus lower part of plants; vegetative growth stage versus reproductive stage. The second experiment assessed the influence of the upper part versus lower part of the plant, and plants at vegetative growth stage versus reproductive stage on the expression of antibiosis to *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* in the resistant genotype PI 227687 and susceptible genotype IGRA RA 626 RR. In addition, the concentration of nutrients and flavonoids were evaluated as potential mechanisms responsible for resistance in soybeans. The macronutrients quantified in the leaves of the soybean genotypes from the respective treatments were N, P, K, Ca, Mg, and S; the quantified micronutrients were B, Cu, Fe, Mn, and Zn; among the flavonoids, we quantified rutin, isoquercetrin, daidzin, daidzein, hesperidin, naringin, naringenin, quercetin, and umbelliferone. The third experiment evaluated the induced resistance in soybeans of the genotype P 4906 RR following injury by *S. frugiperda* larvae in subsequent free-choice feeding assays using larvae of the same species, by comparing the consumption in leaf discs from injured plants by *S. frugiperda* with uninjured plants. Total concentration of phenolics and proteins, and concentration of trypsin inhibitor were quantified. Activity of the oxidative enzymes peroxidase and polyphenol oxidase were evaluated in the leaves from the lower, mid, and upper part of injured plants and uninjured plants after two, three, and six days following injury by *S. frugiperda* larvae. In the first experiment, the utilization of two larvae of *A. gemmatalis* per leaf disc, not starved before the assays, with leaf discs from the upper part of plants at the reproductive growth stage provided better discrimination of differences in antixenosis expression in soybean genotypes; for *S. frugiperda*, use of one larva per leaf disc, not starved before the assays, with leaf discs from the lower part of plants at the reproductive growth stage gave more adequate results for feeding preference tests. In the second experiment, *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* fed on the resistant genotype PI 227687, leaves from the lower part of plants, or plants at the reproductive growth stage had their biological development negatively affected; the adverse effects on the insects were related with the lower

concentrations of the nutrients N, P, K, and S; higher concentrations of Cu, Fe, and Ca; and higher concentrations of the flavonoids rutin, isoquercetrin, daidzin, daidzein, and hesperidin in the soybean leaves. In the third experiment, soybean plants previously injured by *S. frugiperda* were less preferred by the larvae of the same species than uninjured plants. The enzymes peroxidase and polyphenol oxidase exhibited higher concentration in soybeans previously injured by *S. frugiperda*. Activity of peroxidase was higher in the leaf that received injury, and this activity increased between three and six days after injury; however, this phenomenon did not occur for polyphenol oxidase. We expect the results obtained in our study can contribute for the understanding of the defense mechanisms of soybeans against *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* larvae, generating subsidies for improving the Integrated Pest Management in this crop.

Keywords: antibiosis, antixenosis, flavonoids, oxidative enzymes, trypsin inhibitor

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

A lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) é uma das espécies de pragas desfolhadoras de soja que mais causam danos à cultura (SALAMINA, 1997; MOSCARDI et al., 2012). A lagarta-da-soja é uma espécie de hábito oligófago e geralmente se alimenta apenas de leguminosas (FORD et al., 1975). Além do Brasil (MOSCARDI et al., 2012), *A. gemmatalis* também é considerada praga-chave nos Estados Unidos, México, Colômbia, Venezuela e Argentina (PANIZZI; CORREA-FERREIRA, 1997).

Além dessa espécie, outros lepidópteros têm se destacado economicamente nas últimas safras agrícolas em soja (VIVAN, 2010). Uma das espécies que tem se beneficiado pelo cultivo sucessivo com algodão, soja e milho é a lagarta-militar *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Devido a sua polifagia, a sucessão dessas culturas fornece à lagarta-militar uma contínua oferta de alimento (SANTOS et al., 2009). Assim, essa espécie tem potencial de se tornar uma praga ainda mais importante na soja em função da intensa exposição da cultura à pressão populacional do inseto (SÁ et al., 2009).

Desse modo, métodos de controle são imprescindíveis a fim de se obter uma produção rentável e de boa qualidade. Entre os métodos alternativos ao controle químico com inseticidas, o método de resistência de plantas se baseia no cultivo de plantas que apresentam em sua constituição genes que expressam características fenotípicas que as tornam menos injuriadas do que outras (suscetíveis) em igualdade de condições. As características expressas pelas plantas resistentes podem proporcionar alterações no comportamento, fisiologia ou biologia dos insetos fitófagos, ou apresentar apenas maior capacidade de suportar seu ataque (BOIÇA JÚNIOR et al., 2013b).

Todavia, diversos fatores bióticos e abióticos podem influenciar negativa ou positivamente a expressão da resistência nas plantas, incluindo aqueles inerentes às plantas, ao inseto e ao ambiente (SMITH, 2005). Portanto, para a realização de testes visando à avaliação de genótipos quanto à resistência a um determinado inseto, as condições utilizadas nos ensaios devem ser criteriosamente confiáveis, a

fim de que um genótipo que realmente apresente genes que expressem alguma característica que confira resistência se manifeste sob aquelas condições.

Os mecanismos de defesa das plantas podem ser constitutivos ou induzidos. A resistência constitutiva ocorre quando as características relacionadas à defesa nas plantas são expressas constantemente, sem depender da presença de algum fator elicitador. Por outro lado, a resistência induzida é manifestada na planta como uma resposta em função, por exemplo, da herbivoria (STOUT, 2013). Assim, a expressão da resistência deve ser o resultado conjunto da complexa ação de enzimas oxidativas e dos compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas (STOUT; WORKMAN; DUFFEY, 1994).

Os compostos secundários são um dos mecanismos de defesa das plantas aos insetos, e pertencem geralmente a três grupos: compostos fenólicos, terpenoides e compostos nitrogenados (CHEN, 2008). Os flavonoides são compostos fenólicos que ocorrem em diversas espécies de plantas (HARBORNE, 1967), incluindo a soja (KOGAN; FISCHER, 1991), e a proteção contra o ataque de insetos configura entre suas funções (MARKHAM, 1989). Além desses grupos de compostos secundários, os inibidores de proteinases são proteínas que também participam como substâncias constitutivas e induzidas de defesa nos tecidos vegetais contra o ataque de insetos e infecção por patógenos (RYAN, 1990), e que estão presentes nas plantas de soja (VOLMANN et al., 2003).

Os nutrientes inorgânicos ou sais minerais também podem influenciar o nível de defesa das plantas. Os nutrientes inorgânicos estão relacionados às mais diversas funções nos insetos fitófagos, tais como balanço iônico, permeabilidade de membranas, ativação de enzimas e constituição estrutural de alguns pigmentos (PARRA, 1986). Desse modo, entre os mecanismos responsáveis pelas características químicas da planta, os macro e micronutrientes exercem importante papel não apenas para o crescimento, mas também para sua defesa contra insetos e patógenos (SPAN; SCHUMANN, 2010).

Visto a importância de que diversos fatores inerentes ao inseto e à planta exercem na expressão da resistência, bem como o papel que enzimas oxidativas, compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, inibidores de proteinases e nutrientes inorgânicos devem apresentar na defesa constitutiva e induzida das

plantas, estudos são necessários para avaliar o papel conjunto desses mecanismos em plantas de soja ao ataque de insetos oligófagos e polífagos. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar possíveis fatores que possam influenciar a antixenose e antibiose em soja, testando-se as hipóteses de que flavonoides, macro e micronutrientes, as enzimas oxidativas peroxidase e polifenol oxidase, compostos fenólicos, proteínas e inibidores de proteinase sejam alguns dos mecanismos responsáveis pela resistência à lagarta-da-soja e à lagarta-militar.

2. Revisão de literatura

2.1. A cultura da soja

A soja é uma planta dicotiledônea pertencente à família Fabaceae, subfamília Papiolionoideae, gênero *Glycine*, espécie *Glycine max*, e classificada taxonomicamente como *Glycine max* (L.) Merrill. A planta apresenta sistema radicular pivotante com ramificações e presença de nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio (MULLER, 1981). Seu caule é herbáceo e ereto, medindo de 80 a 150 cm de comprimento. As folhas são alternadas e trifolioladas, com folíolos ovalados ou lanceolados. As flores são axilares, sésseis, de coloração branca, violácea ou amarela. Os frutos são vagens, as quais são levemente curvadas, achatadas, deiscentes e pubescentes, e contêm de duas a cinco sementes. Estas possuem formato liso, ovoide, globoso ou elíptico, com hilo pequeno (HICKS, 1978; MULLER, 1981; BERGAMIN; CANCIAN; CASTRO, 1999).

O ciclo das plantas de soja dura em média entre 80 e 200 dias, e pode ser influenciado pelas condições ambientais da região onde são cultivadas e da cultivar utilizada. As plantas apresentam basicamente dois estádios de desenvolvimento fenológico: vegetativo, que compreende as fases de estabelecimento e desenvolvimento das plantas; e o reprodutivo, iniciando-se com o florescimento até a maturação das vagens (NEUMAIER et al., 2000). A classificação dos estádios fenológicos da soja proposta por Fehr e Cavines (1977) utiliza os estádios vegetativos designados pela letra "V" e os reprodutivos pela letra "R", e exceto pelos estádios VE (emergência) e VC (cotilédone), as letras "V" e "R" são seguidas por

números que identificam estádios específicos dentro das fases vegetativa e reprodutiva da planta.

A soja é originária da costa leste do Oriente, mais precisamente da China, onde espécies silvestres de hábito de crescimento rasteiro ocorriam ao longo das margens do Rio Amarelo. No Ocidente, os Estados Unidos iniciaram a exploração comercial da soja apenas em meados de 1920, dando importância como forrageira e posteriormente à produção de grãos (EMBRAPA, 2004; 2005).

Os relatos mais antigos da introdução da soja no Brasil se referem às experimentações realizadas pelo professor da Escola de Agronomia da Bahia, Gustavo Dutra em 1882, e pelo Dr. Franz Wilhelm Daffert no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em 1892, onde os primeiros genótipos introduzidos no país provenientes dos Estados Unidos foram avaliados (LEAL, 1967). O primeiro registro relacionado à produção comercial de soja no Brasil foi no Município de Santa Rosa, RS, em 1914, porém, apenas a partir de 1941, a leguminosa atingiu produtividades mais acentuadas. No entanto, apenas durante as décadas de 1960/1970 foi que a cultura da soja se tornou economicamente importante para o Brasil, pelo fato de ser beneficiada com a política de incentivos fiscais à triticultura no país nessa época. Assim, cultivava-se trigo no inverno e soja durante o verão, utilizando-se para esta cultura as mesmas áreas de cultivo, mão-de-obra e maquinaria empregadas para a triticultura (EMBRAPA, 2004; 2005).

A partir dos anos 1980/1990 houve uma expansão da sojicultura para áreas até então não cultivadas da região Centro-Oeste do país. Dentre as causas dessa migração podem-se destacar os incentivos fiscais para instalações de novas áreas de produção, compra de maquinários agrícolas, construção de silos, armazéns, etc; baixo valor econômico das terras na região do cerrado na época; desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições da região; topografia favorável à mecanização agrícola; regime de chuvas favorável ao cultivo; e migração de produtores provenientes da região Sul do país com alto nível econômico e tecnológico (EMBRAPA, 2004; 2005).

A produção de soja no Brasil na safra 2013/2014 foi de aproximadamente 85 milhões de toneladas, em uma área total cultivada de aproximadamente 30 milhões de hectares, e produtividade média de 2842 kg ha⁻¹. Os Estados brasileiros que

apresentaram as maiores produções em suas respectivas áreas cultivadas com a leguminosa foram: Mato Grosso (26,44 milhões de toneladas em 8,62 milhões de hectares), Paraná (14,77 milhões de toneladas em 5,02 milhões de hectares), Rio Grande do Sul (12,87 milhões de toneladas em 4,94 milhões de hectares), Goiás (8,71 milhões de toneladas em 3,10 milhões de hectares) e Mato Grosso do Sul (6,15 milhões de toneladas em 2,12 milhões de hectares) (CONAB, 2014).

A utilização da soja é muito conhecida pela extração do óleo vegetal usado principalmente na fritura de alimentos e tempero de saladas (JORGE et al., 2005). A leguminosa também se constitui em um dos principais ingredientes na alimentação de gado, suínos e aves domésticas (ZAMBOM et al., 2001). Além dessas principais utilidades, devido à preocupação das pessoas em ingerirem alimentos mais nutritivos e saudáveis, atualmente a soja vem sendo cada vez mais consumida na forma *in natura*, além dos vegetarianos, que a utilizam como uma das principais fontes proteicas em sua dieta (GAZZONI, 2011). Por fim, a soja tem sido alvo de várias pesquisas visando a seu emprego na fabricação de combustível (COSTA NETO et al., 2000; FERRARI; OLIVEIRA; SCABI, 2005).

Dentre os fatores bióticos que podem afetar adversamente o desenvolvimento das plantas de soja estão os insetos fitófagos. Estes causam injúrias nas plantas desde a emergência até a maturação fisiológica, limitando o potencial de produtividade e qualidade dos grãos. Na cultura da soja, merecem destaque entre os insetos-praga as lagartas desfolhadoras da Ordem Lepidoptera, como *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* (MOSCARDI et al., 2012).

2.2. *Anticarsia gemmatalis*

A lagarta-da-soja, como é conhecida vulgarmente, é uma espécie de clima tropical e subtropical, com ocorrência desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (FORD et al., 1975; KING; SAUNDERS, 1984). A lagarta-da-soja é considerada principal praga dessa cultura nos Estados Unidos, México, Colômbia, Venezuela e Argentina (PANIZZI; CORREA-FERREIRA, 1997).

No Brasil, *A. gemmatalis* é considerada uma das pragas-chave da cultura da soja (SALAMINA, 1997; MOSCARDI et al., 2012), ocorrendo em áreas cultivadas

desde o Rio Grande do Sul até a região Centro-Oeste do país (GAZZONI et al., 1988; PANIZZI, 1990). Aproximadamente 90% da área foliar de soja é consumida nos dois últimos instares larvais, e durante toda essa fase *A. gemmatalis* pode consumir entre 84,0 (BOLDT; BIEVER; IGNOFFO, 1975) a 121,2 cm² (HERZOG; TODD, 1980). As lagartas se alimentam do limbo foliar e nervuras, podendo causar desfolha total nas plantas (LOURENÇÃO et al., 2010). Dependendo da cultivar de soja, a lagarta-da-soja pode desfolhar até 100% de área foliar, e já foram verificadas reduções de até 33% na produção (RAMIRO; OLIVEIRA, 1975). A desfolha pelas lagartas de *A. gemmatalis* nos estádios vegetativo e reprodutivo podem reduzir a produtividade em até mais de 10 sacos por hectare (REICHERT; COSTA, 2003).

Embora *A. gemmatalis* seja uma espécie que se alimente preferencialmente de leguminosas (FORD et al., 1975; KOGAN; TURNIPSEED, 1987), e em geral não apresenta grande número de hospedeiros, já foram registrados surtos em algodoeiro (DOUGLAS, 1930; HINDS; OSTERBERGER, 1931), pastagens (WILLE, 1943), arroz (TARRAGÓ et al., 1977) e trigo (MOSCARDI, 1979). Além disso, pode ocorrer eventualmente em amendoim, alfafa e girassol, principalmente se essas culturas forem instaladas subsequentemente à colheita de soja (EMBRAPA, 2000).

Os adultos de *A. gemmatalis* são mariposas de aproximadamente 40 mm de envergadura, coloração marrom-acinzentada, e apresentam uma linha transversal que cruza as asas posteriores (EMBRAPA, 2000; GALLO et al., 2002). Sua reprodução ocorre durante o período noturno (GALLO et al., 2002) e o processo de acasalamento é composto pelas seguintes fases: liberação do feromônio sexual pela fêmea; atração do macho; posição de cópula assumida pelo macho; transferência de esperma; e separação (GREENE et al., 1973). O pico do acasalamento situa-se durante as primeiras 48 horas após a emergência dos adultos, com redução nos próximos seis dias, e vai diminuindo gradativamente até o 15º dia (LEPPLA, 1976).

Após a fecundação, a oviposição ocorre na face abaxial das folhas, caule, ramos e nos pecíolos, preferencialmente nos terços médio e inferior das plantas. Cada fêmea tem a capacidade de colocar mil ovos, dos quais 80% são depositados nos primeiros oito a 10 dias (EMBRAPA, 2000). A temperatura de 25°C é a mais favorável para a oviposição de *A. gemmatalis*, cada fêmea depositando cerca de 350 ovos. Sob as temperaturas de 30 e 35°C foram obtidos 26,6 e 35,1 ovos por fêmea,

respectivamente (SILVA, 1981). Em contrapartida, Magrini et al. (1996) relataram que a temperatura de 27°C é a mais favorável para as fêmeas ovipositarem.

A longevidade das fêmeas é de aproximadamente 20 dias (EMBRAPA, 2000), no entanto, esse parâmetro biológico pode variar em função de fatores como temperatura, fenologia das plantas e acasalamento. Adultos de *A. gemmatalis* cujas lagartas se alimentaram com dieta artificial apresentaram duração média de 11,2 dias à temperatura de 32,2°C até 24,8 dias a 21,1°C (MOSCARDI; BARFIELD; ALLEN, 1981). A longevidade também pode ser influenciada pela alimentação dos adultos, variando de 12,3 dias quando as mariposas foram alimentadas com solução de sacarose a 5%, até 5,0 dias quando mantidas sem alimento (NANTES; GRICOLETTI; CAMPOS, 1978).

Os ovos são esféricos e verde-claros logo após serem depositados, e à medida que os embriões se desenvolvem tornam-se acinzentados, atingindo a coloração marrom-avermelhada quando estão próximos à eclosão das lagartas (ELLISOR, 1942; EMBRAPA, 2000). O período de incubação dos ovos de *A. gemmatalis* situa-se entre três e sete dias (GREENE et al., 1973). Reid (1975) encontrou um período de incubação de dois a três dias à temperatura média de 24°C.

As lagartas recém-eclodidas apresentam coloração verde, com variações de tonalidades mais claras a escuras, principalmente após o segundo ínstar (WATSON, 1916). Possuem cinco estrias longitudinais brancas no dorso e quatro pares de falsas pernas abdominais (EMBRAPA, 2000). Em condições de altas populações ou escassez de alimento, podem ocorrer lagartas com coloração escura, mantendo-se as estrias brancas (SILVA, 1981).

Nos dois primeiros ínstars, a alimentação é realizada por meio de raspagem do parênquima foliar, e somente após o terceiro ínstar as lagartas conseguem perfurar os folíolos de soja. Nesses ínstars iniciais, as lagartas se locomovem medindo palmos e podem ser confundidas com a lagarta falsa-medideira (GALLO et al., 2002). As lagartas de *A. gemmatalis* atingem até 40 mm de comprimento no fim da fase larval (EMBRAPA, 2000).

A fase larval tem duração média de 12 a 15 dias (GALLO et al., 2002). Nessa fase as lagartas passam por cinco a seis ínstars, no entanto, podem ocorrer até

oito ínstaes (BOLDT; BIEVER; IGNOFFO, 1975; CONTI; WADDILL, 1982) dependendo de fatores como o genótipo e idade da planta e variações de temperatura (REID, 1975; SILVA, 1981; LAMBERT; KILEN, 1984). Para completar o desenvolvimento da fase larval, cada lagarta consome aproximadamente 90 cm² de área foliar (LEPPLA et al., 1977), podendo atingir até mais de 100 cm² (HERZOG; TODD, 1980; WALKER et al., 2000). Ao final dessa fase, a lagarta para de se alimentar, fase que é conhecida como pré-pupa, cuja duração é de 1,6 a 2,0 dias (GAMUNDI, 1988).

A transformação em pupa é realizada no solo, em aproximadamente 2 cm de profundidade (EMBRAPA, 2000). Inicialmente as pupas são verde-claras, e posteriormente adquirem coloração marrom-escura brilhante (WATSON, 1916). Essa fase tem duração média de nove a 10 dias sob condições de temperatura de 25°C, e passado esse período ocorre a emergência do adulto (EMBRAPA, 2000). No entanto, mudanças na temperatura influenciam significativamente a duração do período pupal. Reid (1975) verificou durações de 7,7 e 19,4 dias às temperaturas médias de 29,4 e 18,3°C, respectivamente, enquanto Silva (1981) encontrou durações de 6,9; 9,5; 10,0 e 22,2 dias quando às temperaturas de 35, 30, 25 e 20°C, respectivamente.

2.3. *Spodoptera frugiperda*

A lagarta-militar *S. frugiperda* é um inseto fitófago e cosmopolita, originária e amplamente distribuída nas zonas tropical e subtropical do continente americano (LUGINBILL, 1928; CRUZ, 1995). Além disso, apresenta a capacidade de se adaptar facilmente em diferentes latitudes e longitudes (LABRADOR, 1967). A polifagia também é uma das características da lagarta-militar, que tem entre seus principais hospedeiros o milho, milheto, trigo, sorgo, arroz, cana-de-açúcar, soja, feijão, algodão, amendoim, batata, batata-doce, tomate, repolho, couve, entre outros (SILVA et al., 1968; ALI et al., 1989; CRUZ, 1995).

Esse inseto tem adquirido gradativamente importância na cultura da soja por apresentar ocorrência regular e causar injúrias nas plantas, principalmente em áreas constituídas pelo cultivo em áreas próximas ou em sucessão com soja, algodão e

milho. Por se tratar de uma espécie polífaga, esse sistema agrícola representa uma contínua oferta de alimento à lagarta-militar (SANTOS et al., 2009). Além disso, o fato de o milho ser plantado o ano todo no país em cultivos de “safra” e “safrinha”, somado à existência de outras culturas que podem hospedar a lagarta-militar, proporcionam a *S. frugiperda* condições para se proliferar e se tornar uma espécie com ocorrência frequente nas regiões sojicultoras (PAPA; CELOTO, 2011). Desse modo, diante da intensa exposição da cultura da soja à pressão populacional de *S. frugiperda*, esse inseto tem potencial para se tornar uma praga de grande importância para a leguminosa (SÁ et al., 2009).

Spodoptera frugiperda tem desenvolvimento holometabólico, ou seja, compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto (LUGINBILL, 1928). Os adultos são mariposas que medem de 35 a 45 mm de envergadura, apresentam coloração cinza-escura (KING; SAUNDERS, 1984), e possuem asas anteriores mosqueadas e posteriores esbranquiçadas, com bordas acinzentadas. Há dimorfismo sexual entre os adultos, sendo que os machos apresentam as asas anteriores com duas manchas mais claras, o que não é presente nas fêmeas (CRUZ, 1995).

Os adultos têm hábito noturno e não são ativos durante o dia. Neste período, podem ser encontrados escondidos sob folhagens próximas ao solo, e quando perturbados voam aleatoriamente até encontrarem outro local para se esconderem. Sua atividade se inicia próximo ao pôr-do-sol, de forma que as mariposas se movimentam perto das plantas hospedeiras mais favoráveis à sua alimentação e oviposição, atingindo o pico de atividade após duas a quatro horas, (CRUZ, 1995). A longevidade dos adultos é em média 12 dias, e o período de oviposição se inicia no terceiro ou quarto dia após a emergência das fêmeas (CRUZ, 1995). Entretanto, a temperatura e o substrato alimentar são fatores que podem influenciar a duração desse parâmetro biológico (LUGINBILL, 1928).

Após o acasalamento, as fêmeas de *S. frugiperda* realizam a oviposição preferencialmente na face abaxial das folhas (PITRE; MULROONEY; HOGG, 1983; ALI; LUTTREL; PITRE, 1990; BOIÇA JÚNIOR et al., 2013). O número de posturas é muito variável, podendo chegar até 13 posturas por fêmea (CRUZ, 1995). As massas são irregulares e contêm de 30 a 300 ovos cada (KING; SAUNDERS, 1984). Ávila, Degrande e Gómez (1997) registraram posturas com aproximadamente 50

ovos, totalizando 1360 ovos por fêmea, enquanto Cruz et al. (1997) observaram em média 150 ovos por postura, os quais foram depositados na maioria em duas camadas. As posturas geralmente são recobertas por pelos e escamas provenientes do abdome da fêmea durante a oviposição, e os ovos são unidos entre si e fixados ao substrato por meio de uma substância produzida pelas glândulas coletéricas (LUCCHINI, 1977; PATEL, 1981). Boiça Júnior et al. (2013) relataram maior preferência para oviposição de *S. frugiperda* no terço superior de algodoeiro. No entanto, nas cultivares de algodoeiro CNPA 7H e BRS 187 8H foram encontradas massas de ovos apenas no terço médio das plantas (MIRANDA; FERREIRA, 2005). Cruz (1995) não observou preferência para oviposição de *S. frugiperda* em qualquer parte da planta.

Os ovos inicialmente têm coloração verde-clara, tornam-se alaranjados entre 12 e 15 horas após a oviposição, e escuros próximos à eclosão. O período de incubação é de três dias à temperatura de 25°C (CRUZ, 1995). Barros e Torres (2009) também verificaram período de incubação de três dias à temperatura de 25°C em milho, milheto, soja e algodão. Todavia, esse período é influenciado pela temperatura (LUGINBILL, 1928; LABRADOR, 1967), umidade relativa e planta hospedeira (CRUZ, 1995).

A fase larval de *S. frugiperda* apresenta duração média de 23 dias, durante os quais as lagartas normalmente passam por seis ínstaes (CRUZ, 1995). Em milho, a duração do período larval pode variar de 12,0 a 17,8 dias (VIANA; POTENZA, 2000; SÁ et al., 2009). Em plantas de soja, sorgo granífero, sorgo forrageiro e braquiária, a duração média da fase larval foi de 14,0 dias (SÁ et al., 2009). Veloso (2010) observou período larval variando de 14,5 a 16,5 dias quando lagartas de *S. frugiperda* foram criadas com diferentes cultivares de soja.

No entanto, dependendo dos hospedeiros em que a lagarta se alimenta, substâncias antibióticas ou impropriedades nutricionais inerentes a um determinado genótipo de planta ou mesmo fatores ambientais, o número de ínstaes do inseto pode sofrer variações (LARA, 1991). Em algodoeiro, as lagartas de *S. frugiperda* apresentam de seis a sete ínstaes (VELOSO; PARRA; NAKANO, 1983; MIRANDA; FERREIRA, 2005). Campos (2008) verificou de seis a oito ínstaes larvais quando essa espécie foi alimentada com diferentes cultivares de algodoeiro. O período larval

de *S. frugiperda* na cultivar de algodoeiro IAC 17, à temperatura de 25°C e umidade de 60% foi de 22,7 dias (VELOSO; PARRA; NAKANO, 1983). Miranda e Ferreira (2005) encontraram duração média de 22 e 27 dias, respectivamente, quando as lagartas foram criadas sobre as cultivares de algodoeiro CNPA 7H e BRS 187 8H, a 25°C e de 13 e 18 dias a 30°C, respectivamente.

As lagartas recém-eclodidas são esbranquiçadas antes de se alimentarem, tornando-se esverdeadas após ingerirem as folhas, atingindo até 1,9 mm ao final do primeiro ínstar. No segundo ínstar, as lagartas apresentam um sombreamento marrom no dorso, e medem de 3,5 a 4,0 mm de comprimento. Passando ao terceiro ínstar, adquirem coloração marrom-clara no dorso e esverdeada ventralmente, com linhas dorsais e subdorsais brancas. As lagartas no quarto ínstar atingem 10 mm de comprimento e apresentam o dorso marrom-escuro e a cápsula cefálica marrom-avermelhada. Durante o quinto ínstar, as lagartas são semelhantes às do estágio anterior, todavia, são mais escuras e maiores, com 18,0 mm. Por fim, no sexto ínstar, as lagartas têm o dorso marrom-acinzentado e as partes ventral e subventral esverdeadas, com manchas marrom-avermelhadas nessa última região, e podem medir 35,0 mm de comprimento (CRUZ, 1995).

No início, as lagartas ficam um período em repouso por duas a 10 horas e se alimentam primariamente do córion dos ovos, e depois raspam o limbo das folhas, de preferência daquelas mais novas (VIANA; POTENZA, 2000). Durante o primeiro ínstar, as lagartas tecem fios de seda que são utilizados como meio de dispersão e escape dos inimigos naturais (CRUZ, 1995).

Por ser um inseto fitófago desfolhador, a lagarta-militar reduz a área foliar das plantas, diminuindo sua capacidade fotossintética e conseqüentemente sua produção. Os danos ocasionados por essa praga podem ser diferentes em função da planta hospedeira, estágio fenológico, época de ataque e intensidade de infestação (CRUZ et al., 1999). Durante o estágio inicial de desenvolvimento da cultura da soja, as lagartas se alimentam de folhas e hastes mais tenras, proporcionando injúrias em áreas extensas e até replantio (RICIERI et al., 2006).

Quando as lagartas estão completamente desenvolvidas, descem ao solo onde inicialmente ficam um período sem alimentação, denominado de pré-pupa. Após um ou dois dias se transformam em pupas (CRUZ, 1995; ÁVILA; DEGRANDE;

GÓMEZ, 1997), as quais são inicialmente verde-claras com tegumento transparente. Com o decorrer de alguns minutos, mudam gradativamente de cor, passando de alaranjadas para marrom-avermelhadas, e escurecem progressivamente até quase pretas antes da emergência dos adultos, atingindo um tamanho de 13 a 16 mm (CRUZ, 1995).

O estágio pupal tem duração de 8 a 25 dias, variando de acordo com a temperatura (MIRANDA, 2006). Viana e Potenza (2000) relataram duração da fase pupal variando entre 11,0 e 11,8 dias em milho. Em plantas de algodão, Campos (2008) observou duração do período pupal de 8,1 a 9,0 dias, enquanto Jesus (2009) verificou duração de 10,4 a 11,7 dias. Pupas de *S. frugiperda* cujas lagartas se alimentaram de folhas de diferentes cultivares de soja tiveram duração da fase pupal entre 7,3 e 7,9 dias (VELOSO, 2010).

O ciclo completo de desenvolvimento de *S. frugiperda* é de aproximadamente 30 dias na cultura do milho (CRUZ, 1995). Veloso (2010) encontrou duração do ciclo completo de 24,2 a 26,3 dias em plantas de soja, e Campos (2008) de 26,6 a 32,5 dias quando a lagarta-militar foi criada em diferentes cultivares de algodoeiro. O número de gerações de *S. frugiperda* que pode ocorrer durante o ano é dependente da latitude e do hábitat, podendo haver seis ou mais gerações nas regiões onde esse inseto tem condições de sobreviver o ano todo (BOIÇA JÚNIOR; SANTOS; TOLEDO, 2006).

2.4. Resistência de genótipos de soja a insetos-praga

Planta resistente é aquela que, devido à soma de seus genes constitutivos, expressam características fenotípicas físicas, morfológicas e/ou químicas que as tornam menos infestadas ou injuriadas que outras (suscetíveis) em igualdade de condições. As características expressas pelas plantas resistentes, por sua vez, proporcionam aos insetos alterações no comportamento, fisiologia e biologia, ou apresentam maior capacidade de suportar seu ataque (BOIÇA JÚNIOR et al., 2013b).

Desse modo, entre os métodos de controle de pragas disponíveis, e obedecendo aos preceitos do manejo integrado de pragas, a resistência de plantas

pode contribuir para a manutenção da população do inseto-praga abaixo do nível de dano econômico, não causam desequilíbrios no agroecossistema, apresentam efeito cumulativo e persistente, não promovem aumento nos custos de produção, e são compatíveis, em geral, com as demais táticas de controle (LARA, 1991).

Vários estudos relataram genótipos de soja com resistência a várias espécies de insetos-praga. Entre os autores que constataram genótipos com resistência do tipo não preferência para alimentação, Van Duyn, Turnipseed e Maxwell (1971) e Van Duyn, Turnipseed e Maxwell (1972) observaram que as linhagens PI 229358, PI 227687 e PI 171451 apresentaram esse tipo de resistência ao besouro-mexicano *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) em experimento realizado em campo, e posteriormente em testes sem chance de escolha em laboratório.

Turnipseed e Sullivan (1976) concluíram que as linhagens de soja PI 171451, PI 229358 e PI 227687 apresentam resistência do tipo antibiose a *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). Esses mesmos genótipos também expressaram resistência a outros insetos, como *Epicauta vittata* (Fabricius) (Coleoptera: Meloidae), *Cerotoma trifurcata* (Forster) (Coleoptera: Chrysomelidae), *Helicoverpa zea* (Boddie) (CLARK et al., 1972), *Heliothis virescens* (Fabricius) (HATCHETT; BELAND; HARTWIG, 1976), *Helicoverpa armigera* Hübner, *Helicoverpa punctigera* Wallengren (TUART; ROSE, 1979) e *Trichoplusia ni* (Hübner) (LUEDDERS; DICKERSON, 1977) (Lepidoptera: Noctuidae).

Beland e Hatchett (1976) observaram antibiose nos genótipos de soja PI 229358 e ED 73-375 a *H. zea*. Os insetos criados nesses genótipos apresentaram alta mortalidade larval, maior número de ínstar, peso reduzido, maior duração de desenvolvimento e baixo índice de oviposição quando comparados com os insetos alimentados com os genótipos suscetíveis Bragg e Davis.

Em experimento conduzido em campo, Gonçalves e Silva (1978) verificaram que os genótipos PI 281888, PI 283326 e PI 324068 foram os menos danificados por insetos mastigadores, com predominância de *A. gemmatilis*, enquanto PI 165671, PI 200492 e PI 159926 foram mais atacados em relação ao genótipo suscetível Davis.

Smith e Gilman (1981) determinaram maior nível de não preferência para alimentação de *C. includens* por duas populações de soja derivadas da linhagem PI

229358 do que por duas provenientes da linhagem PI 227687, em experimentos com chance de escolha.

Beach, Todd e Baker (1985), avaliando o desenvolvimento da lagarta falsa-medideira em quatro genótipos resistentes de soja e um suscetível, verificaram maior grau de resistência do tipo antibiose no genótipo 81-327, o qual proporcionou maior mortalidade larval, menor área foliar consumida, menor peso de pupas, maior tempo necessário para emergência dos adultos e menor número de ovos por casal.

Menor taxa de crescimento da lagarta-da-soja foi relatada por Rogers e Sullivan (1986) quando criada em folhas dos genótipos PI 229358 e PI 171451 comparado com genótipos suscetíveis de soja.

Beach e Todd (1988a) relataram altos índices de mortalidade, redução de crescimento, alongamento do tempo de desenvolvimento e aumento do número de ínstaras quando lagartas de *A. gemmatilis* e *C. includens* foram alimentadas com o genótipo PI 229358. Os mesmos autores ainda verificaram que a linhagem GatIR 81-296 também apresenta resistência do tipo antibiose às duas pragas. Em outro ensaio, Beach e Todd (1988b) verificaram que durante a fase larval de *C. includens*, as lagartas apresentaram seu desenvolvimento biológico afetado quando alimentadas com folhas dos genótipos 81-296 e PI 229358, refletindo em menores pesos e índice de sobrevivência, além de aumento da fase larval.

Portillo e Pitre (1992) relataram que os genótipos de soja T83-5408, G81-296 e N85-214 apresentam níveis de resistência do tipo antibiose a *H. virescens* e *C. includens*.

Fugi (2003) relataram que PI 229358, IAC 17 e IAC 24 apresentaram índices de preferência bem inferiores ao padrão suscetível IAC PL-1, indicando a presença de resistência do tipo não preferência para alimentação a esse inseto.

Ao avaliarem a resistência de genótipos de soja a *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae), Lima e Lara (2004) verificaram que o genótipo BR 82-12547 apresentou não preferência para oviposição à mosca-branca, correlacionando negativamente esse efeito à densidade total de tricomas.

Fugi, Lourenção e Parra (2005) observaram que a alimentação com os genótipos IAC 17 e IAC 24 causaram baixa sobrevivência larval e pupal, baixa viabilidade de ovos, redução do número de ovos por fêmea e deformação de adultos

de *A. gemmatalis*. Além disso, o genótipo PI 229358 alongou a duração da fase larval, e reduziu o peso de pupas, viabilidade dos ovos e longevidade dos adultos.

Em experimentos realizados com *S. frugiperda* e cultivares convencionais de soja, Veloso (2010) relatou que as cultivares M-SOY 8400 e FMT-Tucunaré apresentaram resistência dos tipos não preferência para alimentação e antibiose, respectivamente.

Ao selecionar genótipos de soja resistentes a *S. eridania*, Souza et al. (2012) destacaram o genótipo IAC 100 como resistente a lagartas recém-eclodidas e de terceiro ínstar dessa espécie em testes com e sem chance de escolha em laboratório.

O comportamento alimentar de *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) em genótipos de soja foi avaliado por Souza et al. (2013), que verificaram que os genótipos PI 227687 e IAC 17 foram os menos atrativos aos percevejos, enquanto o último genótipo juntamente com IAC PL1 foram os menos consumidos.

Silva et al. (2013) observaram que os genótipos PI 229358, PI 274454, L1-1-01, IAC 19, PI 171451, PI 227687, IAC 100, IAC 78-2318, PI 274453 e IAC 74-2832 causaram alta mortalidade ninfal de *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae), e IAC 100, IAC 74-2832, PI 274453 e IAC 24 alongaram a fase ninfal desse percevejo, sugerindo a ocorrência de resistência do tipo antibiose. Recentemente, Silva et al. (2014) demonstraram que os genótipos PI 171451, PI 229358, PI 227687, PI 274454, PI 274453, IAC 100, IAC 19 e D 75-10169 expressaram antixenose ao percevejo *P. guildinii*.

Costa et al. (2014a), avaliando a preferência para oviposição de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) por genótipos de soja, verificaram que as linhagens PI 274454 e PI 227687 e a cultivar DM 339 apresentam antixenose ao inseto. Em outro estudo, Costa et al. (2014b) concluíram que os mesmos genótipos também expressam antibiose a *D. speciosa*.

Por fim, Souza et al. (2014) concluíram que os genótipos PI 227687 e PI 227682 apresentaram alta resistência do tipo antibiose a *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae), e os genótipos IAC 100 e DM 339 foram moderadamente resistentes, causando alongamento na fase larval e no

desenvolvimento total, redução da sobrevivência larval e de larva-adulto, e redução nos pesos de lagartas e pupas de *S. eridania*.

2.5. Fatores que podem influenciar a expressão de resistência nas plantas

Por se tratar de um caráter genético, a resistência em plantas se manifesta sob determinadas condições, e, portanto, diversos são os fatores que podem influenciar sua expressão, negativa ou positivamente. Entre esses fatores, podem-se destacar aqueles inerentes às plantas (idade, parte, enxertia, etc.), ao inseto (idade, espécie, biótipo, densidade populacional, condicionamento pré-imaginal, etc.) e ao ambiente (umidade, temperatura, nutrientes do solo, fotoperíodo, etc.) (SMITH, 2005).

Portanto, para a realização de testes visando à avaliação de genótipos de plantas quanto à resistência a um determinado inseto, as condições empregadas nos ensaios devem ser criteriosamente confiáveis a fim de que, um genótipo que realmente apresente genes que expressem alguma característica fenotípica, física, química ou morfológica, se manifeste sob aquelas condições. É importante salientar que, as metodologias de pesquisa empregadas nos testes de resistência de plantas devem ser previamente avaliadas em função do inseto a ser utilizado nos testes de seleção ou *screening*, elaborando-se assim protocolos específicos para cada inseto e cultura. Essa prática tem a finalidade de descartar o uso de técnicas e métodos usados em estudos com diferentes insetos e plantas alvos, o que pode levar a conclusões errôneas sobre a resistência dos genótipos testados

Em relação aos fatores da planta, alguns estudos avaliaram o uso de folhas inteiras ou partes do tecido vegetal na resistência a insetos. Por exemplo, Raina, Benepal e Sheikh. (1980) não observaram qualquer diferença no consumo do besouro mexicano *E. varivestis* entre folhas intactas ou excisadas de feijoeiro. Em outro trabalho, East et al. (1992) compararam entre os tratamentos discos foliares e folhas inteiras de melão ao ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), e concluíram que os discos foliares podem ser utilizados acuradamente em testes de resistência ao ácaro.

Ao avaliarem a preferência para oviposição de *S. frugiperda* em algodoeiro com diferentes idades em teste com chance de escolha, Boiça Júnior et al. (2013a) verificaram maior número de posturas em plantas com 60 dias, e concluiu que essa idade é mais adequada para a condução de testes visando à avaliação da não preferência para oviposição em algodoeiro em comparação com plantas com 30, 45, 75 e 90 dias.

Em soja, folhas mais novas e mais próximas ao ápice das plantas foram preferidas para a alimentação de *H. zea* (MCWILLIAMS; BELAND, 1977). As folhas mais próximas do ápice de plantas de uma cultivar resistente de soja também foram mais preferidas por lagartas de *C. includens* (REYNOLDS; SMITH, 1985).

Entre os fatores inerentes ao inseto, a densidade populacional a ser utilizada nos experimentos é de fundamental importância na seleção de genótipos, e o procedimento do ensaio só será efetivo com o nível ótimo de infestação artificial, uma vez que densidades muito altas ou muito baixas podem não proporcionar manifestação visível da resistência em genótipos que realmente apresentem tais características, não os distinguindo dos suscetíveis (HARRIS, 1979).

A privação de alimento aos insetos previamente à condução de ensaios nos quais os mesmos são infestados artificialmente é comumente realizada em testes de resistência de plantas (PANDA; KHUSH, 1995). Entretanto, talvez esta não seja a melhor metodologia a ser empregada para todos os ensaios, devendo cada caso ser estudado em particular para se evitar conclusões precipitadas e descartar genótipos com características de resistência. Saxena (1967), avaliando a atratividade de *Dysdercus koenigii* (Fabricius) a extratos de sementes de algodoeiro, verificou que a atratividade do inseto aumentou proporcionalmente em função do tempo que o percevejo permaneceu sem alimento antes dos testes.

Além da variação inerente à planta e ao inseto, a avaliação da resistência de plantas também está sujeita às variações causadas por efeitos ambientais, incluindo temperatura, umidade relativa do ar ou do solo, fotoperíodo, nutrientes do solo, entre outros. No entanto, as influências individuais desses fatores na expressão da resistência praticamente só podem ser mensuradas em experimentos de laboratório, já que em casa de vegetação e campo as condições dos fatores abióticos são oscilantes ao longo do tempo, sendo impossível avaliar cada um separadamente.

Com o objetivo de avaliar o comportamento de 19 cultivares de feijoeiro-comum a *Caliothrips phaseoli* (Hood) (Thysanoptera: Thripidae), ensaios foram conduzidos na mesma área experimental em Jaboticabal, SP, em três épocas de semeadura consecutivas. Souza et al. (2010) e Souza et al. (2011) observaram que todas as cultivares foram suscetíveis ao ataque de ninfas e adultos do tripses nas épocas “de inverno” e “da seca”, respectivamente, enquanto Peixoto et al. (2011) concluíram que IAC Harmonia e IAC Formoso foram as cultivares menos atacadas por ninfas e BRS Pontal e IPR Siriri foram as menos infestadas por adultos de *C. phaseoli*. Estes resultados evidenciam a influência dos fatores abióticos temperatura, umidade relativa e índices pluviométricos na manifestação da resistência à praga em estudo, uma vez que os experimentos foram realizados no mesmo local e com as mesmas metodologias.

2.6. Possíveis mecanismos responsáveis pela resistência nas plantas

2.6.1. Concentração de flavonoides

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos que não são essenciais para o crescimento das plantas, e são geralmente produzidos como subprodutos durante a síntese dos compostos do metabolismo primário (HERBERT, 1989). Os metabólitos secundários apresentam diversas funções para as plantas, como transporte e armazenamento de nitrogênio, proteção à radiação ultravioleta, atraentes de polinizadores e dispersores de sementes (WINK, 1999), e defesa contra fitopatógenos e herbívoros (THEIS; LERDAU, 2003; MAO et al., 2007).

Os compostos secundários de defesa das plantas pertencem geralmente a três grupos: compostos fenólicos, terpenoides e compostos nitrogenados (CHEN, 2008). Os flavonoides são compostos fenólicos que ocorrem em diversas espécies de plantas (HARBORNE, 1967). Entre suas funções incluem a proteção contra insetos, patógenos, e radiação ultravioleta, são atraentes para polinizadores, moduladores hormonais, inibidores enzimáticos, antioxidantes e agentes alelopáticos (MARKHAM, 1989). Os avanços no conhecimento sobre os papéis dos flavonoides para as plantas de importância agrícola e medicinal têm estimulado

melhoristas de plantas a aumentar os níveis de flavonoides nessas culturas por métodos convencionais e transgenia (JOHNSON; FELTON, 2001).

Várias plantas apresentam uma ampla gama de flavonoides, e geralmente os perfis desses compostos fenólicos em plantas diferem entre famílias, gêneros e espécies de plantas (HARBORNE; TURNER, 1984). Assim, pelo fato de os insetos fitófagos apresentarem diferenças em sua preferência entre famílias taxonômicas, sugere-se que os flavonoides desempenham importante papel na seleção hospedeira pelos insetos (SIMMONDS, 2001). Diversos estudos já demonstraram os efeitos de diversos flavonoides na alimentação, oviposição e biologia de várias espécies de insetos fitófagos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; SIMMONDS, 2001; SIMMONDS, 2003).

Muitos flavonoides, constitutivos (HOFFMANN-CAMPO, 1995) ou induzidos (KOGAN; FISCHER, 1991), já foram identificados em diversas estruturas de plantas de soja. Embora várias lagartas de espécies especialistas de lepidópteros sejam adaptadas aos flavonoides presentes nas plantas para uso em sua dieta alimentar, outras espécies generalistas são sensíveis a esses compostos secundários (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Assim, em soja, os flavonoides podem atuar como atraentes, deterrentes, repelentes ou tóxicos aos insetos, dependendo de sua concentração na planta (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; SIMMONDS, 2001).

2.6.2. Concentração de nutrientes

Os nutrientes inorgânicos ou sais minerais são elementos necessários para o bom desenvolvimento das plantas, cuja concentração varia em uma faixa muito ampla entre as espécies vegetais. De acordo com sua concentração usual nas plantas, os nutrientes inorgânicos podem ser classificados como macro ou micronutrientes. Os macronutrientes são necessários em grandes quantidades pelas plantas, enquanto os micronutrientes são utilizados em pequenas quantidades (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

A exigência nutricional dos insetos é diversificada, tanto inter quanto intraespecífica, podendo variar de acordo com a idade, sexo ou função desempenhada na população. Em geral, os insetos necessitam em sua dieta de

aminoácidos, proteínas, lipídios, esteróis, carboidratos, vitaminas e sais minerais (FORTES, 2005). Além disso, a quantidade necessária desses nutrientes varia de acordo com a relação proteína: carboidrato ou carboidrato: ácidos graxos no substrato alimentar (LARA, 1991).

Os sais minerais estão relacionados às mais diversas funções nos insetos, tais como balanço iônico, permeabilidade de membranas, ativação de enzimas e constituição estrutural de alguns pigmentos (PARRA, 1986). Assim, entre os mecanismos responsáveis pelas características químicas da planta, os macro (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) exercem importante papel não apenas para o crescimento, mas também para sua defesa contra insetos e patógenos (SPAN; SCHUMANN, 2010).

Esses componentes nutricionais dos insetos estão presentes em diferentes quantidades nas plantas, havendo ainda diferenças dentro da mesma espécie devido a características intrínsecas ou extrínsecas (LARA, 1991). Assim, quando a concentração de nutrientes está desbalanceada em uma determinada planta, não satisfazendo o inseto nutricionalmente, a planta pode apresentar uma vantagem na sua interação com o herbívoro.

2.7. Resistência induzida

A resistência induzida já foi documentada em mais de 100 espécies de plantas, incluindo tomate (THALER et al., 1996), arroz (HAMM; STOUT; RIGGIO, 2010), trigo (EL-WAKEIL; VOLKMAR; SALLAM, 2010) e soja (LIN; KOGAN, 1990). Nesta leguminosa, a resistência induzida afeta negativamente a preferência alimentar e desenvolvimento de insetos (LIN; KOGAN, 1990; KOGAN; FISCHER, 1991). Apesar de os processos bioquímicos serem complexos e ainda não estarem totalmente elucidados, a indução de resistência em soja provavelmente ocorre devido a alterações nas atividades de fitoalexinas e inibidores de proteinases após herbivoria (UNDERWOOD; RAUSHER; COOK, 2002) por diversas espécies de pragas (LIN; KOGAN, 1990; BI; FELTON; MUELLER, 1994; SRINIVAS et al., 2001; FORTUNATO et al., 2007).

Os processos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem nas plantas podem sofrer alterações após injúria mecânica, herbivoria, infecção por patógenos e radiação ultravioleta (BALDWIN; SCHUTZ, 1985; LIN; KOGAN, 1990; CONCOMI et al., 1996), e essa alteração pode resultar em mudanças na qualidade dos tecidos vegetais para os insetos fitófagos (COLEMAN; JONES, 1991). Presume-se que as diferenças nas respostas induzidas pelos tipos de injúria são devido aos distintos sinais gerados no local injuriado, e podem ser desencadeados por fragmentos da parede celular da planta (RYAN et al., 1985), fatores da saliva dos insetos (LIN; KOGAN; FISCHER, 1990; STOUT; WORKMAN; DUFFEY, 1994), ou microrganismos associados ao seu aparelho bucal (GRISHAM, et al., 1987).

A indução da resistência deve ser resultado da complexa ação combinada da ativação e supressão de enzimas oxidativas, e também de seus produtos finais (STOUT; WORKMAN; DUFFEY, 1994). Os precursores de flavonoides são sintetizados a partir de reações químicas na via do chiquimato, principal via metabólica que resulta na produção de compostos aromáticos em plantas (FLOSS, 1980). As enzimas peroxidase (POX) e polifenol oxidase (PPO) catalisam a oxidação de compostos fenólicos para quinonas, as quais são tóxicas para microrganismos e insetos (STOUT; WORKMAN; DUFFEY, 1994). Além disso, a POX está associada à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres, que também apresentam propriedades antibióticas (ELSTNER, 1980). Quinonas alquilam aminoácidos, resultando na redução da digestibilidade e valor nutricional das proteínas da planta (FELTON et al., 1992). A POX também participa na formação de lignina, que atua na reestruturação dos tecidos danificados (BOSTOCK; STERMER, 1989). O aumento de sua atividade é relacionado com a indução de resistência de plantas a insetos fitófagos (SHUKLE; MURDOCK, 1983; FELTON et al., 1992).

Os compostos fenólicos representam um dos maiores grupos de substâncias secundárias do reino vegetal (BOUDET, 2007). Entre os compostos fenólicos destacam-se os flavonoides, isoflavonoides, taninos, ligninas, antocianinas, fitoalexinas, flavonas, gliceolinas, etc. (BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010). Os compostos fenólicos são produzidos em uma das seguintes vias metabólicas nas plantas: via do chiquimato/corismato, via do acetato/malonato e via do acetato/mevalonato (BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010). A síntese e

acumulação de compostos secundários nas plantas podem ser influenciadas por vários fatores bióticos e abióticos, tais como injúria, seca e infecção por patógenos (KEFELI; KALEVITCH, BORSARI, 2003).

Inibidores de proteinases são proteínas que participam como substâncias constitutivas e induzidas de defesa nos tecidos vegetais contra insetos e patógenos (RYAN, 1990). Eles são geralmente específicos para as classes de proteinases, e dependem do tipo de proteinase presente no intestino do inseto, de modo que o inibidor de proteinase possa se ligar à proteinase e inibir sua atividade proteolítica (WOLFSON, 1991).

Visto a importância das informações acima descritas, nos três capítulos subsequentes foram avaliados alguns fatores que podem influenciar a expressão da resistência em soja às lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, além de determinados mecanismos químicos possivelmente envolvidos na resistência constitutiva e induzida.

3. Referências

ALI, A.; LUTTREL, R. G.; PITRE, H. N. Feeding sites and distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on cotton. **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, n. 4, p. 1060-1067, 1990.

ALI, A.; LUTTREL, R. G.; PITRE, H. N.; DAVIS, F. M. Distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses on cotton. **Environmental Entomology**, College Park, v. 18, n. 5, p. 881-885, 1989.

ÁVILA, C. J.; DEGRANDE, P. E.; GÓMEZ, S. A. Insetos-pragas: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In: EMBRAPA. **Milho**: informações técnicas. Dourados: Embrapa-CPAO, 1997. 177 p.

BALDWIN, I. T.; SCHULTZ, J. C. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. **Science**, Madison, v. 221, p. 277-278, 1985.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B. História de vida de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodoeiro, milho, milheto e soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 7, 2009, Foz do Iguaçu. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. p. 433-440.

BEACH, R. M.; TODD, J. W. Foliage consumption and development parameters of the soybean looper and the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) reared on susceptible and resistant soybean genotypes. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 81, n. 1, p. 310-316, 1988a.

BEACH, R. M.; TODD, J. W. Oviposition preference of the soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) among four soybean genotypes differing in larval resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 81, n. 1, p. 344-348, 1988b.

BEACH, R. M.; TODD, J. W.; BAKER, S. H. Antibiosis of four insect-resistant soybean genotypes to the soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 14, n. 4, p. 531-534, 1985.

BELAND, G. L.; HATCHETT, J. H. Expression of antibiosis to the bollworm in two soybean genotypes. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, p. 557-560, 1976.

BERGAMIN, M.; CANCIAN, M. A. E.; CASTRO, P. R. C. Soja (*Glycine max* (L.) Merrill). In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (Eds.). **Ecofisiologia de cultivos anuais**: trigo, milho, soja, arroz, mandioca. São Paulo: Nobel, 1999. p. 73-89.

BHATTACHARYA, A.; SOOD, P.; CITOVSKY, V. The role of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 5, p. 705-719, 2010.

BI, J. L.; FELTON, G. W.; MUELLER, A. J. Induced resistance in soybean to *Helicoverpa zea*: role of plant protein quality. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 183-198, 1994.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; CAMPOS, Z. R.; CAMPOS, A. R.; VALÉRIO FILHO, W. V.; CAMPOS, O. R. *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton: vertical distribution of egg masses, effects of adult density and plant age on oviposition behavior. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 4, p. 424-429, 2013a.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SANTOS, T. M.; TOLEDO, M. A. Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em genótipos de milho. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 80, p. 148-158, 2006.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; LOPES, G. S.; COSTA, E. N.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I. Atualidades em resistência de plantas a insetos. In: BUSOLI, A. C.; ALENCAR, J. R. D. C. C.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A.; SOUZA, B. H. S.; GRIGOLLI, J. F. J. (Eds.). **Tópicos em entomologia agrícola – VI**. Jaboticabal: Gráfica Multipress, 2013b. p. 207-224.

BOLDT, P. E.; BIEVER, R.; IGNOFFO, C. M. Lepidopteran pests of soybean: consumption of soybean foliage and pods and development. **Journal of Economic Entomology**, New York, v. 68, n. 4, p. 480-482, 1975.

BOSTOCK, R. M.; STERMER, B. A. Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 343-371, 1989.

BOUDET, A. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2722-2735, 2007.

CAMPOS, Z. R. **Resistência de variedades de algodoeiro a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2008. 67 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Concentração: Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

CHEN, M. S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. **Insect Science**, v. 15, p. 101-114, 2008.

CLARK, W. J.; HARRIS, F. A.; MAXWELL, F. G.; HARTWIG, E. E. Resistance of certain soybean cultivars to bean leaf beetle, striped blister beetle, and bollworm. **Crop Science**, Madison, v. 65, p. 1669-1672, 1972.

COLEMAN, J. S.; JONES, C. G. A phyto-centric perspective of phytochemical induction by herbivores. In: TALLAMY, D. W.; RAUPP, M. J. (Eds.). **Phytochemical induction by herbivores**. New York: Wiley, 1991. p. 3-45.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto/2014**. Brasília: Conab, 2014. 84 p.

CONCOMI, A.; SMERDON, M. J.; HOWE, G. A.; RYAN, C. A. The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. **Nature**, London, v. 383, p. 826-829, 1996.

CONTI, L.; WADDILL, V. Development of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) on several winter hosts. **Environmental Entomology**, College Park, v. 11, n. 5, p. 1112-1113, 1982.

COSTA, E. N.; RIBEIRO, Z. A.; SOUZA, B. H. S.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Oviposition preference assessment of *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) for different soybean genotypes. **International Journal of Pest Management**, London, v. 60, n. 1, p. 52-58, 2014a.

COSTA, E. N.; SOUZA, B. H. S.; BARBOSA, J. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Antibiosis resistance of soybean genotypes to *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae). **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 9, n. 14, p. 1130-1134, 2014b.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1995. 45 p. (Circular Técnica, 21).

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, C. A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different mayze genotypes cultivated in soil under three levels of aluminum saturation. **Journal of Integrated Pest Management**, London, v. 45, n.2, p. 293-296, 1999.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; SANTOS, J. P.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. **Manual de identificação de pragas da cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 1997. 67 p.

DOUGLAS, N. A. The velvetbean caterpillar as a pest of soybeans in southern Louisiana and Texas. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, v. 23, n. 4, p. 683-690, 1930.

EAST, D. A.; EDELSON, J. V.; COX, E. L.; HARRIS, M. K. Evaluation of screening methods and search for resistance in muskmelon, *Cucumis melo* L., to the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. **Crop Protection**, Guildford, v. 11, p. 39-44, 1992.

ELLISOR, L. O. Notes on the biology and control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hbn. **Louisiana Agricultural Experimental Station Bulletin**, Louisiana, v. 350, p. 17-23, 1942.

ELSTNER, E. F. Metabolism of activated oxygen species. In: DAVIES, D. D. (Ed.). **The biochemistry of plants**. A comprehensive treatise. v. 11. Biochemistry and metabolism. New York: Academic Press, 1980. p. 253-315.

EL-WAKEIL, N. E.; VOLKMAR, C.; SALLAM, A. A. Jasmonic acid induces resistance to economically important insect pests in winter wheat. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 549-554, 2010.

EMBRAPA. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 70 p.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – Paraná 2005**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 224 p.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil 2004**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 237 p.

FEHR, W. R.; CAVINES, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. 11 p. (Special Report, 80).

FELTON, G. W.; DONATO, K. K.; BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 38, p. 277-285, 1992.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

FLOSS, H. G. The shikimate pathway. In: SWAIN, T.; HARBORNE, J. B.; VAN SUMERE, C. F. (Eds.). **Recent advances in phytochemistry**. Vol. 2. Biochemistry of plant phenolics. New York: Plenum, 1980. p. 59-89.

FORD, B. J.; STRAYER, J. R.; REID, J.; BLOUNT, V. N.; RIDDLE, T. C. **The literature of arthropods associated with soybean, a bibliography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)**. Urbana: Illinois National History Survey, 1975, 15 p. (Biological Notes, 92).

FORTES, P. **Desenvolvimento de uma dieta artificial para a criação de *Nezara viridula* (L., 1758) e *Euschistus heros* (F., 1798) e sua relação com *Trissolcus basalıs* (Wollaston, 1858)**. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Entomologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FORTUNATO, F. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; BRUMANO, M. H. N.; SILVA, C. H. O.; GUEDES, R. N. C.; MOREIRA, M. A. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 80, p. 241-247, 2007.

FUGI, C. G. Q. **Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 em genótipos de soja com diferentes graus de resistência a insetos**. 2003. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical – Área de Concentração: Tecnologia da Produção Agrícola) – Instituto Agronômico, Campinas, 2003.

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

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; 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. 920 p.

GAMUNDI, J. C. **Biologia comparada e nutrição quantitativa de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas e vagens de soja**. 1988. 137 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

GAZZONI, D. L. **Alimentos funcionais**. Disponível em: <http://dlgazzonei.sites.uol.com.br/alimentos_funcionais.htm>. Acesso em: 2 ago. 2011.

GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B.; CORSO, I. C.; FERREIRA, B. S. C.; VILLAS BOAS, G. L.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R. **Manejo de pragas da soja**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1988. 44 p. (Circular Técnica).

GONÇALVES, H. M.; SILVA, R. F. P. Avaliação de resistência de soja *Glycine max* (L.) Merr. A insetos mastigadores. **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v. 14, n. 1, p. 69-75, 1978.

GREENE, G. L.; REID, J. C.; BLOUNT, V. N.; RIDDLE, T. C. Mating and oviposition of the velvetbean caterpillar in soybeans. **Environmental Entomology**, College Park, v. 2, n. 6, p. 1113-1115, 1973.

GRISHAM, M. P.; STERLING, W. L.; POWELL, R. D.; MORGAN, P. W. Characterization of the induction of stress ethylene synthesis in cotton caused by the cotton fleahopper (Hemiptera: Miridae) and its microorganisms. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 80, p. 411-416, 1987.

HAMM, J. C.; STOUT, M. J.; RIGGIO, R. M. Herbivore- and elicitor-induced resistance in rice to the rice water weevil (*Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel) in the

laboratory and field. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 36, p. 191-199, 2010.

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

HARBORNE, J. B.; TURNER, L. **Plant chemosystematics**. London: Academic Press, 1984. 562 p.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, New York, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARRIS, M. K. Arthropod-plant interactions related to agriculture, emphasizing host plant resistance. In: HARRIS, M.K. (Ed.). **Biology and breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants**. College Station: Texas A & M University, 1979. p. 23-51.

HATCHETT, J. H.; BELAND, G. L.; HARTWIG, E. E. Leaf-feeding resistance to bollworm and tobacco budworm in three soybean plant introductions. **Crop Science**, Madison, v. 16, p. 277-280, 1976.

HERBERT, R. B. **The biosynthesis of secondary metabolites**. 2. ed. London: Chapman and Hall, 1989. 232 p.

HERZOG, D. C.; TODD, J. W. Sampling velvetbean caterpillar on soybean. In: KOGAN, M.; HERZOG, D. C. (Ed.). **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer-Verlag, 1980. p. 107-140.

HICKS, D. R. Growth and development. In: NORMAN, A. G. (Ed.). **Soybean, physiology, agronomy, and utilization**. Academic Press: London, 1978. p. 17-41.

HINDS, W. E.; OSTERBERGER, B. A. The soybean caterpillar in Louisiana. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, v. 24, n. 6, p. 1168-1173, 1931.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusi ni* (Hübner)**. 1995. 165 f. Tese (Doutorado em Botânica) – The University of Reading, Reading, 1995.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; HARBORNE, J. B.; MCAFERRY, A. R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 98, p. 181-194, 2001.

JESUS, F. G. **Resistência de cultivares de algodoeiro sobre *Spodoptera frugiperda* e *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae) e efeito na biologia e comportamento de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae)**. 2009. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Concentração: Entomologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

JOHNSON, K. S.; FELTON, G. W. Plant phenolics as dietary antioxidants for herbivorous insects: a test with genetically modified tobacco. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 27, p. 2579-2597, 2001.

JORGE, N.; SOARES, B. B. P.; LUNARDI, V. M.; MALACRIDA, C. R. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 947-951, 2005.

KEFELI, V. I.; KALEVITCH, M. V.; BORSARI, B. Phenolic cycle in plants and environment. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 13-18, 2007.

KING, A. B. S.; SAUNDERS, J. L. **The invertebrate pests of annual food crops in Central America**. London: Overseas Development Administration, 1984. 166 p.

KOGAN, M.; FISCHER, D. C. Inducible defenses in soybean against herbivorous insects. In: TALLAMY, D. W.; RAUPP, M. J. (Eds.). **Phytochemical induction by herbivores**. New York: Wiley, 1991. p. 347-378.

KOGAN, M.; TURNIPSEED, S. G. Ecology and management of soybean arthropods. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 32, p. 507-538, 1987.

LABRADOR, J. R. **Estudio de la biología y combate del gusano cogollero del maíz *Laphygma frugiperda* S. & A.** Maracaibo: Universidad del Zulia, 1967. 83 p.

LAMBERT, L.; KILEN, T. C. Influence of three soybean plant genotypes and their F1 intercrops on the development of five insect species. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 622-625, 1984.

LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.

LEAL, J. C. **Plantas da lavoura sul rio-grandense**. Porto Alegre: UFRGS, 1967. 274 p.

LEPPLA, N. C. Circadian rhythms of locomotion and reproductive behavior in adult velvetbean caterpillar. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 69, n. 1, p. 45-48, 1976.

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, p. 217-220, 1977.

LIMA, A. C. S.; LARA, F. M. Resistência de genótipos de soja à mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 71-75, 2004.

LIN, H.; KOGAN, M. Influence of induced resistance in soybean on the development and nutrition of the soybean looper and the Mexican bean beetle. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 55, p. 131-138, 1990.

LIN, H.; KOGAN, M.; FISCHER, D. Induced resistance in soybean to the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae): comparison of inducing factors. **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, p. 1852-1857, 1990.

LOURENÇÃO, A. L. RECO, P. C.; BRAGA, N. R.; VALLE, G. E.; PINHEIRO, J. B. Produtividade de genótipos de soja sob a infestação da lagarta-da-soja e percevejos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 275-281, 2010.

LUCCHINI, F. **Biologia de *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). Níveis de prejuízos e avaliação toxicológica de inseticidas para seu combate em milho.** 1977. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1977.

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

LUGINBILL, P. H. The fall armyworm. **Technical Bulletin United States Department of Agriculture**, Washington, v. 34, p. 1-91, 1928.

MAGRINI, E. A.; SILVEIRA NETO, S.; PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M. Biologia e exigências térmicas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 513-519, 1996.

MAO, J.; BURT, A. J.; RAMPUTH, A. L.; SIMMONS, J.; CASS, L.; HUBBARD, K.; MILLER, S.; ALTOSAAR, I.; ARNASON, J. T. Diverted secondary metabolism and

improved resistance to European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) in maize (*Zea mays* L.) transformed with wheat oxalate oxidase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 2582-2589, 2007.

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

MCWILLIAMS, J. M.; BELAND, G. L. Bollworm: effect of soybean leaf age and pod maturity on development in laboratory. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 70, p. 214-216, 1977.

MIRANDA, J. E. **Distribuição vertical de lagartas de *Spodoptera frugiperda* no algodoeiro**. Campina Grande: EMBRAPA/CNPA, 2006. 4 p. (Comunicado Técnico, 277).

MIRANDA, J. E.; FERREIRA, A. C. B. Contra-ataque. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, p. 7-10, 2005.

MOSCARDI, F. **Effect of soybean crop phenology on development, leaf consumption and oviposition of *Anticarsia gemmatilis* Hübner**. 1979. 139 p. Thesis (Ph.D.) – University of Florida, Gainesville, 1979.

MOSCARDI, F.; BARFIELD, C. S.; ALLEN, G. E. Consumption and development of velvetbean caterpillar as influenced by soybean phenology. **Environmental Entomology**, College Park, v. 10, n. 6, p. 880-884, 1981.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Eds.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 213-334.

MULLER, L. Morfologia, anatomia e desenvolvimento. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Eds.). **A soja no Brasil**. Campinas: IAC, 1981. p. 73-104.

NANTES, J. F. D.; GRICOLETTI, R.; CAMPOS, E. M. B. Biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja, *Glycine max* (L.) Merrill. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 7, n. 2, p. 171-174, 1978.

NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Estádios de desenvolvimento da cultura da soja. In: BONATO, E. R. (Ed.). **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. p. 21-44.

PANDA, N.; KUSH, G. S. **Host plant resistance to insects**. Wallingford: CAB/International Rice Research Institute, 1995. 431 p.

PANIZZI, A. R. Manejo Integrado de Pragas no Brasil. In: CROCOMO, W. D. (Ed.). **Manejo Integrado de Pragas**. São Paulo: Ícone, 1990. p. 293-321.

PANIZZI, A. R.; CORREA-FERREIRA, B. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. **Trends in Entomology**, Trivandrum, v. 1, p. 71-88, 1997.

PAPA, G.; CELOTO, F. J. Inseticida ao dessecar? **Revista Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v. 143, p. 22-24, 2011.

PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. IN: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Eds.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1986. p. 9-65.

PATEL, P. N. **Estudos de fatores bióticos de controle natural de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 1981. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de Campinas, Campinas, 1981.

PEIXOTO, M. L.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SILVA, A. G.; SOUZA, B. H. S.; RODRIGUES, N. E. L.; CHIORATO, A. F. Infestação de *Caliothrips phaseoli* (Hood.) (Thysanoptera: Thripidae) em genótipos de feijoeiro na safra das águas, em Jaboticabal-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOSSANIDADE, 1, 2011, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 2011. CD-ROM.

PITRE, H. N.; MULROONEY, J. E.; HOGG, D. B. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition: crop preferences and egg distribution on plants. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 76, p. 463-466, 1983.

PORTILLO, H. E.; PITRE, H. N. Effect of four soybean genotypes on the development and fecundity of *Heliothis virescens* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 75, n. 3, p. 386-390, 1992.

RAINA, A. K.; BENEPAI, B. S.; SHEIKH, A. K. Effects of excised and intact leaf methods, leaf size, and plant age on Mexican bean beetle feeding. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 27, p. 303-306, 1980.

RAMIRO, Z. A.; OLIVEIRA, D. A. Influência da desfolhação artificial na produtividade da cultura da soja. **O Biológico**, São Paulo, v. 41, p. 97-104, 1975.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 738 p.

REICHERT, J. L.; COSTA, E. C. Desfolhamentos contínuos e sequenciais simulando danos de pragas sobre a cultivar de soja BRS 137. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 1-6, 2003.

REID, J. C. Larval development and consumption of soybean foliage by the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

in the laboratory. 1975. 118 p. Dissertation (Master of Science) – University of Florida, Gainesville, 1975.

REYNOLDS, G. W.; SMITH, C. M. Effects of leaf position, leaf wounding, and plant age of two soybean genotypes on soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) growth. **Environmental Entomology**, College Park, v. 14, p. 475-478, 1985.

RICIERI, J. A.; PASSOS, M. M.; SEBEM, M.; TURRA, S.; GOUVEA, A.; FELTRIN, G.; GUDOSKI, M.; MAZARO, S. M.; DONAZOLLO, J. O manejo de pragas da soja no sudoeste do Paraná: 2005-2006. **Synergismus Scientifica**, Pato Branco, v. 1, n. 1-4, p. 1-778, 2006.

ROGERS, D. J.; SULLIVAN, M. J. Nymphal performance of *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) on pest-resistant soybeans. **Environmental Entomology**, College Park, v. 15, p. 1032-1036, 1986.

RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 245-249, 1990.

RYAN, C. A.; BISHOP, P. D.; GRAHAM, J. S.; BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Plant and fungal cell wall fragments activate the expression of proteinase inhibitor genes for plant defense. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 12, p. 1025-1036, 1985.

SÁ, V. G. M.; FONSECA, B. V. C.; BOREGAS, K. G. B.; WAQUIL, J. M. Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 108-115, 2009.

SALAMINA, B. A. Z. **Bioecologia de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, para o controle de *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818, na cultura da soja**. 1997. 106 f.

Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

SANTOS, K. B.; NEVES, P.; MENEGUIM, A. M.; SANTOS, R. B.; SANTOS, W. J.; VILLAS BOAS, G.; DUMAS, V.; MARTINS, E.; PRAÇA, L. B.; QUEIROZ, P.; BERRY, C.; MONNERAT, R. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, Orlando, v. 50, n. 2, p. 157-163, 2009.

SAXENA, K. N. Some factors governing olfactory and gustatory responses in insects. In: HAYASHI, T. (Ed.). **Olfaction and Taste II**. Oxford: Pergamon Press, 1967. p. 799-820.

SHUKLE, R. H.; MURDOCK, L. L. Lypoxigenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 12, p. 787-791, 1983.

SILVA, A. G. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, N. M.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. Tomo I, Parte II, 622 p.

SILVA, J. P. G. F.; BALDIN, E. L. L.; CANASSA, V. F.; SOUZA, E. S.; LOURENÇÃO, A. L. Assessing antixenosis of soybean entries against *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 8, n. 4, p. 349-359, 2014.

SILVA, J. P. G. F.; BALDIN, E. L. L.; SOUZA, E. S.; CANASSA, V. F.; LOURENÇÃO, A. L. Characterization of antibiosis to the redbanded stink bug *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) in soybean entries. **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 4, p. 649-657, 2013.

SILVA, R. F. P. **Aspectos biológicos e nutrição de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera – Noctuidae) em meios natural e artificial e influência da temperatura e fotoperíodo no seu desenvolvimento.** 1981. 130 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1981.

SIMMONDS, M. S. J. Flavonoid insect-interactions: recent advances in our knowledge. **Phytochemistry**, New York, v. 64, p. 21-30, 2003.

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

SMITH, C. M. **Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches.** Dordrecht: Springer, 2005. 423 p.

SMITH, C. M.; GILMAN, D. F. Comparative resistance of multiple insect-resistance soybean genotypes to the soybean looper. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 74, p. 400-403, 1981.

SOUZA, B. H. S.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; JANINI, J. C.; SILVA, A. G.; RODRIGUES, N. E. L. Feeding of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean genotypes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 38, n. 2, p. 215-223, 2012.

SOUZA, B. H. S.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SILVA, A. G.; RODRIGUES, N. E. L.; JANINI, J. C.; CARBONEL, S. A. M. Efeito de genótipos de feijoeiro sobre a infestação de *Caliothrips phaseoli* (Hood.) (Thysanoptera: Thripidae) na safra de inverno, em Jaboticabal, SP. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS, DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS DO FEIJOEIRO, 7, 2010, Campinas. **Documentos IAC, 95.** Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2010.

SOUZA, B. H. S.; SILVA, A. G.; JANINI, J. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Antibiosios in soybean genotypes and the resistance levels to *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 43, n. 6, p. 582-587, 2014.

SOUZA, B. H. S.; SILVA, A. G.; RODRIGUES, N. E. L.; COSTA, E. N.; CHIORATO, A. F.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Efeito de cultivares de feijoeiro sobre o ataque de *Caliothrips phaseoli* (Hood) (Thysanoptera: Thripidae) na safra “da seca”, em Jaboticabal-SP. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 10, 2011, Goiânia. **Anais...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2011. CD-ROM.

SOUZA, E. S.; BALDIN, E. L. L.; SILVA, J. P. G. F.; LOURENÇÃO, A. L. Feeding preference of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) and attractiveness of soybean genotypes. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago de Chile, v. 73, n. 4, p. 351-357, 2013.

SPAN, T. M.; SCHUMANN, A. W. **Mineral nutrition contributes to plant disease and pest resistance**. University of Florida document HS1181, 2010. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>.

SRINIVAS, P.; DANIELSON, S. D.; SMITH, M. C.; FOSTER, J. E. Cross-resistance and resistance longevity as induced by bean leaf beetle, *Cerotoma trifurcata* and soybean looper, *Pseudoplusia includens* herbivory on soybean. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 1, p. 1-5, 2001.

STOUT, M. J. Reevaluating the conceptual framework for applied research on host-plant resistance. **Insect Science**, v. 20, p. 263-272, 2013.

STOUT, M. J.; WORKMAN, J.; DUFFEY, S. S. Differential induction of tomato foliar proteins by arthropod herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 10, p. 2575-2594, 1994.

TARRAGÓ, M. F. S.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, S.; BARBIN, D. Influência de fatores ecológicos na flutuação populacional das lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, e *Rachiplusia nu* (Guen.) em Santa Maria-RS. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 180-193, 1977.

THALER, J. S.; STOUT, M. J.; KARBAN, R.; DUFFEY, S. S. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, p. 1767-1781, 1996.

THEIS, N.; LERDAU, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. **International Journal of Plant Science**, v. 164, p. S93-S102, 2003.

TUART, L. D.; ROSE, I. A. Resistance to *Heliothis armigera* and *Heliothis punctigera* in three soybean lines. **Soybean Genetics Newsletter**, Columbia, v. 6, p. 12-14, 1979.

TURNIPSEED, S. G.; SULLIVAN, M. J. Plant resistance in soybean insect management. In: HILL, L. D. (Ed.). **World Soybean Research**. Danville: The Interstate Printers and Publishers Inc., 1976. p. 549-560.

UNDERWOOD, N.; RAUSHER, M.; COOK, W. Bioassay versus chemical assay: measuring the impact of induced and constitutive resistance on herbivores in the field. **Oecologia**, Berlin, v. 131, p. 211-219, 2002.

VANDUYN, J. W.; TURNIPSEED, S. G.; MAXWELL, J. D. Resistance in soybeans to the Mexican bean beetle. **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 572-573, 1971.

VAN DUYN, J. W.; TURNIPSEED, S. G.; MAXWELL, J. D. Resistance in soybean to the Mexican beetle to resistant plants. II. Reaction to the beetle to resistant plants. **Crop Science**, Madison, v. 12, n. 5, p. 561-562, 1972.

VELOSO, E. S. **Resistência de cultivares de soja a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração: Sistemas de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2010.

VELOSO, V. R. S.; PARRA, J. R. P.; NAKANO, O. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodoeiro e milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 12/13, n. 1, p. 127-140, 1983.

VIANA, P. A.; POTENZA, M. R. Avaliação de antibiose e não-preferência em cultivares selecionados com resistência à lagarta-do-cartucho. **Bragantia**, Campinas, v. 59, p. 27-33, 2000.

VIVAN, L. As espécies inimigas da soja. **A Granja**, Porto Alegre, v. 66, n. 743, p. 40-42, 2010.

VOLMANN, J.; GRAUSGRUBER, H.; WAGENTRISTL, H.; WOHLESER, H.; MICHELE, P. Trypsin inhibitor activity of soybean as affected by genotype and fertilisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, p. 1581-1586, 2003.

WALKER, D. R.; ALL, J. N.; MCPHERSON, R. M.; BOERMA, H. R.; PARROTT, W. A. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cry1Ac* transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 613-622, 2000.

WATSON, J. R. Life-history of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner. **Journal of Economic Entomology**, New York, v. 9, p. 521-528, 1916.

WILLE, J. E. **Entomologia agricola del Peru**. Lima: Estacion Experimental Agrícola de la Molina, 1943. 468 p.

WINK, M. Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. In: WINK, M. (Ed.). **Annual Plant Reviews**, vol. 3. Sheffield: Sheffield Academic Press, 1999. 304 p.

WOLFSON, J. L. The effects of induced plant proteinase inhibitors on herbivorous insects. In: TALLAMY, D. W.; RAUPP, M. J. (Eds.). **Phytochemical induction by herbivores**. New York: John Willey & Sons, 1991. p. 223-244.

ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T.; MODESTO, E. C.; ALCADE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; SILVA, D. C.; SILVA, K. T.; FAUSTINO, J. O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 937-943, 2001.

CAPÍTULO 2 – Fatores que influenciam a expressão de antixenose em soja a *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*

Resumo - Os objetivos desse trabalho foram avaliar alguns fatores que influenciam a expressão da antixenose em genótipos de soja a *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Foram realizados testes de preferência alimentar com e sem chance de escolha com os genótipos de soja resistente IAC 100 e suscetível BRSGO 8360, utilizando-se lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*. Os seguintes fatores que podem influenciar a expressão da resistência foram avaliados: uma lagarta *versus* duas lagartas por disco foliar; uso de lagartas sem suspensão de alimentação *versus* com suspensão de alimentação por três horas antes do teste; disco foliar *versus* folíolo inteiro; parte superior *versus* parte inferior da planta; e, estágio vegetativo *versus* estágio reprodutivo. O nível de resistência expresso pelo genótipo IAC 100 é suficientemente alto para não ser afetado pelos diversos fatores avaliados na preferência alimentar de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* no presente estudo. Contudo, os resultados encontrados demonstram a importância de se conhecerem as condições ótimas para a condução de ensaios de preferência alimentar entre genótipos para cada espécie de inseto. A utilização de duas lagartas por disco foliar, sem suspensão de alimentação previamente aos ensaios, com discos foliares provenientes da parte superior das plantas em estágio reprodutivo proporciona a melhor diferenciação quanto à expressão de antixenose em genótipos de soja a *A. gemmatalis*. Para *S. frugiperda*, o uso de uma lagarta por disco, sem suspensão de alimentação, utilizando-se discos foliares provenientes da parte inferior das plantas em estágio reprodutivo proporcionou resultados mais adequados para testes de preferência alimentar.

Palavras-chave: lagarta-da-soja, lagarta-militar, metodologias de pesquisa, não preferência para alimentação, resistência de plantas

Factors influencing the expression of antixenosis in soybean to *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*

Abstract – This work aimed to evaluate some factors that influence the expression of antixenosis in soybean genotypes against *Anticarsia gemmatalis* Hübner and *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Free-choice and no-choice feeding assays were performed with the resistant soybean genotype IAC 100 and the susceptible genotype BRSGO 8360 using *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* larvae. The following factors that may affect expression of resistance were evaluated: one larva versus two larvae per leaf disc; use of larvae without feeding suspension versus larvae starved for three hours prior to the assay; leaf discs versus entire leaflets; upper part versus lower part of the plant; and, vegetative versus reproductive growth stages. The resistance level borne by the genotype IAC 100 is high enough to not be obscured by the effects of all factors assayed in the present study upon the feeding preference of *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* larvae. However, our results demonstrate the importance of knowing the optimal conditions for conducting an assay for evaluating resistance of genotypes for each insect species. Utilization of two larvae per leaf disc, not starved before the assays, with leaf discs from the upper part of plants at the reproductive growth stage provided better discrimination of differences in antixenosis expression in soybean genotypes for *A. gemmatalis*. For *S. frugiperda*, use of one larva per leaf disc, not starved before the assays, with leaf discs from the lower part of plants at the reproductive growth stage gave more adequate results for feeding preference tests.

Keywords: fall armyworm, feeding non-preference, host plant resistance, research methodologies, velvetbean caterpillar

1. Introdução

A lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) é uma espécie amplamente distribuída em regiões de clima tropical e subtropical (SILVA et al., 2012), com ocorrência desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (HOFFMANN-CAMPO et al., 2003). Essa espécie é considerada uma das principais pragas da cultura da soja nos Estados Unidos, México, Colômbia, Venezuela e Argentina (PANIZZI; CORREA-FERREIRA, 1997). No Brasil, a lagarta-da-soja destaca-se como uma das pragas-chave da cultura (MOSCARDI et al., 2012), causando altos níveis de desfolha nas plantas quando a densidade populacional é elevada (HOMRICH et al., 2008).

Outras lagartas que até então eram consideradas pragas secundárias têm ganho importância gradativa na cultura da soja durante as últimas safras, principalmente em função dos sistemas de cultivo, em áreas próximas ou sucessão, constituídos pelas culturas de algodão, soja e milho, as quais fornecem continuamente alimento aos insetos (SANTOS et al., 2009). Uma dessas espécies é a lagarta-militar *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), que, devido a seu hábito polífago (SANTOS et al., 2009), apresenta potencial de se tornar uma praga importante de soja (SÁ et al., 2009).

Entre os métodos de controle de pragas disponíveis, a resistência de plantas apresenta as vantagens de contribuir para a redução da população da praga abaixo do nível de dano econômico, não causar desequilíbrios no agroecossistema, proporcionar efeito cumulativo e persistente, não promover aumento nos custos de produção pelo uso de inseticidas, além de ser compatível com as demais táticas de controle do manejo integrado de pragas (BOIÇA JÚNIOR et al., 2013).

Diversos fatores bióticos ou abióticos podem influenciar negativa ou positivamente a expressão da resistência. Esses fatores incluem aqueles inerentes às plantas, ao inseto e ao ambiente (SMITH, 2005). Portanto, para a realização de testes visando à avaliação da resistência de genótipos de plantas, as metodologias empregadas nos ensaios devem ser criteriosamente controladas a fim de que um genótipo que apresente genes que expressem alguma característica física, química

e/ou morfológica, que confira resistência ao inseto se manifeste nas condições utilizadas.

Visto a importância de se validar previamente metodologias de pesquisa em testes de resistência de plantas e a falta de informações na literatura em soja com essas espécies de insetos, o presente trabalho objetivou avaliar alguns fatores que possam influenciar a expressão da resistência do tipo antixenose em genótipos de soja ao inseto oligófago *A. gemmatalis* e ao inseto polífago *S. frugiperda*.

2. Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos em Jaboticabal, SP, Brasil, entre dezembro de 2011 e abril de 2012, sob as condições de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e 12 horas de fotofase. As lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* utilizadas nos testes foram provenientes de populações mantidas em laboratório e criadas em dieta artificial, de acordo com a metodologia de Greene, Leppla e Dickerson (1976). Sementes de soja dos genótipos IAC 100 (altamente resistente) e BRSGO 8360 (altamente suscetível) (SOUZA et al., 2012), foram semeadas em vasos de 5 L de volume contendo solo (latossolo vermelho escuro eutrófico) (CENTURION et al., 1995) e areia (3:1), e acondicionadas em casa de vegetação, onde foram irrigadas sempre que necessário.

A menos que especificado, todos os ensaios utilizaram folhas da parte superior (os dois trifólios apicais) de plantas no estágio vegetativo (V5, aproximadamente 40 dias após a emergência) dos genótipos resistente e suscetível. Os experimentos avaliaram na seguinte ordem, cinco fatores que potencialmente influenciam os resultados de preferência alimentar: uma lagarta *versus* duas lagartas por disco foliar; uso de lagartas sem a suspensão de alimentação *versus* sem alimentação por três horas antes do teste; disco foliar *versus* folíolo inteiro; parte superior *versus* parte inferior da planta; estágio vegetativo *versus* estágio reprodutivo.

Os tratamentos de cada experimento foram constituídos de combinações fatoriais 2 x 2 de genótipos (resistente, IAC 100, e suscetível, BRSGO 8360) e os fatores sob investigação. Além disso, para cada fator e espécie de inseto avaliados

foram realizados testes com e sem chance de escolha. Assim, um total de 20 ensaios foram conduzidos, considerando-se um teste com chance e um teste sem chance de escolha para cada um dos cinco fatores investigados para cada espécie. Em todos os experimentos com e sem chance de escolha foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições para ambos.

Os experimentos foram iniciados dispondo-se os discos foliares e insetos em placas de Petri revestidas com papel filtro umedecido com água destilada. As folhas foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio (0,05%) e água corrente, e em seguida, foram preparados discos foliares de 2,5 cm de diâmetro com um vazador.

Para os testes com chance de escolha, os discos foliares (um para cada combinação genótipo-fator) foram dispostos em placas de Petri de 14,0 cm de diâmetro. Lagartas de quarto ínstar de *A. gemmatalis* ou de terceiro ínstar de *S. frugiperda* foram liberadas ao centro das placas, e após 24 horas da liberação a área foliar consumida foi quantificada utilizando-se um medidor de área foliar eletrônico LI-COR 3100A (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, EUA). Para os testes sem chance de escolha, apenas um disco foliar (representando cada uma das quatro combinações genótipos-fatores) foi disposto em cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro. Os testes sem chance de escolha foram conduzidos de maneira semelhante ao descrito anteriormente para os testes com chance de escolha.

2.1. Experimento 1: uma lagarta versus duas lagartas por disco foliar

O primeiro ensaio avaliou a utilização de (a) uma ou (b) duas lagartas de *A. gemmatalis* ou *S. frugiperda* por disco foliar, totalizando, dessa forma, duas ou quatro lagartas liberadas por placa no teste com chance de escolha, e uma ou duas lagartas por placa no teste sem chance de escolha.

2.2. Experimento 2: uso de lagartas sem suspensão de alimentação versus com suspensão de alimentação por três horas antes do ensaio

Baseando-se nos resultados obtidos no Experimento 1, os ensaios subsequentes utilizaram duas lagartas de *A. gemmatalis* ou uma lagarta de *S.*

frugiperda por disco. No segundo experimento, avaliou-se a preferência alimentar quando (a) as lagartas foram retiradas da dieta artificial na qual foram criadas e liberadas diretamente nas placas (sem suspensão de alimentação) ou (b) permanecidas sem se alimentar durante três horas antes de serem liberadas nas placas para o teste (com suspensão de alimentação). Neste último tratamento, as lagartas foram confinadas individualmente em placas de Petri previamente ao teste de preferência alimentar.

2.3. Experimento 3: disco foliar versus folíolo inteiro

A partir dos resultados encontrados no Experimento 2, todos os experimentos subsequentes utilizaram lagartas sem a suspensão de alimentação antes do ensaio para ambas as espécies de insetos. Nesse experimento foram avaliados os substratos de alimentação oferecidos às lagartas. Assim, os tratamentos consistiram de (a) discos foliares (2,5 cm de diâmetro) e (b) folíolos inteiros retirados das plantas.

2.4. Experimento 4: parte superior versus parte inferior da planta

Pelos resultados obtidos no Experimento 3, todos os ensaios subsequentes com *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* utilizaram discos foliares. Em seguida, foi avaliada a influência de diferentes partes da planta na expressão de antixenose nos genótipos de soja. Os tratamentos foram constituídos por (a) parte superior (os dois trifólios apicais) e (b) inferior das plantas (terceiro e quarto trifólios a partir do ápice). Para ambos, foram utilizadas plantas dos genótipos resistente e suscetível em estágio vegetativo (V5) (aproximadamente 40 dias após a emergência), coletando-se os folíolos da parte superior e inferior da mesma planta.

2.5. Experimento 5: estágio vegetativo versus estágio reprodutivo

A partir dos resultados encontrados no Experimento 5, o último experimento com *A. gemmatalis* utilizou folhas coletadas da parte superior das plantas, enquanto

para *S. frugiperda* as folhas foram coletadas da parte inferior. Por fim, o consumo foliar pelas lagartas foi avaliado utilizando-se plantas dos genótipos de soja nos estádios (a) vegetativo (V5) ou (b) reprodutivo (R3-R4) (em torno de 40 e 65 dias, respectivamente). No experimento com *A. gemmatalis*, as duas primeiras folhas trifolioladas a partir do ápice foram utilizadas nos ensaios. Para *S. frugiperda*, foram utilizadas a terceira e quarta folhas trifolioladas das plantas em estágio vegetativo, ou a quarta, quinta e sexta folhas trifolioladas das plantas em estágio reprodutivo. As folhas foram coletadas de plantas distintas para os experimentos com cada espécie de inseto.

2.6. Análise estatística

Os dados de área foliar consumida foram primeiramente analisados quanto à normalidade pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, e homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Os dados não apresentaram distribuição normal, e então foram transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$. Em seguida, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar os efeitos principais dos genótipos (G), os respectivos fatores (F) avaliados em cada experimento, e para a interação entre genótipos x fatores (G x F). Quando diferenças significativas foram encontradas, as médias foram separadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Experimento 1: uma lagarta versus duas lagartas por disco foliar

No teste com chance de escolha (Tabela 1), foram observadas diferenças significativas entre genótipos ($F_{1,36} = 128,28$; $p < 0,0001$) e entre uma ou duas lagartas por disco foliar ($F_{1,36} = 13,84$; $p = 0,0007$) na área foliar consumida por *A. gemmatalis*. Ainda, houve interação significativa entre genótipos e o número de lagartas por disco ($F_{1,36} = 5,06$; $p = 0,0307$). Para o genótipo suscetível BRSGO 8360, duas lagartas por disco proporcionou significativamente maior consumo foliar, enquanto para IAC 100, não houve diferenças entre uma ou duas lagartas por disco.

Para o teste sem chance de escolha (Tabela 1), a área foliar consumida diferiu entre genótipos ($F_{1,36} = 6,28$; $p = 0,0169$) e entre uma ou duas lagartas de *A. gemmatalis* por disco foliar ($F_{1,36} = 11,18$; $p = 0,0019$), e não houve interação significativa ($F_{1,36} = 0,02$; $p = 0,8774$) entre os fatores. Como o uso de duas lagartas de *A. gemmatalis* por disco proporcionou melhor diferenciação dos níveis de resistência entre genótipos no teste com chance de escolha, duas lagartas foram utilizadas nos experimentos subsequentes.

Tabela 1. Área foliar consumida (cm^2 , \pm EP) de genótipos de soja por *Anticarsia gemmatalis*, com uma ou duas lagartas por disco foliar, em testes com e sem chance de escolha.

Genótipos	Com chance de escolha			Sem chance de escolha		
	Uma lagarta	Duas lagartas	Média	Uma lagarta	Duas lagartas	Média
IAC 100	0,38 \pm 0,07aA	0,60 \pm 0,12aA	0,49 \pm 0,07a	0,73 \pm 0,18aA	1,56 \pm 0,29aA	1,15 \pm 0,19a
BRSGO 8360	2,08 \pm 0,29bA	3,60 \pm 0,32bB	2,84 \pm 0,27b	1,34 \pm 0,28aA	2,16 \pm 0,28aA	1,75 \pm 0,21b
Média	1,23 \pm 0,24A	2,10 \pm 0,38B	-	1,04 \pm 0,18A	1,86 \pm 0,21B	-
G	$F_{1,36} = 128,28$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,36} = 6,28$	$p = 0,0169$	*
F	$F_{1,36} = 13,84$	$p = 0,0007$	***	$F_{1,36} = 11,18$	$p = 0,0019$	***
G x F	$F_{1,36} = 5,06$	$p = 0,0307$	*	$F_{1,36} = 0,02$	$p = 0,8774$	ns

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$; ^{ns}não significativo.

Para *S. frugiperda*, houve diferença significativa na área foliar consumida entre genótipos ($F_{1,36} = 10,97$; $p = 0,0021$) no teste com chance de escolha (Tabela 2), enquanto entre uma e duas lagartas por disco, o consumo foliar não foi afetado pelo número de insetos ($F_{1,36} = 3,38$; $p = 0,0748$). Não houve interação significativa entre genótipos e número de lagartas por disco foliar no teste com chance de escolha ($F_{1,36} = 1,32$; $p = 0,2763$).

No teste sem chance de escolha (Tabela 2), foi verificada diferença significativa na área foliar consumida entre o número de lagartas de *S. frugiperda* por disco ($F_{1,36} = 6,08$; $p = 0,0185$). No entanto, entre genótipos ($F_{1,36} = 0,22$; $p = 0,6389$) e para a interação de genótipos x número de lagartas por disco ($F_{1,36} = 0,21$;

$p = 0,6506$), diferenças no consumo foliar não foram observadas. Para os ensaios seguintes, utilizou-se uma lagarta de *S. frugiperda* por disco foliar, uma vez que o número de lagartas avaliado nesse experimento não influenciou a não preferência para alimentação no genótipo IAC 100 no teste com chance de escolha e devido à maior praticidade na instalação do ensaio.

Tabela 2. Área foliar consumida (cm^2 , \pm EP) de genótipos de soja por *Spodoptera frugiperda*, com uma ou duas lagartas por disco foliar, em testes com e sem chance de escolha.

Genótipos	Com chance de escolha			Sem chance de escolha		
	Uma lagarta	Duas lagartas	Média	Uma lagarta	Duas lagartas	Média
IAC 100	0,33 \pm 0,06aA	0,86 \pm 0,17aA	0,60 \pm 0,11a	0,53 \pm 0,17aA	0,76 \pm 0,09aA	0,65 \pm 0,10a
BRSO 8360	1,19 \pm 0,28aA	1,35 \pm 0,29aA	1,27 \pm 0,20b	0,53 \pm 0,15aA	0,90 \pm 0,14aA	0,72 \pm 0,11a
Média	0,76 \pm 0,17A	1,11 \pm 0,17A	-	0,53 \pm 0,11A	0,83 \pm 0,08B	-
G	$F_{1,36} = 10,97$	$p = 0,0021$	***	$F_{1,36} = 0,22$	$p = 0,6389$	ns
F	$F_{1,36} = 3,38$	$p = 0,0748$	ns	$F_{1,36} = 6,08$	$p = 0,0185$	*
G x F	$F_{1,36} = 1,32$	$p = 0,2763$	ns	$F_{1,36} = 0,21$	$p = 0,6506$	ns

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$; ^{ns}não significativo.

3.2. Experimento 2: uso de lagartas sem suspensão de alimentação versus sem alimento por três horas antes do ensaio

Quanto à área foliar consumida pelas lagartas de *A. gemmatilis* no teste com chance de escolha (Tabela 3), diferenças significativas foram encontradas entre genótipos ($F_{1,36} = 77,46$; $p < 0,0001$), entre o uso de lagartas com ou sem a suspensão de alimento antes do teste ($F_{1,36} = 5,97$; $p = 0,0196$), e para a interação entre os fatores ($F_{1,36} = 6,80$; $p = 0,0132$). Menor consumo foliar foi observado no genótipo resistente IAC 100 em comparação ao suscetível BRSO 8360 utilizando lagartas de *A. gemmatilis* tanto sem a suspensão de alimento como sem alimentação por três horas antes do ensaio. Entretanto, o consumo foliar no genótipo suscetível foi significativamente maior quando as lagartas não foram privadas da

alimentação antes do teste, enquanto para o genótipo resistente não houve diferença significativa.

No teste sem chance de escolha (Tabela 3), menor consumo foliar foi observado em IAC 100 ($F_{1,36} = 18,00$; $p = 0,0001$), e a privação de alimento antes do ensaio não influenciou a alimentação de *A. gemmatalis* ($F_{1,36} = 0,72$; $p = 0,4030$). A interação de genótipos x uso de lagartas com/sem suspensão da alimentação no teste sem chance de escolha não foi significativa ($F_{1,36} = 0,03$; $p = 0,8567$). Assim, para os experimentos subsequentes com *A. gemmatalis*, foram utilizadas lagartas sem a suspensão da alimentação, uma vez que essa metodologia proporcionou maiores diferenças na área foliar consumida entre os genótipos IAC 100 e BRSGO 8360 no teste com chance de escolha.

Tabela 3. Área foliar consumida (cm^2 , \pm EP) de genótipos de soja por *Anticarsia gemmatalis*, utilizando-se lagartas sem suspensão de alimentação ou com suspensão por três horas antes do ensaio, em testes com e sem chance de escolha.

Genótipos	Com chance de escolha			Sem chance de escolha		
	Sem suspensão	Com suspensão	Média	Sem suspensão	Com suspensão	Média
IAC 100	0,44 \pm 0,09aA	0,47 \pm 0,10aA	0,46 \pm 0,07a	1,05 \pm 0,21aA	0,85 \pm 0,18aA	0,95 \pm 0,14a
BRSGO 8360	2,95 \pm 0,30bB	1,71 \pm 0,34bA	2,33 \pm 0,26b	1,98 \pm 0,30aA	1,77 \pm 0,19aA	1,88 \pm 0,17b
Média	1,70 \pm 0,33B	1,09 \pm 0,22A	-	1,52 \pm 0,21A	1,31 \pm 0,17A	-
G	$F_{1,36} = 77,46$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,36} = 18,00$	$p = 0,0001$	***
F	$F_{1,36} = 5,97$	$p = 0,0196$	*	$F_{1,36} = 0,72$	$p = 0,4030$	ns
G x F	$F_{1,36} = 6,80$	$p = 0,0132$	*	$F_{1,36} = 0,03$	$p = 0,8567$	ns

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$; ^{ns} não significativo.

Para *S. frugiperda*, diferenças significativas foram observadas entre genótipos no teste com chance ($F_{1,36} = 10,43$; $p = 0,0026$) e sem chance de escolha ($F_{1,36} = 8,45$; $p = 0,0062$) (Tabela 4). Entretanto, não houve diferenças significativas entre o uso de lagartas com ou sem a suspensão de alimentação previamente aos testes com chance ($F_{1,36} = 0,06$; $p = 0,8024$) ou sem chance de escolha ($F_{1,36} = 0,00$; $p = 0,9513$).

De forma semelhante, a interação entre genótipos e fatores avaliados não diferiu significativamente tanto para o teste com chance de escolha ($F_{1,36} = 0,01$; $p = 0,9352$) quanto para o sem chance de escolha ($F_{1,36} = 0,03$; $p = 0,8583$). Pelo fato de a privação de alimentação antes dos ensaios não influenciar os resultados do experimento, as lagartas de *S. frugiperda* foram usadas sem a suspensão de alimento nos ensaios subsequentes, devido a maior praticidade.

Tabela 4. Área foliar consumida (cm^2 , \pm EP) de genótipos de soja por *Spodoptera frugiperda*, utilizando-se lagartas sem suspensão de alimentação ou com suspensão por três horas antes do ensaio, em testes com e sem chance de escolha.

Genótipos	Com chance de escolha			Sem chance de escolha		
	Sem suspensão	Com suspensão	Média	Sem suspensão	Com suspensão	Média
IAC 100	0,38 \pm 0,07aA	0,35 \pm 0,06aA	0,37 \pm 0,04a	0,42 \pm 0,04aA	0,41 \pm 0,04aA	0,42 \pm 0,03a
BRS GO 8360	0,68 \pm 0,11aA	0,68 \pm 0,15aA	0,68 \pm 0,09b	0,55 \pm 0,05aA	0,57 \pm 0,06aA	0,56 \pm 0,04b
Média	0,53 \pm 0,07A	0,52 \pm 0,09A	-	0,49 \pm 0,04A	0,49 \pm 0,03A	-
G	$F_{1,36} = 10,43$	$p = 0,0026$	***	$F_{1,36} = 8,45$	$p = 0,0062$	***
F	$F_{1,36} = 0,06$	$p = 0,8024$	ns	$F_{1,36} = 0,00$	$p = 0,9513$	ns
G x F	$F_{1,36} = 0,01$	$p = 0,9352$	ns	$F_{1,36} = 0,03$	$p = 0,8583$	ns

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. *** $p < 0,0001$; ns não significativo.

3.3. Experimento 3: disco foliar versus folíolo inteiro

Com respeito a *A. gemmatilis*, a área foliar consumida diferiu significativamente entre os genótipos ($F_{1,36} = 118,98$; $p < 0,0001$), entre discos foliares e folíolos inteiros ($F_{1,36} = 20,26$; $p < 0,0001$), e para a interação entre esses fatores ($F_{1,36} = 14,38$; $p = 0,0006$) no teste com chance de escolha (Tabela 5). O genótipo resistente IAC 100 foi menos consumido quando discos foliares ou folíolos foram utilizados. Todavia, o genótipo suscetível BRS GO 8360 foi significativamente mais consumido quando se utilizou discos foliares em relação a folíolos inteiros, o que não ocorreu para IAC 100.

No teste sem chance de escolha (Tabela 5), o genótipo IAC 100 foi menos preferido que BRSGO 8360 ($F_{1,36} = 60,80$; $p < 0,0001$), no entanto, não houve influência significativa do uso de discos foliares ou folíolos inteiros no consumo pelas lagartas de *A. gemmatalis* ($F_{1,36} = 0,18$; $p = 0,6708$), nem para a interação entre fatores ($F_{1,36} = 3,06$; $p = 0,0886$). Por proporcionar a maior diferença no consumo foliar entre genótipos no teste com chance de escolha, discos foliares foram selecionados para serem usados nos experimentos seguintes com *A. gemmatalis*.

Tabela 5. Área foliar consumida (cm^2 , \pm EP) de genótipos de soja por *Anticarsia gemmatalis*, utilizando-se discos foliares ou folíolos inteiros, em testes com e sem chance de escolha.

Genótipos	Com chance de escolha			Sem chance de escolha		
	Disco foliar	Folíolo	Média	Disco foliar	Folíolo	Média
IAC 100	0,33 \pm 0,08aA	0,27 \pm 0,06aA	0,30 \pm 0,05a	0,33 \pm 0,07aA	0,49 \pm 0,08aA	0,41 \pm 0,06a
BRSGO 8360	1,89 \pm 0,14bB	0,91 \pm 0,11bA	1,40 \pm 0,14b	1,85 \pm 0,27aA	1,43 \pm 0,20aA	1,64 \pm 0,17b
Média	1,11 \pm 0,20B	0,59 \pm 0,10A	-	1,09 \pm 0,22A	0,96 \pm 0,15A	-
G	$F_{1,36} = 118,98$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,36} = 60,80$	$p < 0,0001$	***
F	$F_{1,36} = 20,26$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,36} = 0,18$	$p = 0,6708$	ns
G x F	$F_{1,36} = 14,38$	$p = 0,0006$	***	$F_{1,36} = 3,06$	$p = 0,0886$	ns

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. *** $p < 0,0001$; ns não significativo.

A área foliar consumida pelas lagartas de *S. frugiperda* diferiu significativamente entre genótipos ($F_{1,36} = 31,67$; $p < 0,0001$) e entre discos foliares ou folíolos ($F_{1,36} = 19,95$; $p = 0,0001$) no teste com chance de escolha (Tabela 6), e os efeitos desses fatores foram independentes entre si ($F_{1,36} = 2,49$; $p = 0,1234$).

No teste sem chance de escolha com *S. frugiperda* (Tabela 6), o genótipo IAC 100 foi significativamente menos consumido que BRSGO 8360 ($F_{1,36} = 9,05$; $p = 0,0048$), mas diferenças significativas não foram observadas entre discos e folíolos ($F_{1,36} = 2,31$; $p = 0,1380$) ou na interação dos fatores ($F_{1,36} = 0,01$; $p = 0,9410$). Baseando-se nesses resultados, discos foliares foram utilizados para os próximos ensaios com *S. frugiperda*.

Tabela 6. Área foliar consumida (cm^2 , \pm EP) de genótipos de soja por *Spodoptera frugiperda*, utilizando-se discos foliares ou folíolos inteiros, em testes com e sem chance de escolha.

Genótipos	Com chance de escolha			Sem chance de escolha		
	Disco foliar	Folíolo	Média	Disco foliar	Folíolo	Média
IAC 100	0,52 \pm 0,14aA	0,21 \pm 0,06aA	0,37 \pm 0,08a	0,30 \pm 0,07aA	0,20 \pm 0,06aA	0,25 \pm 0,05a
BRSGO 8360	1,40 \pm 0,13aA	0,63 \pm 0,11aA	1,02 \pm 0,12b	0,50 \pm 0,06aA	0,41 \pm 0,10aA	0,46 \pm 0,06b
Média	0,96 \pm 0,14B	0,42 \pm 0,08A	-	0,40 \pm 0,05A	0,31 \pm 0,06A	-
G	$F_{1,36} = 31,67$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,36} = 9,05$	$p = 0,0048$	***
F	$F_{1,36} = 19,95$	$p = 0,0001$	***	$F_{1,36} = 2,31$	$p = 0,1380$	ns
G x F	$F_{1,36} = 2,49$	$p = 0,1234$	ns	$F_{1,36} = 0,01$	$p = 0,9410$	ns

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. *** $p < 0,0001$; ^{ns}não significativo.

3.4. Experimento 4: parte superior versus parte inferior da planta

No teste com chance de escolha com *A. gemmatalis* (Tabela 7), o consumo foliar não diferiu significativamente tanto entre genótipos ($F_{1,36} = 2,19$; $p = 0,1476$) quanto para partes da planta ($F_{1,36} = 2,15$; $p = 0,1513$). Além disso, a interação de genótipos x partes da planta também não foi significativa ($F_{1,36} = 0,64$; $p = 0,4300$).

No teste sem chance de escolha (Tabela 7), o genótipo IAC 100 foi menos consumido que BRSGO 8360 ($F_{1,36} = 6,44$; $p = 0,0156$), e as lagartas de *A. gemmatalis* preferiram se alimentar dos discos foliares provenientes da parte superior em relação à parte inferior da planta ($F_{1,36} = 5,27$; $p = 0,0277$). Embora os efeitos principais dos fatores genótipos e partes da planta tenham sido significativos, os efeitos desses fatores não foram dependentes ($F_{1,36} = 1,57$; $p = 0,2185$). Todavia, o genótipo suscetível foi duas vezes mais preferido que o genótipo resistente quando as folhas foram provenientes da parte superior da planta. Portanto, as folhas foram coletadas desta parte para a próxima avaliação com *A. gemmatalis*.

Tabela 7. Área foliar consumida (cm^2 , \pm EP) de genótipos de soja por *Anticarsia gemmatalis*, utilizando-se folhas da parte superior ou inferior da planta, em testes com e sem chance de escolha.

Genótipos	Com chance de escolha			Sem chance de escolha		
	Superior	Inferior	Média	Superior	Inferior	Média
IAC 100	0,99 \pm 0,28aA	0,84 \pm 0,33aA	0,92 \pm 0,21a	0,70 \pm 0,18aA	0,52 \pm 0,12aA	0,61 \pm 0,11a
BRSO 8360	1,60 \pm 0,31aA	0,92 \pm 0,17aA	1,26 \pm 0,19a	1,40 \pm 0,24aA	0,73 \pm 0,18aA	1,07 \pm 0,16b
Média	1,30 \pm 0,21A	0,88 \pm 0,18A	-	1,05 \pm 0,17B	0,63 \pm 0,11A	-
G	$F_{1,36} = 2,19$	$p = 0,1476$	ns	$F_{1,36} = 6,44$	$p = 0,0156$	*
F	$F_{1,36} = 2,15$	$p = 0,1513$	ns	$F_{1,36} = 5,27$	$p = 0,0277$	*
G x F	$F_{1,36} = 0,64$	$p = 0,4300$	ns	$F_{1,36} = 1,57$	$p = 0,2185$	ns

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$; ^{ns}não significativo.

Em relação ao teste com chance de escolha utilizando *S. frugiperda* (Tabela 8), houve diferença significativa apenas entre genótipos ($F_{1,36} = 9,16$; $p = 0,0046$). Não houve influência significativa das partes da planta ($F_{1,36} = 2,32$; $p = 0,1364$) no consumo foliar, nem na interação entre genótipos x partes da planta ($F_{1,36} = 0,58$; $p = 0,4498$).

Tabela 8. Área foliar consumida (cm^2 , \pm EP) de genótipos de soja por *Spodoptera frugiperda*, utilizando-se folhas da parte superior ou inferior da planta, em testes com e sem chance de escolha.

Genótipos	Com chance de escolha			Sem chance de escolha		
	Superior	Inferior	Média	Superior	Inferior	Média
IAC 100	0,17 \pm 0,03aA	0,24 \pm 0,03aA	0,21 \pm 0,02a	0,21 \pm 0,03aA	0,21 \pm 0,04aA	0,21 \pm 0,02a
BRSO 8360	0,44 \pm 0,12aA	0,78 \pm 0,27aA	0,61 \pm 0,15b	0,18 \pm 0,02aA	0,22 \pm 0,06aA	0,20 \pm 0,03a
Média	0,31 \pm 0,07A	0,51 \pm 0,15A	-	0,20 \pm 0,02A	0,22 \pm 0,03A	-
G	$F_{1,36} = 9,16$	$p = 0,0046$	***	$F_{1,36} = 0,12$	$p = 0,7365$	ns
F	$F_{1,36} = 2,32$	$p = 0,1364$	ns	$F_{1,36} = 0,19$	$p = 0,6687$	ns
G x F	$F_{1,36} = 0,58$	$p = 0,4498$	ns	$F_{1,36} = 0,08$	$p = 0,7735$	ns

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. *** $p < 0,0001$; ^{ns}não significativo.

No teste sem chance de escolha (Tabela 8), diferenças significativas não foram encontradas entre genótipos ($F_{1,36} = 0,12$; $p = 0,7365$), partes da planta ($F_{1,36} = 0,19$; $p = 0,6687$) ou para a interação desses fatores ($F_{1,36} = 0,08$; $p = 0,7735$) na área foliar consumida por *S. frugiperda*. Apesar de a posição da folha na planta não ter afetado significativamente o consumo foliar, as folhas coletadas da parte inferior das plantas de soja foram numericamente mais consumidas do que aquelas da parte superior no teste com chance de escolha. Portanto, as folhas foram coletadas da parte inferior das plantas para o próximo experimento com *S. frugiperda*.

3.5. Experimento 5: estágio vegetativo versus estágio reprodutivo

O genótipo IAC 100 foi significativamente menos consumido ($F_{1,36} = 10,15$; $p = 0,0030$) pelas lagartas de *A. gemmatilis* no teste com chance de escolha (Tabela 9), e os discos foliares provenientes de plantas no estágio reprodutivo foram menos consumidos do que os de plantas no estágio vegetativo ($F_{1,36} = 5,18$; $p = 0,0288$). A interação de genótipos x estádios fenológicos da planta não foi significativa ($F_{1,36} = 1,19$; $p = 0,2823$).

Tabela 9. Área foliar consumida (cm^2 , \pm EP) de plantas de genótipos de soja nos estádios vegetativo e reprodutivo por *Anticarsia gemmatilis*, em testes com e sem chance de escolha.

Genótipos	Com chance de escolha			Sem chance de escolha		
	Vegetativo	Reprodutivo	Média	Vegetativo	Reprodutivo	Média
IAC 100	0,75 \pm 0,19aA	0,20 \pm 0,03aA	0,48 \pm 0,11a	0,95 \pm 0,18aB	0,32 \pm 0,04aA	0,64 \pm 0,12a
BRSGO 8360	1,12 \pm 0,20aA	0,93 \pm 0,28aA	1,03 \pm 0,17b	1,23 \pm 0,26aA	1,49 \pm 0,27bA	1,36 \pm 0,18b
Média	0,94 \pm 0,14B	0,57 \pm 0,16A	-	1,09 \pm 0,16A	0,91 \pm 0,19A	-
G	$F_{1,36} = 10,15$	$p = 0,0030$	***	$F_{1,36} = 14,55$	$p = 0,0005$	***
F	$F_{1,36} = 5,18$	$p = 0,0288$	*	$F_{1,36} = 1,41$	$p = 0,2429$	ns
G x F	$F_{1,36} = 1,19$	$p = 0,2823$	ns	$F_{1,36} = 6,21$	$p = 0,0175$	*

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$; ^{ns}não significativo.

No teste sem chance de escolha (Tabela 9), diferenças significativas foram verificadas entre genótipos ($F_{1,36} = 14,55$; $p = 0,0005$), porém, não houve diferença entre os estádios fenológicos da planta ($F_{1,36} = 1,41$; $p = 0,2429$). A interação entre genótipos x estádios fenológicos influenciou significativamente o consumo foliar pelas lagartas de *A. gemmatalis* ($F_{1,36} = 6,21$; $p = 0,0175$). O genótipo IAC 100 foi significativamente menos consumido que BRSGO 8360 no estágio reprodutivo, mas para plantas no estágio vegetativo, ambos os genótipos de soja foram igualmente preferidos por *A. gemmatalis*. O genótipo IAC 100 foi significativamente mais consumido no estágio vegetativo, enquanto diferenças no consumo entre os estádios fenológicos da planta não foram encontradas para o genótipo BRSGO 8360.

Para o teste com chance de escolha com *S. frugiperda* (Tabela 10), o genótipo IAC 100 ($F_{1,36} = 27,19$; $p < 0,0001$) e plantas no estágio reprodutivo ($F_{1,36} = 22,05$; $p < 0,0001$) foram significativamente menos preferidos, no entanto, não houve interação significativa entre genótipos e estádios fenológicos ($F_{1,36} = 0,19$; $p = 0,6651$).

Tabela 10. Área foliar consumida (cm^2 , \pm EP) de plantas de genótipos de soja nos estádios vegetativo e reprodutivo por *Spodoptera frugiperda*, em testes com e sem chance de escolha.

Genótipos	Com chance de escolha			Sem chance de escolha		
	Vegetativo	Reprodutivo	Média	Vegetativo	Reprodutivo	Média
IAC 100	1,06 \pm 0,15aA	0,41 \pm 0,16aA	0,74 \pm 0,13a	0,84 \pm 0,14aA	0,34 \pm 0,04aA	0,59 \pm 0,09a
BRSGO 8360	2,24 \pm 0,22aA	1,19 \pm 0,23aA	1,72 \pm 0,20b	0,77 \pm 0,22aA	0,48 \pm 0,07aA	0,63 \pm 0,12a
Média	1,65 \pm 0,19B	0,80 \pm 0,16A	-	0,81 \pm 0,13B	0,41 \pm 0,04A	-
G	$F_{1,36} = 27,19$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,36} = 0,06$	$p = 0,8147$	ns
F	$F_{1,36} = 22,05$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,36} = 8,46$	$p = 0,0062$	***
G x F	$F_{1,36} = 0,19$	$p = 0,6651$	ns	$F_{1,36} = 1,00$	$p = 0,3237$	ns

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e letras maiúsculas nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. *** $p < 0,0001$; ^{ns}não significativo.

Em relação ao teste sem chance de escolha (Tabela 10), as plantas no estágio reprodutivo também foram menos consumidas pelas lagartas ($F_{1,36} = 8,46$; $p = 0,0062$). Por outro lado, não houve preferência para alimentação no genótipo IAC 100 ($F_{1,36} = 0,06$; $p = 0,8147$), e a interação de genótipos x estádios fenológicos da planta não foi significativa ($F_{1,36} = 1,00$; $p = 0,3237$).

4. Discussão

Os resultados encontrados no presente trabalho reiteram que a expressão da resistência por um genótipo pode variar de acordo com as condições em que a planta é exposta, e que tais fatores podem ser inerentes à planta ou ao inseto. Esse estudo demonstrou que o número de lagartas por disco, suspensão/não suspensão de alimento às lagartas antes dos ensaios, tipo de substrato oferecido às lagartas, posição da folha na planta, e idade das plantas podem influenciar a expressão de antixenose em soja. Desse modo, é importante ter conhecimento sobre a melhor metodologia antes de qualquer avaliação da resistência a um inseto ser conduzida. Além disso, a melhor metodologia pode diferir para diferentes espécies de insetos fitófagos, especialmente entre insetos especialistas (monófagos/oligófagos) e generalistas (polífagos), como foi demonstrado na presente pesquisa respectivamente para *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*.

O primeiro experimento demonstrou que a liberação de duas lagartas por disco foliar nos testes de preferência alimentar foi mais adequada para se evidenciar as diferenças do consumo foliar entre os genótipos resistente e suscetível de soja a *A. gemmatalis*. Isso se deve ao fato de as lagartas terem se alimentado mais do genótipo suscetível, embora com uma lagarta por disco já tenha sido possível distinguir o genótipo IAC 100 como o menos preferido no teste com chance de escolha.

Em relação a *S. frugiperda*, a utilização de uma lagarta por disco foliar proporcionou numericamente a maior diferença no consumo foliar entre os genótipos, apesar de diferenças não terem sido observadas no teste sem chance de escolha mesmo quando duas lagartas por disco foram liberadas. Tais diferenças entre espécies no número de lagartas utilizadas possivelmente se deu em função da

quantidade de alimento ingerida necessária para o desenvolvimento larval de cada espécie. Bueno et al. (2011) verificaram consumo foliar de lagartas de *S. frugiperda* ligeiramente superior ao de *A. gemmatalis* em quatro cultivares de soja avaliadas. Em testes de resistência de plantas, o número correto de insetos a ser usado é de fundamental importância na seleção de genótipos, e os ensaios só serão efetivos com o nível ótimo de infestação. Densidades muito altas ou muito baixas podem não proporcionar visível expressão da resistência em genótipos que realmente apresentem tais características, não os distinguindo dos suscetíveis (HARRIS, 1979).

Provavelmente, seja necessário um ajuste na duração do teste sem chance de escolha para *S. frugiperda*, uma vez que 24 horas não foi suficiente para a expressão de não preferência para alimentação no genótipo resistente. É importante ressaltar que uma maior duração no teste de preferência alimentar seja mais adequada do que o uso de lagartas mais desenvolvidas, uma vez que lagartas dessa espécie em estádios mais avançados podem realizar canibalismo, o que inviabilizaria o experimento.

O presente trabalho avaliou a influência da suspensão ou não suspensão da alimentação de lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* antes dos ensaios. Para a primeira espécie, o genótipo IAC 100 foi menos preferido que BRSGO 8360 nos testes com e sem chance de escolha, porém, maiores diferenças nos níveis de resistência ocorreram quando as lagartas não foram privadas de alimentação antes dos testes. Esses resultados possivelmente ocorreram porque as lagartas que tiveram sua alimentação interrompida foram menos sensíveis aos estímulos negativos do genótipo resistente no teste com chance de escolha, devido à necessidade de se nutrirem. Além disso, as lagartas de *A. gemmatalis* que não tiveram sua alimentação interrompida apresentaram maior consumo foliar do que as lagartas que foram privadas de alimento, provavelmente pelo maior nível de estresse sofrido pelo primeiro grupo de insetos em seu manuseio. Para *S. frugiperda*, o nível expresso de antixenose pelo genótipo resistente foi semelhante independentemente se os insetos foram privados ou não de se alimentarem antes do ensaio.

A privação de alimento aos insetos previamente à condução de ensaios é comumente realizada em testes de resistência de plantas (PANDA; KHUSH, 1995).

Entretanto, talvez esta não seja a melhor metodologia a ser empregada para todas as espécies de insetos. Por exemplo, Saxena (1967), avaliando a atratividade de *Dysdercus koenigii* (Fabricius) a extratos de sementes de algodoeiro, verificou que a atratividade do inseto aumentou proporcionalmente em função do tempo que o percevejo permaneceu sem alimento antes dos testes. Os resultados encontrados no presente estudo com *A. gemmatalis* demonstraram que a privação de alimento pode influenciar a quantidade de folha consumida pelos insetos em testes de preferência alimentar.

De modo geral, as lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* consumiram menor área foliar de folíolos do que discos foliares. Entretanto, no teste com chance de escolha para a lagarta-da-soja, a maior diferença no consumo entre os genótipos foi encontrada para os discos foliares, e o genótipo suscetível foi mais consumido quando oferecido como disco foliar em comparação ao folíolo inteiro retirado das plantas.

O uso de discos foliares ou folíolos é muito comum em estudos de resistência de plantas, com algumas variações nos resultados encontrados pelos dois métodos dependendo da espécie de planta ou inseto (HUANG et al., 2003). Por exemplo, discos foliares e folhas inteiras foram ambos efetivos na avaliação da resistência a *Tetranychus urticae* Koch em melão (EAST et al., 1992). Em outro experimento, as diferenças na resistência a *Diabrotica balteata* LeConte entre discos foliares e plantas inteiras foram maiores do que entre folhas retiradas das plantas e plantas inteiras de milho, feijão e abóbora (RISCH, 1985). Por fim, um genótipo de alface expressou maior nível de resistência a *D. balteata* em folhas intactas do que naquelas retiradas das plantas, porém, quando o genótipo foi oferecido como disco foliar, a resistência não foi observada (HUANG et al., 2003).

Muitos compostos secundários presentes nas plantas são tóxicos não apenas para artrópodes fitófagos, mas também para a própria planta. Desse modo, eles geralmente ficam acumulados separadamente do citoplasma da célula vegetal (como em vacúolos, parede celular, células da epiderme, etc.) à medida que são produzidos pelos diversos processos metabólicos que ocorrem durante o desenvolvimento da planta (PANDA; KHUSH, 1995). Durante a preparação dos discos foliares, pode ter ocorrido a ruptura de células ou organelas contendo os

compostos secundários, resultando na liberação de compostos voláteis e sua maior exposição aos órgãos sensoriais das lagartas, o que pode ter afetado a atratividade aos discos foliares bem como a palatabilidade do substrato.

A lagarta-da-soja apresentou preferência pela parte superior da planta, isto é, o consumo foi maior nas folhas mais novas e mais tenras, principalmente no genótipo suscetível BRSGO 8360, como demonstrado pelo teste sem chance de escolha. De acordo com Wisch (2011), a maior infestação de lagartas de tamanho médio e grande de *A. gemmatalis* se deu no terço superior de plantas de soja, embora o maior número de ovos tenha ocorrido no terço médio.

Esses resultados não estão de acordo com a teoria da defesa ótima (MCKEY, 1979), que prediz que folhas mais novas possuem mais mecanismos de defesa do que folhas mais velhas. Talvez essa teoria não seja uma regra para todas as espécies e genótipos de plantas, como também afirmado por McCall e Fordyce (2010). Reynolds e Smith (1985) observaram menores taxas de crescimento da lagarta-falsa-medideira em folhas mais distantes do ápice das plantas dos genótipos resistente PI 227687 e suscetível Davis em relação às folhas mais próximas do ápice. Em outro trabalho, Smith (1985) concluiu que a resistência do genótipo PI 227687 é localizada, uma vez que esse genótipo conferiu resistência à lagarta-falsa-medideira apenas a partir do terceiro trifólio, enquanto as folhas da parte superior não diferiram do genótipo suscetível Davis. Defesas induzidas após herbivoria ou outros fatores bióticos e abióticos também devem ser considerados, nas quais a planta investirá recursos para produzir maiores concentrações de metabólitos secundários de defesa apenas quando os fatores estressores estiverem presentes (TALLAMY; RAUPP, 1991). Desse modo, cada genótipo deve ser considerado em particular, visto que cada um apresenta mecanismos fisiológicos particulares, governados por seus genes constitutivos e induzíveis, resultando em maior investimento de recursos e energia em crescimento ou defesa.

A preferência da lagarta-da-soja por folhas da parte superior da planta pode ter ocorrido pela maior oferta nutricional presente nas folhas mais novas, especialmente no genótipo suscetível. De acordo com Marschner (1995), os macronutrientes N, P e K, os quais apresentam maior mobilidade no floema, tendem a diminuir à medida que a idade das folhas aumenta, com menores teores naquelas

mais distantes da região apical. Para a lagarta-militar, no entanto, embora diferenças significativas não tenham sido observadas entre as partes da planta, o consumo foliar foi ligeiramente maior nas folhas da parte inferior das plantas de soja no teste com chance de escolha. Isso demonstra que outros componentes, tais como a quantidade de micronutrientes, desbalanço nutricional e concentração de substâncias secundárias desempenham um papel importante na seleção hospedeira por diferentes espécies.

Para as avaliações de plantas de soja com diferentes idades, verificou-se claramente deterrência alimentar no genótipo resistente IAC 100 a lagartas de *A. gemmatalis* quando plantas no estágio reprodutivo foram utilizadas no teste sem chance de escolha. De forma semelhante, lagartas de *S. frugiperda* apresentaram preferência para as plantas no estágio vegetativo. Todavia, a maior diferença entre genótipos foi verificada para plantas no estágio reprodutivo. Isso pode estar relacionado ao maior conteúdo de compostos secundários produzidos e armazenados até essa fase de desenvolvimento, embora a menor quantidade ou desbalanço de macro e micronutrientes também deva desempenhar um papel importante na seleção hospedeira.

De acordo com Bingaman e Hart (1993), há indícios de que os aleloquímicos responsáveis pela resistência se acumulem em tecidos de plantas mais maduras, atuando como deterrentes a artrópodes. Entre os aleloquímicos encontrados no genótipo resistente IAC 100, Piubelli et al. (2005) identificaram e quantificaram o flavonoide rutina e o isoflavonoide genistina, substâncias que desempenham função de defesa das plantas a insetos fitófagos (DIXON; STEELE, 1999). Assim, flavonoides específicos devem ter se acumulado nas folhas de soja no estágio reprodutivo.

Em geral, o nível de resistência presente no genótipo IAC 100 foi alto o bastante para não ser encoberto pelos efeitos dos fatores avaliados na preferência alimentar de lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, demonstrado no presente estudo. Entretanto, os resultados encontrados enfatizam a importância de se conhecer as melhores condições e métodos para se conduzir um ensaio visando à avaliação da resistência de genótipos para cada espécie de inseto.

5. Conclusões

A utilização de duas lagartas por disco foliar, sem a suspensão de alimentação antes dos ensaios, utilizando-se discos foliares provenientes da parte superior das plantas em estágio reprodutivo proporciona a melhor diferenciação na expressão de antixenose em genótipos de soja a *A. gemmatilis*. Para *S. frugiperda*, o uso de uma lagarta por disco foliar, sem a suspensão de alimentação antes dos ensaios, utilizando-se discos foliares retirados da parte inferior das plantas em estágio reprodutivo proporciona resultados mais satisfatórios para os testes de preferência alimentar.

6. Referências

BINGAMAN, B. R.; HART, E. R. Clonal and leaf age variation in *Populus* phenolic glycosides, implications for host selection by *Chrysomela scripta* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 22, p. 397-403, 1993.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; LOPES, G. S.; COSTA, E. N.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I. Atualidades em resistência de plantas a insetos. In: BUSOLI, A. C.; ALENCAR, J. R. D. C. C.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A.; SOUZA, B. H. S.; GRIGOLLI, J. F. J. (Eds.). **Tópicos em entomologia agrícola – VI**. Jaboticabal: Gráfica Multipress, 2013. p. 207-224.

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

CENTURION, J. F.; ANDRIOLI, I.; MARQUES JÚNIOR, J.; MARCGIORI, D. G. Características de latossolos roxos desenvolvidos de rochas alcalinas e básicas de Jaboticabal, SP. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, p. 226-232, 1995.

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

EAST, D. A.; EDELSON, J. V.; COX, E. L.; HARRIS, M. K. Evaluation of screening methods and search for resistance in muskmelon, *Cucumis melon* L., to the two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. **Crop Protection**, Guildford, v. 11, n. 1, p. 39-44, 1992.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvet bean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

HARRIS, M. K. Arthropod-plant interactions related to agriculture, emphasizing host plant resistance. In: HARRIS, M. K. (Ed.). **Biology and breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants**. College Station: Texas A & M University, 1979. p. 23-51.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; GAZZONI, D. L.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; LORINI, I. A.; BORGES, M.; PANIZZI, A. R.; SOSA-GOMEZ, D. R.; CORSO, I. C. Integrated pest management in Brazil. In: MAREDA, K. M.; DAKOUO, D.; MOTA-SANCHES, D. (Eds.). **Integrated pest management in the global arena**. Trowbridge: CABI Publishing, Cromwell Press, 2003. p. 285-299.

HOMRICH, M. S.; PASSAGLIA, L. M. P.; PEREIRA, J. F.; BERTAGNOLLI, P. F.; SALVADORI, J. R.; NICOLAU, M.; KALTCHUK-SANTOS, E.; ALVES, L. B.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Agronomic performance, chromosomal stability and resistance to velvetbean caterpillar of transgenic soybean expressing *cry1Ac* gene. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 801-807, 2008.

HUANG, J.; NUSSLY, G. S.; MCAUSLANE, H. J.; NAGATA, R. T. Effects of screening methods on expression of romaine lettuce resistance to adult banded

cucumber beetle, *Diabrotica balteata* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 86, n. 2, p. 194-198, 2003.

MCCALL, A. C.; FORDYCE, J. A. Can optimal defense theory be used to predict the distribution of plant defense chemicals? **Journal of Ecology**, Oxford, v. 98, p. 985-992, 2010.

MCKEY, D. The distribution of secondary metabolites within plants. In: ROSENTHAL, G. A.; JANSEN, D. H. (Eds.). **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. New York: Academic Press, 1979. p. 55-133.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. San Diego: Academic, 1995. 889 p.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Eds.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 213-334.

PANDA, N.; KUSH, G. S. **Host plant resistance to insects**. Wallingford: CAB/International Rice Research Institute, 1995. 431 p.

PANIZZI, A. R.; CORREA-FERREIRA, B. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. **Trends in Entomology**, Trivandrum, v. 1, p. 71-88, 1997.

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*? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, p. 1509-1525, 2005.

REYNOLDS, G. W.; SMITH, C. M. Effects of leaf position, leaf wounding, and plant age of two soybean genotypes on soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) growth. **Environmental Entomology**, College Park, v. 14, p. 475-478, 1985.

RISCH, S. J. Effects of induced chemical changes on interpretation of feeding preference tests. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 81-84, 1985.

SANTOS, K. B.; NEVES, P.; MENEGUIM, A. M.; SANTOS, R. B.; SANTOS, W. J.; VILLAS BOAS, G.; DUMAS, V.; MARTINS, E.; PRAÇA, L. B.; QUEIROZ, P.; BERRY, C.; MONNERAT, R. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, Orlando, v. 50, n. 2, p. 157-163, 2009.

SÁ, V. G. M.; FONSECA, B. V. C.; BOREGAS, K. G. B.; WAQUIL, J. M. Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 108-115, 2009.

SAXENA, K. N. Some factors governing olfactory and gustatory responses in insects. In: HAYASHI, T. (Ed.). **Olfaction and Taste II**. Oxford: Pergamon Press, 1967. p. 799-820.

SILVA, D. M.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; BUENO, A. F.; BUENO, R. C. O.; OLIVEIRA, M. C. N.; MOSCARDI, F. Biological characteristics of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) for three consecutive generations under different temperatures: understanding the possible impact of global warming on a soybean pest. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 102, n. 3, p. 285-292, 2012.

SMITH, C. M. Expression, mechanisms and chemistry of resistance in soybean, *Glycine max* L. (Merr.) to the soybean looper, *Pseudoplusia includes* (Walker). **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v. 6, n. 3, p. 243-248, 1985.

SMITH, C. M. **Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches**. Dordrecht: Springer, 2005. 423 p.

SOUZA, B. H. S.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; JANINI, J. C.; SILVA, A. G.; RODRIGUES, N. E. L. Feeding of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean genotypes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 38, n. 2, p. 215-223, 2012.

TALLAMY, D. W.; RAUPP, M. J. **Phytochemical induction by herbivores**. New York: Wiley, 1991. 431 p.

WISCH, L. N. **Flutuação populacional dos principais noctuídeos e distribuição vertical de ovos e larva na cultura da soja**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração: Agricultura) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.

CAPÍTULO 3 – Influência de partes e idades de plantas de soja na expressão da antibiose à lagarta-da-soja e lagarta-militar

Resumo – Diversas espécies de insetos fitófagos estão associadas à cultura da soja, incluindo a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner e a lagarta-militar *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). A concentração de flavonoides e nutrientes inorgânicos em diferentes partes e estádios fenológicos das plantas pode ser um dos mecanismos que influenciam a resistência às espécies de insetos-praga. Desse modo, esse estudo testou as hipóteses de que (i) folhas do genótipo resistente de soja PI 227687 e do genótipo suscetível IGRA RA 626 RR provenientes da parte superior ou inferior das plantas, e de plantas em estágio vegetativo ou reprodutivo podem expressar diferentes níveis de antibiose à lagarta-da-soja e à lagarta-militar; (ii) que a expressão de antibiose está relacionada com as concentrações de macro e micronutrientes na planta; (iii) e que os níveis de resistência são relacionados com as concentrações dos flavonoides rutina, isoquercetrina, daidzina, daidzeina, hesperidina, naringina, naringenina, quercetina e umbeliferona. Em geral, lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* alimentadas com o genótipo resistente, folhas da parte inferior das plantas, ou de plantas em estágio reprodutivo tiveram seus parâmetros biológicos negativamente afetados. Esses efeitos foram provavelmente devido às menores concentrações dos nutrientes N, P, K e S; maiores concentrações de Cu, Fe e Ca; e maiores concentrações dos flavonoides rutina, isoquercetrina, daidzina, daidzeina e hesperidina nas folhas das plantas de soja.

Palavras-chave: resistência de plantas, *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda*, flavonoides, nutrientes

Influence of parts and ages of soybeans on the expression of antibiosis to the velvetbean caterpillar and fall armyworm

Abstract – Numerous species of phytophagous insects are associated with soybeans, including the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner and the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). The concentration of flavonoids and inorganic nutrients in different plant parts and growth stages may be one of the mechanisms influencing the resistance against species of pest insects. Thus, this study tested the hypotheses that (i) leaves of soybeans of the resistant genotype PI 227687 and of the susceptible genotype IGRA RA 626 RR from the upper or lower part of plants, and plants at the vegetative or reproductive growth stages can express different levels of antibiosis to the velvetbean caterpillar and the fall armyworm; (ii) that the expression of antibiosis is related with the concentrations of macro and micronutrients in plants; (iii) and that the resistance levels are associated with the concentrations of the flavonoids rutin, isoquercetrin, daidzin, daidzein, hesperidin, naringin, naringenin, quercetin, and umbelliferone. Overall, larvae of *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* fed the resistant genotype, leaves from the lower part of the plants, or plants at the reproductive growth stage had their biological parameters negatively affected. These effects were probably due to lower concentrations of the nutrients N, P, K, and S; higher concentrations of Cu, Fe, and Ca; and higher concentrations of the flavonoids rutin, isoquercetrin, daidzin, daidzein, and hesperidin in the leaves of soybean plants.

Keywords: host plant resistance, *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda*, flavonoids, nutrients

1. Introdução

Uma grande diversidade de artrópodes estão associados à cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merrill. No Brasil, por exemplo, tem sido registrada a ocorrência de aproximadamente 40 espécies de artrópodes em cultivos dessa leguminosa (HOFFMANN-CAMPO et al., 2003). Entre os artrópodes fitófagos, há espécies que se alimentam apenas de um número restrito de plantas (oligófagas), enquanto outras espécies atacam uma grande amplitude de hospedeiros (polífagas) (HOFFMANN-CAMPO; CORRÊA-FERREIRA; MOSCARDI, 2012).

Lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) se destacam entre as espécies de insetos desfolhadores que atacam as plantas de soja em praticamente todas as regiões sojicultoras do Brasil (MOSCARDI et al., 2012). *A. gemmatalis* é uma espécie que apresenta hábito oligófago, alimentando-se basicamente de leguminosas (FORD et al., 1975; KOGAN; TURNIPSEED, 1987), enquanto *S. frugiperda* é altamente polífaga, e tem a capacidade de se desenvolver em plantas de famílias taxonomicamente distintas (CRUZ, 1995; BARROS et al., 2010).

Além da especialização por determinadas espécies ou famílias de plantas, vários insetos também são adaptados a se alimentar em partes ou idades específicas da planta hospedeira. A aceitação ou rejeição das plantas pelos insetos dependem de características químicas ou morfológicas nelas presentes (BERNAYS; CHAPMAN, 1994). Nesse contexto, várias plantas, tais como a soja, apresentam em sua composição diversos tipos de compostos fenólicos, incluindo os flavonoides. Além disso, os perfis desses compostos secundários geralmente diferem entre famílias, gêneros e espécies vegetais (HARBORNE; TURNER, 1984). Segundo Lynn e Chang (1990), a concentração de determinados compostos fenólicos ainda pode variar em função do desenvolvimento. Assim, a preferência hospedeira dos insetos entre plantas de distintas famílias taxonômicas pode ser em função, entre outros fatores, da presença e/ou concentração de flavonoides, exercendo papel importante na interação inseto-planta (SIMMONDS, 2001).

Os nutrientes inorgânicos nas plantas também estão relacionados à sua resistência ou suscetibilidade a insetos fitófagos. Para suprir as necessidades de

crescimento e reprodução dos insetos, as plantas precisam atender todos os seus requisitos nutricionais (BECK, 1972). A exigência nutricional dos insetos é diversificada, intra e interespecificamente, podendo variar de acordo com a idade, sexo ou mesmo função desempenhada na população. Em geral, os insetos necessitam em sua dieta de aminoácidos, proteínas, lipídios, esteróis, carboidratos, vitaminas e nutrientes inorgânicos (FORTES, 2005). Assim, seu nível de infestação nas plantas irá depender diretamente das concentrações dos nutrientes nas diversas estruturas vegetais, além da importância que determinado nutriente possui para a dieta nutricional do inseto (BASTOS et al., 2007).

Uma planta é considerada resistente quando apresenta genes constitutivos que expressam características fenotípicas físicas, morfológicas e/ou químicas que a torna menos adequada à alimentação, oviposição e desenvolvimento de insetos fitófagos (BOIÇA JÚNIOR et al., 2013). Por se tratar de uma característica genética, a expressão da resistência, por antibiose, antixenose ou tolerância, pode ser influenciada por diversos fatores relacionados à planta, ao inseto, e ao ambiente (BOIÇA JÚNIOR et al., 2013; SMITH, 2005). Alguns estudos demonstraram que fatores inerentes à planta hospedeira, tais como parte e idade da planta, influenciaram consideravelmente a expressão de antibiose em alguns genótipos de soja, afetando negativamente o desenvolvimento de lagartas desfolhadoras (MCWILLIAMS; BELLAND, 1977; SMITH; GILMAN, 1981; REYNOLDS; SMITH, 1985; SMITH, 1985).

O conhecimento a cerca dos efeitos da parte e idade das plantas de soja na expressão de antibiose em genótipos de soja pode auxiliar no melhor delineamento de ensaios visando à seleção de genótipos resistentes a *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, como também pode ser incorporado em medidas práticas no manejo integrado de pragas. Assim, o presente estudo testou as seguintes hipóteses: (i) folhas de soja provenientes da parte superior ou inferior das plantas, e de plantas em estágio vegetativo ou reprodutivo podem expressar diferentes níveis de antibiose às lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*; (ii) a expressão de antibiose está relacionada com as concentrações de macro e micronutrientes nas folhas; (iii) e os níveis de resistência são relacionados com as concentrações de flavonoides nas folhas das plantas de soja.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação e Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, em Jaboticabal, SP, Brasil. Todos os ensaios em laboratório foram conduzidos sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), umidade relativa ($70 \pm 10\%$), e fotofase (12 horas). Plantas dos genótipos resistente de soja PI 227687 e suscetível IGRA RA 626 RR (SOUZA et al., 2014) foram cultivadas em vasos de 5 L contendo solo (latossolo vermelho distrófico álico) (CENTURION et al., 1995) e areia (3:1), e acondicionados em casa de vegetação. As lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* foram obtidas de populações criadas em laboratório com dieta artificial proposta por Greene, Leppla e Dickerson (1976) durante a fase larval, e com solução aquosa de mel a 10% na fase adulta.

O experimento foi dividido em três ensaios: (a) avaliação de parâmetros biológicos de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* criadas com folhas provenientes da parte superior ou inferior, e de plantas em estágio vegetativo ou reprodutivo dos genótipos de soja; (b) quantificação de macro e micronutrientes em folhas de genótipos de soja provenientes da parte superior ou inferior da planta, e de plantas em estágio vegetativo e reprodutivo; (c) avaliação da concentração de flavonoides em folhas da parte superior ou inferior, e estágio vegetativo e reprodutivo em genótipos de soja.

Cada um dos três ensaios foi realizado em duas etapas. A primeira etapa avaliou a influência da parte superior e inferior de plantas dos genótipos de soja na expressão da antibiose. Para isso, foram utilizadas plantas dos genótipos resistente PI 227687 e suscetível IGRA RA 626 RR em estágio vegetativo V5. A parte superior da planta foi constituída por folíolos do primeiro e segundo trifólios a partir do ápice das plantas, enquanto a parte inferior pelos folíolos do terceiro e quarto trifólios.

A segunda etapa do ensaio comparou plantas em estágio vegetativo e reprodutivo. Para o estágio vegetativo foram utilizadas plantas no estágio V5, enquanto para o estágio reprodutivo foram utilizadas plantas entre os estádios R3-R4. Nessa segunda etapa do ensaio, as folhas foram retiradas da parte da planta

que proporcionou melhor diferenciação nos níveis de resistência entre os genótipos resistente e suscetível nos bioensaios com cada espécie de inseto no ensaio anterior. Em plantas no estágio vegetativo, os folíolos foram coletados do primeiro e segundo trifólios a partir do ápice correspondente à parte superior, ou do terceiro e quarto trifólios para a parte inferior; para plantas no estágio reprodutivo, foram utilizadas folhas do primeiro, segundo e terceiro trifólios para a parte superior da planta, ou do quarto, quinto e sexto trifólios correspondendo à parte inferior da planta.

2.1. Parâmetros biológicos de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* alimentadas com folhas de partes e idades de plantas de genótipos de soja

O primeiro ensaio teve o objetivo de avaliar os efeitos da alimentação com folhas provenientes da parte superior ou inferior das plantas, e de plantas em estágio vegetativo ou reprodutivo de genótipos de soja sobre parâmetros biológicos de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*. Para ambas as espécies, os ensaios foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, com 25 lagartas em cada tratamento constituído pelas combinações de genótipos/partes da planta ou genótipos/idades da planta. Cada repetição constituiu de cinco placas de Petri contendo uma lagarta para cada espécie de inseto.

Na primeira etapa do ensaio, lagartas neonatas de *A. gemmatalis* ou *S. frugiperda* foram transferidas com um pincel fino da colônia de criação para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) revestidas com papel filtro umedecidos com água destilada, na proporção de uma lagarta por placa. As lagartas foram alimentadas *ad libitum* com folíolos provenientes da parte superior (primeiro e segundo trifólios) ou inferior (terceiro e quarto trifólios) de plantas dos genótipos resistente PI 227687 ou suscetível IGRA RA 626 RR durante toda a fase larval.

A segunda etapa do ensaio constituiu da avaliação do desenvolvimento de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* alimentadas com folíolos retirados de plantas no estágio vegetativo (V5) ou reprodutivo (R3-R4). Nessa parte do ensaio, para cada espécie de herbívoro os folíolos foram coletados da parte da planta que proporcionou melhor diferenciação nos níveis de resistência entre os genótipos na etapa anterior. No caso

em que as folhas foram coletadas da parte superior das plantas em estágio reprodutivo, utilizaram-se o primeiro, segundo e terceiro trifólios a partir do ápice, enquanto para folhas da parte inferior as mesmas foram provenientes do quarto, quinto e sexto trifólios. Para plantas no estágio vegetativo, utilizou-se a mesma metodologia descrita anteriormente.

Todo o ciclo biológico (larva-adulto) dos insetos foi acompanhado, no entanto, apenas os parâmetros de duração (dias) do período larval e pupal, sobrevivência (%) larval e pupal, e peso (mg) larval e pupal foram analisados por proporcionarem maiores diferenças. Para *A. gemmatalis*, o peso larval foi avaliado em lagartas com 10 dias de idade, enquanto para *S. frugiperda* as lagartas foram pesadas aos 12 dias. As pupas de ambas as espécies foram pesadas com 24 horas de idade.

2.2. Quantificação de macro e micronutrientes em partes e idades de plantas de genótipos de soja

As análises de nutrientes foram realizadas no Departamento de Solos e Adubos da FCAV/UNESP. Para a quantificação de nutrientes inorgânicos nas diferentes partes e idades de plantas de soja, plantas dos genótipos resistente e suscetível foram cultivadas em um canteiro dentro da casa de vegetação (latossolo vermelho distrófico álico) (CENTURION et al., 1995). Esse canteiro permaneceu durante um ano em pousio após ter sido cultivado com tomateiro por seis meses. O canteiro consistiu de quatro linhas de 5 m de comprimento para cada genótipo, espaçadas em 0,5 m, com densidade de 10-12 plantas por metro linear. A irrigação das plantas foi realizada por gotejamento três vezes por semana. Quando as plantas atingiram o estágio vegetativo V5, folíolos foram coletados do primeiro e segundo trifólios (parte superior) ou terceiro e quarto trifólios (parte inferior) de aproximadamente 30 plantas de cada genótipo, acondicionados em sacos de papel, e conduzidos ao laboratório. Para plantas em estágio reprodutivo R3-R4, as folhas foram coletadas do primeiro, segundo e terceiro trifólios (parte superior) ou quarto, quinto e sexto trifólios (parte inferior) também de cerca de 30 plantas para ambos os genótipos de soja.

No laboratório as folhas foram lavadas com solução de água desmineralizada e detergente neutro a 0,5%, e em seguida foram submetidas a quatro lavagens com apenas água desmineralizada. Após esse processo, as plantas foram secas em estufa a 60°C por 48h e reduzidas à baixa granulometria por meio de um moinho de facas (Thomas Wiley Mill, modelo Te 650, Swedesboro, NJ, EUA). Os macronutrientes N, P, K, Ca, Mg e S, e micronutrientes B, Cu, Fe, Mn e Zn foram analisados de acordo com a metodologia de Miyazawa et al. (1999).

2.3. Concentração de flavonoides em partes e idades de plantas de genótipos de soja

As análises de flavonoides foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Plantas dos genótipos de soja foram cultivadas em casa de vegetação, coletadas, lavadas, secas e moídas seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente. O ensaio foi dividido em duas etapas, avaliando-se a concentração de flavonoides nas partes superior e inferior de plantas dos genótipos resistente e suscetível nos estádios vegetativo (V5) e reprodutivo (R3-R4). Os folíolos de cada parte da planta ou estágio fenológico foram coletados de cerca de 30 plantas de cada genótipo.

Os flavonoides rutina, isoquercetrina, daidzina, daidzeína, hesperidina, naringina, naringenina, quercetina e umbeliferona foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As análises foram adaptadas da metodologia proposta por Klejdus et al. (2007). Curvas de calibração foram construídas por padronização externa, na faixa de concentração de 0,5 a 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. As amostras foram secas e moídas à baixa granulometria, e 500 mg de cada amostra foi pesada e transferida em um tubo falcon. Os flavonoides foram extraídos com uma solução MeOH/HCl 0,5 M 80:20 (v/v) colocada em ultrassom por duas horas, com a temperatura do banho elevando de 25 para 40°C do início ao fim da extração. As amostras foram filtradas em 0,2 μm e acondicionadas em frascos de HPLC para posterior análise.

Para a análise dos flavonoides foi utilizado um conjunto de equipamentos Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), configurado com um

degaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, auto-injetor G1367B, compartimento de coluna termostaticado G1316A e um detector de arranjo de diodos (DAD) G1316A. O software usado para a operação do equipamento foi o Analyst 1.5.1.

O método cromatográfico foi otimizado visando à redução do tempo de experimento e sobreposição possível dos sinais, utilizando-se uma coluna Prevail® C₁₈ 2.1x100 mm i.d., 3 µm. Para a análise, um gradiente foi elaborado para facilitar a separação dos componentes. A fase móvel foi composta de 0,5% de ácido acético em água deionizada como solvente aquoso e 0,5% de ácido acético em acetonitrila como solvente orgânico. A temperatura do forno da coluna foi mantida em 35°C, com vazão de fase de 250 µL min⁻¹ e volume de injeção de 5 µL. A saída do cromatógrafo líquido foi ligada a um divisor de fluxo, onde 20 µL min⁻¹ foram direcionados a um espectrômetro de massas com analisador por triplo quadrupolo API® 2000 (AB/MDS Sciex, Framingham, MA, EUA), operando com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI-MS) e ionização no modo negativo, e o restante direcionado do detector de arranjo de diodos (DAD).

Para a identificação dos flavonoides foi desenvolvido o método de SRM (Selected Reaction Monitoring), no qual se identifica uma transição referente a íons específicos gerados pela ionização e subsequente fragmentação induzida por colisão, que geralmente são características para cada molécula. Todas as otimizações foram realizadas com soluções dos padrões em metanol a 10 µg ml⁻¹.

2.4. Análise estatística

Os dados registrados dos parâmetros biológicos dos insetos foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene para a verificação da normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Para *S. frugiperda*, os dados de peso larval e pupal não apresentaram distribuição normal, e foram transformados em $(x)^{1/2}$. Em seguida, os dados foram submetidos à análise fatorial de variância (ANOVA), e quando significativo, as médias foram separadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram realizadas no software Statistica, versão 7 (STATSOFT, 2004).

3. Resultados

3.1. Parâmetros biológicos de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* alimentadas com folhas de partes e idades de plantas de genótipos de soja

Analisando-se os resultados obtidos para os parâmetros biológicos de *A. gemmatalis* alimentada com folhas de partes de plantas de soja (Tabela 1), verifica-se que não houve diferença significativa entre genótipos ($F_{1,16} = 2,18$; $p = 0,1448$) na duração do período larval.

Em contrapartida, lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com folhas da parte inferior das plantas tiveram um alongamento da fase larval de aproximadamente 11% comparadas com lagartas alimentadas com folhas da parte superior ($F_{1,16} = 22,31$; $p < 0,0001$). Entretanto, não houve efeito significativo ($F_{1,16} = 1,76$; $p = 0,1898$) na interação genótipos x partes da planta.

Diferenças significativas também foram observadas entre genótipos ($F_{1,16} = 14,00$; $p = 0,0018$) e partes da planta ($F_{1,16} = 23,14$; $p = 0,0002$) na sobrevivência larval de *A. gemmatalis* (Tabela 1). Lagartas alimentadas com folhas do genótipo resistente ou da parte inferior da planta tiveram índices de sobrevivência 1,5x e 1,8x menores em relação ao genótipo suscetível ou parte superior da planta, respectivamente. Contudo, não houve efeito associado ($F_{1,16} = 0,00$; $p = 0,9975$) entre genótipos e partes da planta.

Lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com folhas dos genótipos de soja não tiveram peso corpóreo significativamente afetado ($F_{1,16} = 3,20$; $p = 0,0779$) (Tabela 1). No entanto, a alimentação com folhas da parte inferior das plantas resultou em lagartas com peso 41% inferior do que aquelas alimentadas com folhas da parte superior ($F_{1,16} = 39,98$; $p < 0,0001$). Não houve efeito associado ($F_{1,16} = 3,37$; $p < 0,0707$) entre genótipos e partes da planta no peso das lagartas.

Tabela 1. Médias (\pm EP) de duração (dias) dos períodos larval e pupal, sobrevivência (%) larval e pupal, e peso (mg) larval e pupal de *Anticarsia gemmatilis* alimentada com folhas da parte superior e inferior de plantas de genótipos resistente e suscetível de soja.

Genótipos	Duração do período larval (dias)			Sobrevivência larval (%)			Peso larval (mg)		
	Superior	Inferior	Média	Superior	Inferior	Média	Superior	Inferior	Média
PI 227687	15,41 \pm 0,39aA	17,75 \pm 0,82aA	16,16 \pm 0,43a	68,00 \pm 9,52aA	32,00 \pm 9,52aA	50,00 \pm 7,14a	238,89 \pm 12,85aA	108,33 \pm 23,78aA	186,67 \pm 16,91a
IGRA RA 626 RR	14,96 \pm 0,22aA	16,60 \pm 0,38aA	15,59 \pm 0,23a	96,00 \pm 4,00aA	60,00 \pm 10,00aA	78,00 \pm 5,91b	253,75 \pm 9,88aA	169,50 \pm 19,41aA	215,46 \pm 11,98a
Média	15,15 \pm 0,21A	17,00 \pm 0,38B	-	82,00 \pm 5,49B	46,00 \pm 7,12A	-	247,38 \pm 7,85B	146,56 \pm 15,63A	-
G	$F_{1,16} = 2,18$	$p = 0,1448$	ns	$F_{1,16} = 14,00$	$p = 0,0018$	**	$F_{1,16} = 3,20$	$p = 0,0779$	ns
F	$F_{1,16} = 22,31$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,16} = 23,14$	$p = 0,0002$	***	$F_{1,16} = 39,98$	$p < 0,0001$	***
G x F	$F_{1,16} = 1,76$	$p = 0,1898$	ns	$F_{1,16} = 0,00$	$p = 0,9975$	ns	$F_{1,16} = 3,37$	$p = 0,0707$	ns
Genótipos	Duração do período pupal (dias)			Sobrevivência pupal (%)			Peso pupal (mg)		
	Superior	Inferior	Média	Superior	Inferior	Média	Superior	Inferior	Média
PI 227687	8,94 \pm 0,23aA	9,14 \pm 0,14aA	9,00 \pm 0,17a	100,00 \pm 0,00aA	87,50 \pm 12,50aA	96,00 \pm 4,00a	208,82 \pm 8,30aA	202,50 \pm 12,65aA	206,80 \pm 6,83a
IGRA RA 626 RR	9,00 \pm 0,18aA	8,83 \pm 0,21aA	8,94 \pm 0,14a	100,00 \pm 0,00aA	80,00 \pm 10,69aA	92,11 \pm 4,43a	211,67 \pm 9,35aA	197,86 \pm 10,56aA	206,58 \pm 7,07a
Média	8,98 \pm 0,14A	8,95 \pm 0,14A	-	100,00 \pm 0,00B	82,61 \pm 8,08A	-	210,49 \pm 6,39A	199,55 \pm 7,97A	-
G	$F_{1,16} = 0,07$	$p = 0,7949$	ns	$F_{1,16} = 0,41$	$p = 0,5234$	ns	$F_{1,16} = 0,00$	$p = 0,9832$	ns
F	$F_{1,16} = 0,01$	$p = 0,9048$	ns	$F_{1,16} = 7,96$	$p = 0,0065$	**	$F_{1,16} = 1,04$	$p = 0,3131$	ns
G x F	$F_{1,16} = 0,60$	$p = 0,4407$	ns	$F_{1,16} = 0,12$	$p = 0,7339$	ns	$F_{1,16} = 0,11$	$p = 0,7364$	ns

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna ou maiúsculas na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey.

** $p < 0,01$; ns não significativo.

Pupas de *A. gemmatalis* cujas lagartas se alimentaram com folhas dos genótipos resistente ou suscetível de soja ($F_{1,16} = 0,07$; $p = 0,7949$) e folhas da parte superior ou inferior das plantas ($F_{1,16} = 0,01$; $p = 0,9048$) não tiveram duração da fase pupal afetada, bem como não houve interação significativa ($F_{1,16} = 0,60$; $p = 0,4407$) entre esses fatores (Tabela 1).

A sobrevivência de pupas de *A. gemmatalis* em folhas da parte inferior das plantas foi significativamente ($F_{1,16} = 7,96$; $p = 0,0065$) menor em relação à parte superior das plantas, a qual proporcionou 100% de sobrevivência (Tabela 1). Os genótipos de soja ($F_{1,16} = 0,41$; $p = 0,5234$) e a interação entre genótipos e partes da planta ($F_{1,16} = 0,12$; $p = 0,7339$) não afetaram significativamente a sobrevivência pupal de *A. gemmatalis*. Também não houve diferenças significativas entre genótipos ($F_{1,16} = 0,00$; $p = 0,9832$), partes da planta ($F_{1,16} = 1,04$; $p = 0,3131$), e da interação de genótipos x partes da planta ($F_{1,16} = 0,11$; $p = 0,7364$) no peso pupal de *A. gemmatalis* (Tabela 1).

No ensaio com genótipos de soja nos estádios vegetativo e reprodutivo, diferenças significativas foram observadas entre genótipos ($F_{1,16} = 5,34$; $p = 0,0234$) e entre estádios fenológicos ($F_{1,16} = 54,20$; $p < 0,0001$) na duração do período larval de *A. gemmatalis* (Tabela 2). Lagartas criadas com folhas de plantas do genótipo resistente PI 227687 sofreram aumento na fase larval em quase 5% em relação às lagartas alimentadas com o genótipo suscetível IGRA RA 626 RR. Por outro lado, lagartas alimentadas com folhas de plantas em estágio reprodutivo tiveram um alongamento em mais de 14% no período larval comparadas com plantas em estágio vegetativo. Todavia, os efeitos dos genótipos de soja e estádios fenológicos foram independentes entre si ($F_{1,16} = 0,03$; $p = 0,8669$).

Lagartas de *A. gemmatalis* não tiveram a sobrevivência afetada pelos genótipos ($F_{1,16} = 4,24$; $p = 0,0563$), partes da planta ($F_{1,16} = 4,24$; $p = 0,0563$) ou pela interação entre esses fatores ($F_{1,16} = 1,88$; $p = 0,1890$) (Tabela 2).

Tabela 2. Médias (\pm EP) de duração (dias) dos períodos larval e pupal, sobrevivência (%) larval e pupal, e peso (mg) larval e pupal de *Anticarsia gemmatilis* alimentada com folhas de plantas de genótipos resistente e suscetível de soja em estágio vegetativo e reprodutivo.

Genótipos	Duração do período larval (dias)			Sobrevivência larval (%)			Peso larval (mg)		
	Vegetativo	Reprodutivo	Média	Vegetativo	Reprodutivo	Média	Vegetativo	Reprodutivo	Média
PI 227687	14,70 \pm 0,32aA	16,53 \pm 0,32aA	15,60 \pm 0,27b	80,00 \pm 8,16aA	76,00 \pm 8,72aA	78,00 \pm 5,92a	173,33 \pm 12,37aA	106,25 \pm 9,21aA	139,79 \pm 9,14a
IGRA RA 626 RR	13,76 \pm 0,19aA	16,30 \pm 0,40aA	14,89 \pm 0,28a	100,00 \pm 0,00aA	80,00 \pm 8,16aA	90,00 \pm 4,29a	225,60 \pm 10,09aA	110,95 \pm 12,90aA	173,26 \pm 11,67b
Média	14,18 \pm 0,19A	16,41 \pm 0,25B	-	90,00 \pm 4,29A	78,00 \pm 5,92A	-	200,00 \pm 8,72B	108,44 \pm 7,69A	-
G	$F_{1,16} = 5,34$	$p = 0,0234$	*	$F_{1,16} = 4,24$	$p = 0,0563$	ns	$F_{1,16} = 8,87$	$p = 0,0037$	**
F	$F_{1,16} = 54,20$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,16} = 4,24$	$p = 0,0563$	ns	$F_{1,16} = 66,26$	$p < 0,0001$	***
G x F	$F_{1,16} = 0,03$	$p = 0,8669$	ns	$F_{1,16} = 1,88$	$p = 0,1890$	ns	$F_{1,16} = 2,49$	$p = 0,1182$	ns
Genótipos	Duração do período pupal (dias)			Sobrevivência pupal (%)			Peso pupal (mg)		
	Vegetativo	Reprodutivo	Média	Vegetativo	Reprodutivo	Média	Vegetativo	Reprodutivo	Média
PI 227687	9,17 \pm 0,12aA	9,84 \pm 0,16aA	9,51 \pm 0,11b	90,00 \pm 6,88aA	100,00 \pm 0,00aA	94,87 \pm 3,58a	163,50 \pm 5,68aA	213,16 \pm 6,84aA	187,69 \pm 5,90a
IGRA RA 626 RR	9,04 \pm 0,12aA	9,38 \pm 0,21aA	9,17 \pm 0,11a	92,00 \pm 5,54aA	80,00 \pm 9,18aA	86,67 \pm 5,12a	181,60 \pm 6,29aA	235,00 \pm 6,68aA	205,33 \pm 6,04b
Média	9,10 \pm 0,08A	9,66 \pm 0,13B	-	91,11 \pm 4,29A	89,74 \pm 4,92A	-	173,56 \pm 4,46A	224,36 \pm 5,04B	-
G	$F_{1,16} = 5,60$	$p = 0,0208$	*	$F_{1,16} = 1,65$	$p = 0,2033$	ns	$F_{1,16} = 7,51$	$p = 0,0076$	**
F	$F_{1,16} = 14,31$	$p = 0,0003$	***	$F_{1,16} = 0,05$	$p = 0,8313$	ns	$F_{1,16} = 62,25$	$p < 0,0001$	***
G x F	$F_{1,16} = 0,00$	$p = 0,9975$	ns	$F_{1,16} = 2,97$	$p = 0,0889$	ns	$F_{1,16} = 2,06$	$p = 0,1549$	ns

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna ou maiúsculas na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; ns, não significativo.

O peso larval de *A. gemmatalis* (Tabela 2) foi significativamente afetado pelos genótipos ($F_{1,16} = 8,87$; $p = 0,0037$) e idades das plantas ($F_{1,16} = 66,26$; $p < 0,0001$), porém, não houve interação significativa entre os fatores ($F_{1,16} = 2,49$; $p = 0,1182$). Lagartas alimentadas com folhas do genótipo resistente tiveram peso corpóreo 20% menor do que as alimentadas com o genótipo suscetível, enquanto a alimentação com folhas de plantas em estágio reprodutivo resultaram em lagartas com peso 46% menor do que com plantas em estágio vegetativo.

A duração da fase pupal foi significativamente afetada pelos genótipos ($F_{1,16} = 5,60$; $p = 0,0208$) e estádios fenológicos ($F_{1,16} = 14,31$; $p = 0,0003$) das plantas de soja (Tabela 2). A duração da fase pupal foi ligeiramente prolongada em 4 ou 6% quando as lagartas de *A. gemmatalis* foram alimentadas com o genótipo resistente ou plantas no estágio reprodutivo, respectivamente. Não houve, entretanto, efeito significativo na interação genótipos x estádios fenológicos ($F_{1,16} = 0,00$; $p = 0,9975$).

De modo semelhante ao ocorrido na fase larval, a sobrevivência de pupas também não diferiu significativamente entre genótipos ($F_{1,16} = 1,65$; $p = 0,2033$), idades da planta ($F_{1,16} = 0,05$; $p = 0,8313$), e genótipos x idades da planta ($F_{1,16} = 2,97$; $p = 0,0889$) (Tabela 2). Lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com folhas do genótipo resistente PI 227687 produziram pupas com peso 9% menor ($F_{1,16} = 7,51$; $p = 0,0076$) do que aquelas criadas com o genótipo suscetível IGRA RA 626 RR. Além disso, a alimentação com folhas de plantas em estágio reprodutivo resultou em pupas com peso 23% inferior ($F_{1,16} = 62,25$; $p < 0,0001$) em comparação com pupas criadas com plantas em estágio vegetativo. Os efeitos dos genótipos e estádios fenológicos no peso pupal não foram dependentes entre si ($F_{1,16} = 2,06$; $p = 0,1549$).

Para *S. frugiperda*, não houve diferença significativa do efeito de genótipos ($F_{1,16} = 0,26$; $p = 0,6121$), partes da planta ($F_{1,16} = 3,88$; $p = 0,0536$) e genótipos x partes da planta ($F_{1,16} = 2,16$; $p = 0,1416$) na duração do período larval (Tabela 3). Por outro lado, genótipos ($F_{1,16} = 22,35$; $p < 0,0001$), partes da planta ($F_{1,16} = 33,38$; $p < 0,0001$) e genótipos x partes da planta ($F_{1,16} = 9,93$; $p = 0,0062$) afetaram significativamente a sobrevivência larval de *S. frugiperda* (Tabela 3). Lagartas criadas com folhas do genótipo resistente PI 227687 ou da parte inferior das plantas apresentaram sobrevivência reduzida em 1,8x e 2,0x em relação ao genótipo suscetível IGRA RA 626 RR ou parte superior da planta, respectivamente.

Tabela 3. Médias (\pm EP) de duração (dias) dos períodos larval e pupal, sobrevivência (%) larval e pupal, e peso (mg) larval e pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com folhas da parte superior e inferior de plantas de genótipos resistente e suscetível de soja.

Genótipos	Duração do período larval (dias)			Sobrevivência larval (%)			Peso larval (mg)		
	Superior	Inferior	Média	Superior	Inferior	Média	Superior	Inferior	Média
PI 227687	18,15 \pm 0,62aA	20,67 \pm 1,45aA	18,48 \pm 0,59a	80,00 \pm 8,16aB	12,00 \pm 6,63aA	46,00 \pm 7,12a	261,25 \pm 21,04aB	43,57 \pm 14,32aA	181,05 \pm 22,30a
IGRA RA 626 RR	17,74 \pm 0,25aA	18,78 \pm 0,51aA	18,20 \pm 0,25a	92,00 \pm 5,54aA	72,00 \pm 9,17bA	82,00 \pm 5,49b	252,00 \pm 14,29aB	157,39 \pm 18,84bA	206,67 \pm 13,78b
Média	17,93 \pm 0,32A	19,05 \pm 0,50A	-	86,00 \pm 4,96B	42,00 \pm 7,05A	-	256,53 \pm 12,50B	114,32 \pm 16,22A	-
G	$F_{1,16} = 0,26$	$p = 0,6121$	ns	$F_{1,16} = 22,35$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,16} = 6,02$	$p = 0,0163$	*
F	$F_{1,16} = 3,88$	$p = 0,0536$	ns	$F_{1,16} = 33,38$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,16} = 61,07$	$p < 0,0001$	***
G x F	$F_{1,16} = 2,16$	$p = 0,1473$	ns	$F_{1,16} = 9,93$	$p = 0,0062$	**	$F_{1,16} = 20,36$	$p < 0,0001$	***
Genótipos	Duração do período pupal (dias)			Sobrevivência pupal (%)			Peso pupal (mg)		
	Superior	Inferior	Média	Superior	Inferior	Média	Superior	Inferior	Média
PI 227687	9,26 \pm 0,17aA	9,00 \pm 0,00aA	9,23 \pm 0,15a	95,00 \pm 5,00aA	100,00 \pm 0,00aA	95,65 \pm 4,35a	213,50 \pm 4,17aA	176,67 \pm 13,47aA	208,70 \pm 4,72a
IGRA RA 626 RR	8,96 \pm 0,13aA	9,82 \pm 0,40aA	9,33 \pm 0,20a	100,00 \pm 0,00aA	94,44 \pm 5,56aA	97,56 \pm 2,44a	223,04 \pm 5,81aA	196,67 \pm 6,10aA	211,46 \pm 4,63a
Média	9,10 \pm 0,11A	9,70 \pm 0,39B	-	97,67 \pm 2,33A	95,24 \pm 4,76A	-	218,61 \pm 3,68B	193,81 \pm 5,66A	-
G	$F_{1,16} = 0,13$	$p = 0,7254$	ns	$F_{1,16} = 0,17$	$p = 0,6816$	ns	$F_{1,16} = 0,19$	$p = 0,6634$	ns
F	$F_{1,16} = 4,55$	$p = 0,0371$	*	$F_{1,16} = 0,27$	$p = 0,6084$	ns	$F_{1,16} = 14,70$	$p = 0,0003$	***
G x F	$F_{1,16} = 2,36$	$p = 0,1296$	ns	$F_{1,16} = 0,93$	$p = 0,3392$	ns	$F_{1,16} = 3,20$	$p = 0,0786$	ns

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna ou maiúsculas na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ns não significativo.

No entanto, diferenças significativas foram observadas entre genótipos apenas para a parte inferior das plantas. Além disso, dentro do efeito de partes da planta, diferenças significativas na sobrevivência larval ocorreram apenas para o genótipo resistente.

O peso larval de *S. frugiperda* foi significativamente influenciado pelos genótipos ($F_{1,16} = 6,012$; $p = 0,0163$) e partes da planta de soja ($F_{1,16} = 61,07$; $p < 0,0001$). Lagartas alimentadas com folhas do genótipo resistente apresentaram peso corpóreo 12% menor do que as alimentadas com o genótipo suscetível, enquanto lagartas alimentadas com folhas da parte inferior das plantas foram 45% mais leves do que as criadas com folhas da parte superior. Além disso, os efeitos dos genótipos e partes da planta foram dependentes entre si ($F_{1,16} = 20,36$; $p < 0,0001$). Lagartas de *S. frugiperda* apresentaram peso corpóreo significativamente menor quando alimentadas com folhas da parte inferior de ambos os genótipos. Todavia, diferença entre os genótipos resistente e suscetível só ocorreu quando as lagartas se alimentaram de folhas da parte inferior das plantas.

Pupas de *S. frugiperda* cujas lagartas foram alimentadas com folhas da parte inferior das plantas apresentaram aumento de 6% na duração da fase pupal ($F_{1,16} = 4,55$; $p = 0,0371$) em relação às pupas criadas com folhas da parte superior (Tabela 3). Porém, diferenças significativas não foram encontradas entre genótipos ($F_{1,16} = 0,13$; $p = 0,7254$) e na interação genótipos x partes da planta ($F_{1,16} = 2,36$; $p = 0,1296$).

A sobrevivência pupal de *S. frugiperda* não foi significativamente influenciada pelos genótipos ($F_{1,16} = 0,17$; $p = 0,6816$), partes da planta ($F_{1,16} = 0,27$; $p = 0,6084$) e interação entre genótipos e partes da planta ($F_{1,16} = 0,93$; $p = 0,3392$) (Tabela 3).

O peso de pupas de *S. frugiperda* foi significativamente afetado pelas partes da planta de soja ($F_{1,16} = 14,70$; $p = 0,0003$), e a alimentação com folhas da parte inferior resultou em pupas com peso 11% menor (Tabela 3). Os efeitos dos genótipos de soja ($F_{1,16} = 0,19$; $p = 0,6634$) e da interação entre genótipos e partes da planta ($F_{1,16} = 3,20$; $p = 0,0786$) não proporcionaram diferenças significativas no peso pupal.

No ensaio com plantas em estádios vegetativo e reprodutivo (Tabela 4), foram observadas diferenças significativas entre genótipos ($F_{1,16} = 52,36$; $p < 0,0001$) e

entre estádios fenológicos ($F_{1,16} = 41,09$; $p < 0,0001$) na duração do período larval de *S. frugiperda*. Lagartas alimentadas com folhas do genótipo resistente PI 227687 ou com plantas no estágio reprodutivo sofreram um atraso na fase larval de aproximadamente 15%. Os efeitos de genótipos e estádios fenológicos, no entanto, não foram dependentes ($F_{1,16} = 0,00$; $p = 0,9975$).

A sobrevivência larval de *S. frugiperda* foi 20% inferior quando alimentada com o genótipo resistente ($F_{1,16} = 5,79$; $p = 0,0286$) (Tabela 4). Todavia, a alimentação com folhas de plantas em diferentes idades ($F_{1,16} = 1,79$; $p = 0,2001$) não influenciou a sobrevivência das lagartas. Além disso, os efeitos de genótipos e idades da planta não foram dependentes entre si ($F_{1,16} = 3,50$; $p = 0,0798$).

A alimentação com folhas do genótipo resistente ($F_{1,16} = 34,16$; $p < 0,0001$) ou de plantas em estágio reprodutivo ($F_{1,16} = 43,55$; $p < 0,0001$) resultaram em lagartas com peso corpóreo cerca de 40% inferior, porém, não houve interação significativa entre genótipos x estádios fenológicos ($F_{1,16} = 2,94$; $p = 0,0903$) (Tabela 4).

Não houve diferença significativa entre genótipos ($F_{1,16} = 2,19$; $p = 0,1451$), estádios fenológicos ($F_{1,16} = 0,00$; $p = 0,9975$) ou na interação entre genótipos e estádios fenológicos ($F_{1,16} = 0,61$; $p = 0,4382$) na duração da fase pupal de *S. frugiperda* (Tabela 4). De forma semelhante, a sobrevivência das pupas também não foi afetada pelos genótipos ($F_{1,16} = 2,29$; $p = 0,1353$), idades da planta ($F_{1,16} = 0,29$; $p = 0,5928$) ou pela interação genótipos x idades da planta ($F_{1,16} = 3,86$; $p = 0,0536$) (Tabela 4).

Pupas criadas com o genótipo resistente tiveram peso reduzido em 11% em relação ao genótipo suscetível ($F_{1,16} = 5,27$; $p = 0,0249$) e pupas criadas em plantas no estágio reprodutivo apresentaram peso 12% inferior àquelas criadas em plantas no estágio vegetativo ($F_{1,16} = 6,74$; $p = 0,0116$). A interação entre genótipos e estádios fenológicos não causou diferenças significativas ($F_{1,16} = 2,28$; $p = 0,1360$) no peso pupal de *S. frugiperda* (Tabela 4).

Tabela 4. Médias (\pm EP) de duração (dias) de duração (dias) dos períodos larval e pupal, sobrevivência (%) larval e pupal, e peso (mg) larval e pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com folhas de plantas de genótipos resistente e suscetível de soja em estágio vegetativo e reprodutivo.

Genótipos	Duração do período larval (dias)			Sobrevivência larval (%)			Peso larval (mg)		
	Vegetativo	Reprodutivo	Média	Vegetativo	Reprodutivo	Média	Vegetativo	Reprodutivo	Média
PI 227687	19,87 \pm 0,27aA	23,69 \pm 0,80aA	21,84 \pm 0,55b	60,00 \pm 10,00aA	64,00 \pm 9,80aA	62,00 \pm 6,93a	200,00 \pm 14,98aA	95,26 \pm 11,31aA	151,46 \pm 12,58a
IGRA RA 626 RR	17,91 \pm 0,23aA	19,56 \pm 0,36aA	18,68 \pm 0,24a	92,00 \pm 5,54aA	72,00 \pm 9,17aA	82,00 \pm 5,49b	323,33 \pm 18,62aA	195,42 \pm 19,38aA	259,38 \pm 16,30b
Média	18,68 \pm 0,23A	21,50 \pm 0,55B	-	76,00 \pm 6,10A	68,00 \pm 6,66A	-	264,35 \pm 15,15B	151,16 \pm 14,10A	-
G	$F_{1,16} = 52,36$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,16} = 5,79$	$p = 0,0286$	*	$F_{1,16} = 34,16$	$p < 0,0001$	***
F	$F_{1,16} = 41,09$	$p < 0,0001$	***	$F_{1,16} = 1,79$	$p = 0,2001$	ns	$F_{1,16} = 43,55$	$p < 0,0001$	***
G x F	$F_{1,16} = 0,00$	$p = 0,9975$	ns	$F_{1,16} = 3,50$	$p = 0,0798$	ns	$F_{1,16} = 2,94$	$p = 0,0903$	ns
Genótipos	Duração do período pupal (dias)			Sobrevivência pupal (%)			Peso pupal (mg)		
	Vegetativo	Reprodutivo	Média	Vegetativo	Reprodutivo	Média	Vegetativo	Reprodutivo	Média
PI 227687	9,54 \pm 0,14aA	9,40 \pm 0,27aA	9,48 \pm 0,14a	86,67 \pm 9,09aA	62,25 \pm 12,50aA	74,19 \pm 7,99a	176,00 \pm 9,15aA	221,25 \pm 13,60aA	199,36 \pm 9,11a
IGRA RA 626 RR	9,18 \pm 0,13aA	9,29 \pm 0,14aA	9,24 \pm 0,09a	82,61 \pm 8,08aA	94,44 \pm 5,56aA	87,80 \pm 5,17a	216,36 \pm 9,60aA	235,00 \pm 10,86aA	224,75 \pm 7,24b
Média	9,33 \pm 0,10A	9,33 \pm 0,13A	-	84,21 \pm 5,99A	79,41 \pm 7,04A	-	200,00 \pm 7,46A	228,53 \pm 8,54B	-
G	$F_{1,16} = 2,19$	$p = 0,1451$	ns	$F_{1,16} = 2,29$	$p = 0,1353$	ns	$F_{1,16} = 5,27$	$p = 0,0249$	*
F	$F_{1,16} = 0,00$	$p = 0,9975$	ns	$F_{1,16} = 0,29$	$p = 0,5928$	ns	$F_{1,16} = 6,74$	$p = 0,0116$	*
G x F	$F_{1,16} = 0,61$	$p = 0,4382$	ns	$F_{1,16} = 3,86$	$p = 0,0536$	ns	$F_{1,16} = 2,28$	$p = 0,1360$	ns

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna ou maiúsculas na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey.
* $p < 0,05$, ns não significativo.

3.2. Quantificação de macro e micronutrientes em partes e idades de plantas de genótipos de soja

Em geral, no estágio vegetativo, maiores concentrações de macro e micronutrientes foram observadas no genótipo suscetível IGRA RA 626 RR (Tabela 5). No entanto, entre os micronutrientes, Cu e Fe foram mais abundantes no genótipo resistente PI 227687. Analisando-se as partes da planta individualmente, todos os macronutrientes, com exceção do Ca, apresentaram maior concentração na parte superior das plantas, enquanto Mg se distribuiu praticamente uniforme entre as partes da planta. Dentre os micronutrientes, apenas o Cu apresentou concentração ligeiramente maior na parte superior das plantas, enquanto Fe, Mn e Zn foram encontrados em maiores concentrações na parte inferior, com grandes diferenças entre as partes das plantas para Fe e Mn. Não houve um padrão de distribuição do B entre as partes da planta de soja.

No estágio reprodutivo, a distribuição dos nutrientes apresentou algumas modificações em relação ao estágio vegetativo (Tabela 5). Os nutrientes N, Mg, S, B, Fe e Mn tiveram sua concentração reduzida quando as plantas atingiram o estágio reprodutivo, enquanto P, K, Ca, Cu e Zn apresentaram aumento nas concentrações em comparação ao estágio vegetativo. As maiores concentrações de macro e micronutrientes de modo geral também foram encontradas no genótipo suscetível. Porém, o macronutriente K e os micronutrientes B e Cu tiveram maiores concentrações no genótipo resistente. Os macronutrientes N e Ca, e os micronutrientes Fe e Mn foram quantificados em maiores concentrações nas folhas da parte inferior das plantas, enquanto os macronutrientes P, K, Mg e S, e o micronutriente Cu foram mais quantificados na parte superior. Não houve um padrão de distribuição de B e Zn entre as partes da planta.

Tabela 5. Concentração de macro (g kg^{-1}) e micronutrientes (mg kg^{-1}) em folhas da parte superior e inferior de plantas de genótipos resistente e suscetível de soja em estágio vegetativo e reprodutivo.

Nutrientes	PI 227687			IGRA RA 626 RR		
	Parte superior	Parte inferior	Média	Parte superior	Parte inferior	Média
Estádio Vegetativo						
N	42,0	35,0	38,5	49,0	40,0	44,5
P	2,9	2,3	2,6	3,3	2,3	2,8
K	17,0	14,0	15,5	16,0	14,0	15,0
Ca	6,9	9,0	8,0	9,5	11,2	10,4
Mg	3,8	4,0	3,9	4,6	4,5	4,6
S	2,5	2,0	2,3	2,9	2,3	2,6
B	43,0	47,0	45,0	46,0	35,0	40,5
Cu	6,0	5,0	5,5	4,0	3,0	3,5
Fe	207,0	353,0	280,0	144,0	269,0	206,5
Mn	116,0	157,0	136,5	189,0	236,0	212,5
Zn	31,0	32,0	31,5	38,0	46,0	42,0
Estádio Reprodutivo						
N	28,0	34,0	31,0	38,0	45,0	41,5
P	4,7	4,1	4,4	5,4	5,3	5,35
K	21,0	13,0	17,0	17,0	11,0	14,0
Ca	10,0	19,0	14,5	12,0	27,0	19,5
Mg	4,0	3,0	3,5	4,0	4,0	4,0
S	2,0	1,4	1,7	2,1	1,8	1,95
B	39,0	45,0	42,0	37,0	35,0	36,0
Cu	9,0	7,0	8,0	7,0	6,0	6,5
Fe	99,0	230,0	164,5	114,0	171,0	142,5
Mn	53,0	71,0	62,0	61,0	95,0	78,0
Zn	43,0	47,0	45,0	53,0	39,0	46,0

3.3. Concentração de flavonoides em partes e idades de plantas de genótipos de soja

Dos nove flavonoides avaliados no presente estudo, apenas rutina, isoquercetrina, daidzina, daidzeina e hesperidina foram identificadas e quantificadas nas folhas de soja (Tabela 6). Naringina, naringenina, quercetina e umbeliferona não foram detectados pelo método de análise utilizado.

Tabela 6. Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) de flavonoides em folhas da parte superior e inferior de plantas de genótipos resistente e suscetível de soja em estágio vegetativo e reprodutivo.

Flavonoides	PI 227687			IGRA RA 626 RR		
	Parte superior	Parte inferior	Média	Parte superior	Parte inferior	Média
Estádio Vegetativo						
Rutina	3304,14	3267,20	3285,67	840,74	828,43	834,59
Isoquercetrina	72,19	109,52	90,86	54,27	94,05	74,16
Daidzina	8,73	49,63	29,18	17,12	36,53	26,83
Daidzeina	-	10,45	10,45	-	8,24	8,24
Hesperidina	12,03	15,62	13,83	-	5,50	5,50
Naringina	-	-	-	-	-	-
Naringenina	-	-	-	-	-	-
Quercetina	-	-	-	-	-	-
Umbeliferona	-	-	-	-	-	-
Estádio Reprodutivo						
Rutina	3710,39	3156,41	3433,40	763,18	606,83	685,01
Isoquercetrina	113,6	127,36	120,48	75,18	58,86	67,02
Daidzina	160,98	119,48	140,23	162,71	36,66	99,69
Daidzeina	36,77	39,23	38,00	24,72	4,35	14,54
Hesperidina	30,25	40,55	35,40	-	1,00	1,00
Naringina	-	-	-	-	-	-
Naringenina	-	-	-	-	-	-
Quercetina	-	-	-	-	-	-
Umbeliferona	-	-	-	-	-	-

No estágio vegetativo (Tabela 6), rutina foi observada em concentrações muito superiores em relação aos demais flavonoides, sendo cerca de 36x superior ao segundo flavonoide mais abundante, isoquercetrina, no genótipo resistente PI 227687 ou 11x no genótipo suscetível IGRA RA 626 RR. Além disso, a concentração de rutina foi 113x, 234x e 314x mais alta que a concentração dos flavonoides daidzina, hesperidina e daidzeina no genótipo resistente, respectivamente, e 23x, 151x e 101x mais alta que esses mesmos flavonoides no genótipo suscetível.

Todos os flavonoides foram quantificados em maiores concentrações no genótipo resistente, com destaque para rutina, que apresentou concentração média

de quase 4x maior que no genótipo suscetível (Tabela 6). Com exceção da rutina, todos os flavonoides ocorreram em maiores concentrações nas folhas da parte inferior das plantas. Daidzeina foi encontrada apenas na parte inferior das plantas de ambos os genótipos de soja; hesperidina foi detectada em ambas as partes do genótipo resistente, porém, no genótipo suscetível ocorreu apenas na parte inferior.

A concentração dos flavonoides também foi superior no genótipo resistente nas plantas em estágio reprodutivo (Tabela 6). Rutina também se destacou entre os flavonoides avaliados, com concentração aproximadamente 24x mais alta que o segundo flavonoide mais abundante, daidzina, no genótipo resistente ou 7x mais alta no genótipo suscetível. Além disso, a concentração de rutina foi 28x, 90x e 97x mais alta que as concentrações de isoquercetrina, daidzeina e hesperidina no genótipo resistente, respectivamente, e 10x, 47x e 685x mais alta do que os respectivos flavonoides no genótipo suscetível.

A concentração de rutina no genótipo resistente foi em média 5x mais alta do que no genótipo suscetível (Tabela 6). Ao contrário do observado no estágio vegetativo, daidzeina foi quantificada também na parte superior das plantas de ambos os genótipos, a qual foi detectada apenas na parte inferior nas plantas em estágio vegetativo; hesperidina não foi quantificada na parte superior do genótipo suscetível, da mesma forma que ocorreu no estágio vegetativo. Por fim, a concentração dos flavonoides em geral aumentou nas plantas de ambos os genótipos do estágio vegetativo para o reprodutivo. Dentre as exceções estão rutina no genótipo suscetível, e daidzeina, hesperidina e isoquercetrina na parte inferior do genótipo suscetível, que tiveram suas concentrações diminuídas quando as plantas atingiram o estágio reprodutivo.

4. Discussão

Os resultados do presente trabalho demonstram que fatores inerentes às plantas de soja, como partes e idades, influenciam a intensidade da expressão de antibiose a *A. gemmatilis* e *S. frugiperda*. As diferentes partes e idades das plantas também afetaram diferentemente o desenvolvimento de cada espécie de herbívoro,

os quais possuem distintos comportamentos alimentares. Além disso, foi possível estabelecer algumas relações entre as concentrações de nutrientes e flavonoides com os efeitos deletérios nos parâmetros biológicos dos insetos.

A parte da planta teve mais influência no desenvolvimento de *A. gemmatalis* que o próprio genótipo de soja no estágio vegetativo. Os principais efeitos negativos foram evidenciados pela maior duração da fase larval, menor peso de lagartas e menor sobrevivência de pupas criadas com folhas da parte inferior das plantas. Por outro lado, o genótipo resistente teve grande influência na menor sobrevivência larval. No segundo ensaio, tanto genótipos quanto idades da planta afetaram o desenvolvimento da lagarta-da-soja. As maiores durações das fases larval e pupal e menores pesos de lagartas foram observadas em *A. gemmatalis* alimentada com folhas do genótipo resistente PI 227687 ou com folhas de plantas no estágio reprodutivo. Contudo, os efeitos de genótipos e partes ou idades da planta foram independentes.

Para *S. frugiperda*, a alimentação com folhas da parte inferior das plantas foi responsável pela redução nos pesos larval e pupal, e prolongamento da fase pupal. Além disso, o efeito de genótipos na sobrevivência e peso larval de *S. frugiperda* foi dependente da parte da planta; apenas folhas provenientes da parte inferior das plantas diferenciou a sobrevivência e ganho de peso das lagartas entre os genótipos resistente e suscetível. Em geral, diferenças foram observadas entre genótipos e idades de plantas, porém, os efeitos foram independentes entre si. Lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas do genótipo resistente PI 227687 ou com folhas de plantas no estágio reprodutivo tiveram aumento na duração do período larval e redução no peso larval.

As diferenças nos níveis de antibiose expressos pelo genótipo PI 227687 à lagarta-da-soja e à lagarta-militar em função da parte e idade da planta de soja corroboram resultados de outros trabalhos realizados com a lagarta-falsa-medideira *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). Reynolds e Smith (1985) observaram menores taxas de crescimento da lagarta-falsa-medideira em folhas mais distantes do ápice das plantas dos genótipos resistente PI 227687 e suscetível Davis e em plantas com oito semanas de idade em relação às folhas mais próximas do ápice e com quatro semanas de idade, respectivamente. Smith (1985) concluiu

que a resistência do genótipo PI 227687 é localizada, uma vez que esse genótipo conferiu resistência à lagarta-falsa-medideira apenas a partir do terceiro trifólio, enquanto as folhas da parte superior não diferiram do genótipo suscetível Davis. Smith e Gilman (1981) verificaram menor peso larval de *C. includens* criada em plantas do genótipo PI 227687 após o florescimento do que antes do florescimento. Desse modo, há indícios de que a parte superior das plantas ou plantas mais novas do genótipo resistente PI 227687 sejam mais adequadas ao desenvolvimento dos insetos por serem mais ricas nutricionalmente e/ou deficientes em substâncias de defesa.

Pupas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* cujas lagartas se alimentaram com folhas de ambos os genótipos no estágio reprodutivo apresentaram maior peso corpóreo em comparação às plantas em estágio vegetativo. Esse fato foi inesperado uma vez que as lagartas das duas espécies tiveram menores pesos quando alimentadas com plantas no estágio reprodutivo. Pode ser que as lagartas que sobreviveram aos efeitos tóxicos e anti-nutricionais dos compostos secundários presentes em maiores concentrações nas plantas no estágio reprodutivo os degradaram e utilizaram como reserva energética durante a fase pupal, proporcionando maior peso devido à maior quantidade de gordura armazenada. Alguns estudos indicam que há espécies de insetos capazes de sequestrar flavonoides e utilizá-los para aumentar seu desempenho contra fatores adversos (BURGHARDT et al., 2000; BURGHARDT; PROCKSH; FIEDLER, 2001), e uma futura investigação é necessária para elucidar essa questão.

Os macro e micronutrientes apresentaram certos padrões de distribuição nas diferentes partes e idades das plantas de soja. A parte superior das plantas em estágio vegetativo concentrou em maior quantidade os nutrientes N, P, K, S e Cu. Vários nutrientes apresentam alta ou intermediária mobilidade no floema, dependendo de suas funções como constituintes metabólicos ou estruturais, concentrando-se nas folhas mais novas e em desenvolvimento da parte apical da planta (MARSCHNER, 1995). De forma contrária, os micronutrientes Ca e Fe foram mais abundantes nas folhas da parte inferior. Esses nutrientes possuem respectivamente baixa e intermediária mobilidade no floema (SFREDO, 2008), e no

caso do Ca, não pode ser transportado após ser depositado em determinada estrutura do vegetal (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996). Em diversas famílias de plantas (MCNAIR, 1932), Ca pode ser acumulado na forma de cristais de oxalato de cálcio, os quais desempenham função de defesa contra herbívoros (FRANCESCHI, 2001; RUIZ; WARD; SALTZ, 2002).

Nas plantas em estágio reprodutivo, os dois micronutrientes, Ca e Fe, também ocorreram em maior quantidade na parte inferior, juntamente com Mn e N. O nitrogênio é acumulado nas folhas das plantas de soja em maior intensidade após o florescimento, denominado de ponto de inflexão, e em seguida sua concentração tende a decrescer nas folhas, passando a ser translocado para os grãos em formação (CORDEIRO et al., 1979). Nas plantas em estágio reprodutivo, as concentrações de P, K, S e Cu também foram mais altas na parte superior das plantas.

O genótipo suscetível IGRA RA 626 RR apresentou em geral as maiores concentrações de macro e micronutrientes em ambos os estádios fenológicos. É bem provável que as espécies *A. gemmatilis* e *S. frugiperda* se desenvolveram melhor quando alimentadas com as folhas desse genótipo devido ao seu maior conteúdo de nutrientes, principalmente de N. O nitrogênio presente nas plantas é um dos principais componentes dos aminoácidos necessários para a dieta dos insetos (PARRA, 1990), e é imprescindível para seu crescimento e reprodução (ELDEN; KENWORTHY, 1994). Além disso, o excesso de N pode influenciar a suscetibilidade das plantas através da redução do conteúdo de lignina, tornando as estruturas vegetais mais tenras para a alimentação de insetos mastigadores (SALIM; SAXENA, 1991). O enxofre também é um dos constituintes das proteínas das plantas (SFREDO, 2008), e também foi encontrado em maiores concentrações no genótipo suscetível. O macronutriente P é requerido na formação de ácidos nucleicos, e consequentemente na síntese proteica (HUBERTY; DENNO, 2006). Nas plantas, o K atua como ativador de enzimas com função de síntese de amido e proteínas, além de 30% de toda a sua concentração serem adsorvidas às proteínas (SFREDO, 2008). Desse modo, há fortes evidências de que a lagarta-da-soja e a lagarta-militar se desenvolveram melhor nas folhas que continham maior conteúdo de proteínas e aminoácidos.

O genótipo resistente PI 227687 apresentou como exceções maiores concentrações de Cu e Fe. A função do Cu na planta está associada à ativação de algumas enzimas oxidativas, como polifenol oxidase (SFREDO, 2008), peroxidase e catalase (TAIZ; ZEIGER, 1991). A inibição dessas enzimas pelas altas concentrações de Cu resulta em acúmulo de peróxidos e compostos fenólicos nas plantas, aumentando sua resistência a insetos. A concentração de Cu também está diretamente associada ao aumento da enzima polifenol oxidase, que cataliza a conversão de compostos fenólicos para quinonas, a qual tem função na resistência a insetos-praga. Íons de Fe estão presentes no complexo heme de enzimas oxidativas, como na polifenol oxidase (UNO et al., 1987) e lignina peroxidase (ENOKI; ITAKURA; TANAKA, 1997), suportando evidências de que esse nutriente estimule suas atividades enzimáticas (BODEGOM et al., 2005), e contribua para o aumento da resistência. Dessa forma, as maiores concentrações de Cu e Fe nas folhas do genótipo PI 227687 devem ter contribuído para os altos níveis de antibiose a *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*.

Os flavonoides rutina, isoquercetrina, daidzina, daidzeina e hesperidina foram encontrados em diferentes quantidades nas partes e idades das plantas de soja. Suas concentrações foram maiores nas folhas do genótipo resistente PI 227687, parte inferior das plantas, e em plantas no estágio reprodutivo. Entre os flavonoides, rutina se destacou pelas altas concentrações nas plantas de ambas as idades; sua concentração foi 36-314x mais alta do que os demais flavonoides no genótipo resistente e 11-101x no genótipo suscetível em plantas no estágio vegetativo, ou 24-97x mais alta no genótipo resistente e 7-685x no genótipo suscetível no estágio reprodutivo. Por fim, a concentração de rutina no genótipo resistente foi cerca de 4x mais alta do que no genótipo suscetível no estágio vegetativo ou 5x mais alta no estágio reprodutivo.

Os flavonoides são compostos de polifenóis que estão presentes em várias espécies vegetais (HARBORNE, 1967), e desempenham papel de defesa a insetos-pragas entre suas principais funções para a planta (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; SIMMONDS, 2001; SIMMONDS, 2003). Os efeitos adversos causados no desenvolvimento de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* no presente trabalho estão

fortemente relacionados às maiores concentrações de flavonoides nas folhas das plantas de soja. Ambas as lagartas alimentadas com folhas do genótipo PI 227687, folhas da parte inferior das plantas ou de plantas no estágio reprodutivo tiveram seu desenvolvimento negativamente afetado, folhas nas quais também ocorreram as maiores concentrações dos flavonoides avaliados. Resultados de outras pesquisas com soja e diferentes espécies de insetos também corroboram essa hipótese (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; PIUBELLI et al., 2005). Além disso, outros estudos também demonstraram o efeito isolado de determinados flavonoides afetando negativamente insetos-pragas de soja (ISMAN; DUFFEY, 1983; GAZZONI; HULSMAYER; HOFFMANN-CAMPO, 1997; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006; PIUBELLI et al., 2006). Futuros estudos avaliando a combinação dos flavonoides rutina, isoquercetrina, daidzina, daidzeína e hesperidina em diferentes proporções são necessários para determinar acuradamente quais desses compostos e em quais concentrações causam os maiores efeitos deletérios na lagarta-da-soja e lagarta-militar.

Embora esse experimento tenha avaliado os genótipos de soja cultivados em iguais condições de nutrientes no solo, os resultados obtidos enfatizam a importância que uma fertilização balanceada pode trazer para a resistência da planta à infestação de insetos fitófagos. A fertilização em altas doses geralmente aumenta o conteúdo de nutrientes nas folhas e aceleram o desenvolvimento das plantas, no entanto, contribui para a diminuição dos compostos secundários de defesa (HARTVIGSEN; WAIT; COLEMAN, 1995), alterando a qualidade da planta hospedeira ao herbívoro. Bastos et al. (2007) verificaram que o número de lagartas de *S. frugiperda* aumentou em plantas de milho em função do aumento de N, S, Ca e Cu, enquanto Fe, P, Mg, K e Zn parecem não ter afetado sua infestação. Lourenção et al. (1984) verificaram que maiores doses de N e Mg ou menores doses de B e Zn proporcionaram maiores infestações de *A. gemmatilis* em plantas de soja. Em outro trabalho, Cardoso, Cividanes e Natale (2002) concluíram que a infestação de *A. gemmatilis* em soja não foi influenciada pelas doses de P e K.

Esse estudo demonstrou as diferenças no desenvolvimento de duas importantes pragas, *A. gemmatilis* e *S. frugiperda*, alimentadas com folhas de diferentes partes e idades de plantas de genótipos resistente e suscetível de soja.

Além disso, verificou-se que os efeitos foram relacionados com diferenças nas concentrações de alguns nutrientes e flavonoides nas plantas. Essas informações ajudam a enfatizar que a resistência das plantas aos insetos não depende de um único fator, mas de um conjunto de fatores governados por mecanismos que as tornam mais favoráveis ou não aos herbívoros.

5. Conclusões

A alimentação de *A. gemmatilis* e *S. frugiperda* com o genótipo de soja resistente PI 227687, folhas da parte inferior das plantas, ou plantas no estágio reprodutivo afetam negativamente seu desenvolvimento biológico; os efeitos adversos nos insetos são relacionados às menores concentrações dos nutrientes N, P, K e S; maiores concentrações de Cu, Fe e Ca; e maiores concentrações dos flavonoides rutina, isoquercetrina, daidzina, daidzeina e hesperidina nas folhas das plantas de soja.

6. Referências

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R.; OLIVEIRA, M. D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 137, p. 237-245, 2010.

BASTOS, S. C.; GALVÃO, J. C. C.; PICANÇO, M. C.; PEREIRA, P. R. G.; CECON, P. R. Nutrient content affecting *Spodoptera frugiperda* and *Dalbulus maidis* occurrence in corn. **Insect Science**, v. 14, p. 117-123, 2007.

BECK, S. D. Nutrition, adaptation and environment. In: RODRIGUEZ, J. G. (Ed.). **Insect and mite nutrition: significance and implications in ecology and pest management**. Amsterdam: North-Holland, 1972. p. 1-6.

BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. **Host-selection by phytophagous insects**. New York: Chapman & Hall, 1994. 312 p.

BODEGOM, P. M. V.; BROEKMAN, R.; DIJK, J. V.; BAKKER, C.; AERSTS, R. Ferrous iron stimulates phenol oxidase activity and organic matter decomposition in waterlogged wetlands. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 76, n. 1, p. 69-83, 2005.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; LOPES, G. S.; COSTA, E. N.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I. Atualidades em resistência de plantas a insetos. In: BUSOLI, A. C.; ALENCAR, J. R. D. C. C.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A.; SOUZA, B. H. S.; GRIGOLLI, J. F. J. (Eds.). **Tópicos em entomologia agrícola – VI**. Jaboticabal: Gráfica Multipress, 2013. p. 207-224.

BURGHARDT, F.; KNÜTELL, H.; BECKER, M.; FIEDLER, K. Flavonoid wing pigments increase attractiveness of female common blue (*Poliommatus icarus*) butterflies to mate-searching males. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 87, p. 304-307, 2000.

BURGHARDT, F.; PROCKSH, P.; FIEDLER, K. Flavonoid sequestration by the common blue butterfly *Poliommatus icarus*: quantitative intraspecific variation in relation to larval host plant, sex and body size. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 29, p. 875-889, 2001.

CARDOSO, A. M.; CIVIDANES, F. J.; NATALE, W. Influência da adubação fosfatada – potássica na ocorrência de pragas na cultura da soja. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 441-444, 2002.

CENTURION, J. F.; ANDRIOLI, I.; MARQUES JÚNIOR, J.; MARCGIORI, D. G. Características de latossolos roxos desenvolvidos de rochas alcalinas e básicas de Jaboticabal, SP. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, p. 226-232, 1995.

CORDEIRO, D. S.; SFREDO, G. J.; BORKERT, C. M.; SARRUGE, J. R.; PALHANO, J. B.; CAMPO, R. J. Calagem, adubação e nutrição mineral. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Ecologia, manejo e adução da soja**. Londrina: Embrapa CNPSo, 1979. p. 19-49. (Circular Técnica, 2).

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1995. 45 p. (Circular Técnica, 21)

ELDEN, T. C.; KENWORTHY, W. J. Foliar nutrient concentrations of insect susceptible and resistant soybean germplasm. **Crop Protection**, Guildford, v. 34, p. 695-699, 1994.

ENOKI, A.; ITAKURA, S.; TANAKA, H. The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 53, p. 265-272, 1997.

FORD, B. J.; STRAYER, J. R.; REID, J.; BLOUNT, V. N.; RIDDLE, T. C. **The literature of arthropods associated with soybean, a bibliography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)**. Urbana: Illinois Natural History Survey, 1975. 15 p. (Biological Notes, 92).

FORTES, P. **Desenvolvimento de uma dieta artificial para a criação de *Nezara viridula* (L., 1758) e *Euschistus heros* (F., 1798) e sua relação com *Trissolcus basalís* (Wollaston, 1858)**. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Entomologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FRANCESCHI, V. R. Calcium oxalate in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, p. 331, 2001.

GAZZONI, D. L.; HULSMAYER, A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Efeito de diferentes doses de rutina e quercetina na biologia de *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 7, p. 673-681, 1997.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvet bean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

HARBORNE, J. B.; TURNER, L. **Plant chemosystematics**. London: Academic Press, 1984. 562 p.

HARTVIGSEN, G.; WAIT, D. A.; COLEMAN, J. S. Tri-trophic interactions influenced by resource availability: predator effects on plant performance depend on plant resources. **Oikos**, Buenos Aires, v. 74, p. 463-468, 1995.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, 2012. 859 p.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; GAZZONI, D. L.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; LORINI, I.; BORGES, M.; PANIZZI, A. R.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORSO, I. A. Integrated pest management in Brazil. In: MAREDIA, K. M.; DAKOUO, D.; MOTA-SANCHEZ, D. (Eds.). **Integrated pest management in the global arena**. Trowbridge: Cabi Publishing: Cromwell Press, 2003. p. 285-299.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; RAMOS NETO, J. A.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, L. J. Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 10, p. 1453-1459, 2006.

HUBERTY, A. F.; DENNO, R. F. Consequences of nitrogen and phosphorus limitation for the performance of two planthoppers with divergent life-history strategies. **Oecologia**, Berlin, v. 149, p. 444-455, 2006.

ISMAN, M. B.; DUFFEY, S. S. Pharmacokinetics of chlorogenic acid and rutin in larvae of *Heliothis zea*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 29, p. 295-300, 1983.

KLEJDUS, B.; VACEK, J.; BENESOVÁ, L.; KOPECKÝ, J.; LAPCÍK, O.; KUBÁN, V. Rapid-resolution HPLC with spectrometry detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 389, p. 2277-2285, 2007.

KOGAN, M.; TURNIPSEED, S. G. Ecology and management of soybean arthropods. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 32, p. 507-538, 1987.

LOURENÇÃO, A. L.; MASCARENHAS, H. A. A.; GALLO, P. B.; BATAGLIA, O. C. Efeito da calagem e da adubação potássica sobre a área foliar de soja consumida por lagartas das folhas. **Bragantia**, Campinas, v. 43, n. 1, p. 211-219, 1984.

LYNN, D. G.; CHANG, M. Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 497-526, 1990.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. San Diego: Academic, 1995. 889 p.

MCNAIR, J. B. The interrelation between substances in plant: essential oil and resins, cyanogens and oxalate. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 19, p. 225-271, 1932.

MCWILLIAMS, J. M.; BELAND, G. L. Bollworm: effect of soybean leaf age and pod maturity on development in laboratory. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 70, p. 214-216, 1977.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; MURAOKA, T.; CARMO, C. A. F. S.; MELLO, W. J. Análises químicas de tecido vegetal. In: SILVA, F. C. (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. p. 171-223.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Eds.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, 2012. p. 213-334.

PARRA, J. R. P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). São Paulo: Manole/CNPq, 1990. p. 9-65.

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*? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 7, p. 1509-1525, 2005.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. Baculovirus-resistant *Anticarsia gemmatilis* responds differently to dietary rutin. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 119, p. 53-60, 2006.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 738 p.

REYNOLDS, G. W.; SMITH, C. M. Effects of leaf position, leaf wounding, and plant age of two soybean genotypes on soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) growth. **Environmental Entomology**, College Park, v. 14, p. 475-478, 1985.

RUIZ, N.; WARD, D.; SALTZ, D. Calcium oxalate crystals in leaves of *Pancratium sickenbergeri*: constitutive or induced defense? **Functional Ecology**, Oxford, v. 16, p. 99-105, 2002.

SALIM, M.; SAXENA, M. C. Nutritional stresses and varietal resistance in rice: effects on whitebacked planthopper. **Crop Science**, Madison, v. 31, p. 797-805, 1991.

SFREDO, J. G. **Soja no Brasil: calagem, adubação e nutrição animal**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 148 p. (Documentos, 305).

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

SMITH, C. M. Expression, mechanisms and chemistry of resistance in soybean, *Glycine max* L. (Merr.) to the soybean looper, *Pseudoplusia includes* (Walker). **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v. 6, n. 3, p. 243-248, 1985.

SMITH, C. M. **Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches**. Dordrecht: Springer, 2005. 423 p.

SMITH, C. M.; GILMAN, D. F. Comparative resistance of multiple insect-resistant soybean genotypes to the soybean looper. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 74, p. 400-403, 1981.

SOUZA, B. H. S.; SILVA, A. G.; JANINI, J. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Antibiosis in soybean genotypes and the resistance levels to *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 43, n. 6, p. 582-587, 2014.

STATSOFT, Inc. **Statistica** (data analysis software system), version 7. StatSoft Inc., Tulsa, 2004. Disponível em: <www.statsoft.com>. Acesso em: 12 mar. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood: The Benjamin/Cummings, 1991. 593 p.

UNO, T.; NISHIMURA, Y.; TSUBOI, M.; MAKINO, R.; IZUKA, T.; ISHIMURA, Y. Two type of conformers with distinct Fe-C-O configuration in the ferrous CO complex of horseradish peroxidase. Resonance Raman and infrared spectroscopic studies with native and deuteroheme-substituted enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 262, p. 4549-4556, 1987.

CAPÍTULO 4 – Resistência induzida em soja pela lagarta-militar: efeitos no consumo foliar, proteínas, compostos fenólicos, inibidor de tripsina, peroxidase e polifenol oxidase

Resumo – As atividades bioquímicas nas plantas de soja podem sofrer alterações após a herbivoria, resultando em mudanças na qualidade dos tecidos vegetais para os insetos fitófagos. Esse estudo avaliou a resistência induzida em soja após injúria pela lagarta-militar *Spodoptera frugiperda*, e testou a hipótese de que as diferenças no consumo foliar entre plantas previamente injuriadas pelas lagartas e não injuriadas sejam relacionadas com as concentrações de proteínas totais, compostos fenólicos totais, inibidor de tripsina, peroxidase e polifenol oxidase. Três experimentos foram realizados com plantas de soja (cv. P 4906 RR) em estágio V4, infestadas na primeira folha trifoliolada com uma lagarta de sexto ínstar de *S. frugiperda*. Os seguintes parâmetros foram avaliados entre plantas previamente injuriadas e não injuriadas: (i) consumo foliar, concentração de proteínas totais e compostos fenólicos totais; (ii) concentração de inibidores de tripsina Kunitz; (iii) e atividades da peroxidase e polifenol oxidase em três posições foliares na planta aos dois, três e seis dias após injúria. Plantas de soja previamente injuriadas por *S. frugiperda* foram menos consumidas por lagartas da mesma espécie do que plantas não injuriadas. As enzimas peroxidase e polifenol oxidase influenciaram a indução da resistência, enquanto os inibidores de tripsina Kunitz foram relacionados apenas à resistência constitutiva. A atividade da peroxidase foi maior na folha que recebeu a injúria, com aumento da atividade entre três e seis dias após a injúria. Esses fenômenos não ocorreram para polifenol oxidase. As concentrações totais de compostos fenólicos e proteínas não são parâmetros confiáveis como indicativos da resistência induzida em soja.

Palavras-chave: indução de resistência, *Spodoptera frugiperda*, enzimas oxidativas, POX, PPO, inibidor de proteinase

Induced resistance in soybeans by the fall armyworm: effects on leaf consumption, proteins, phenolics, trypsin inhibitor, peroxidase and polyphenol oxidase

Abstract – Biochemical activities in soybean plants can undergo changes following herbivory, resulting in changes in quality of leaf tissue for phytophagous insects. This study evaluated the induced resistance in soybeans following injury by the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, and we tested the hypothesis that differences in foliage consumption between injured by the larvae and uninjured plants are related with the concentrations of total proteins, total phenolics, trypsin inhibitor, peroxidase and polyphenol oxidase. Three experiments were conducted using V4-stage soybean plants (cv. P 4906 RR) infested in the first trifoliolate with one *S. frugiperda* sixth-instar larvae. The following parameters were evaluated between previously injured plants and uninjured plants: (i) foliage consumption, concentration of total proteins and total phenolics; (ii) concentration of Kunitz trypsin inhibitor; (iii) and activities of peroxidase and polyphenol oxidase in three leaf positions and at two, three and six days after injury. Soybean plants previously injured by *S. frugiperda* larvae were less consumed by larvae of the same species than uninjured plants. The enzymes peroxidase and polyphenol oxidase influence the resistance induction, whereas Kunitz trypsin inhibitors were related with constitutive resistance only. Peroxidase activity was the highest in the leaf that suffered injured, and there was an increased activity between three and six days after injury. These phenomena were not exhibited for polyphenol oxidase. Total concentration of phenolics and proteins are not trustful parameters as indicative for plant induced resistance.

Keywords: induction of resistance, *Spodoptera frugiperda*, oxidative enzymes, POX, PPO, proteinase inhibitor

1. Introdução

As atividades bioquímicas nas plantas podem sofrer alterações após injúria mecânica, herbivoria, infecção por patógenos e radiação ultravioleta (BALDWIN; SCHUTZ, 1985; LIN; KOGAN, 1990; CONCOMI et al., 1996), podendo resultar em mudanças na qualidade dos tecidos vegetais à alimentação dos insetos (COLEMAN; JONES, 1991). As diferenças na resposta da planta pelos tipos de injúria são devido aos distintos sinais gerados no local danificado. Esses sinais podem ser desencadeados a partir de fragmentos da parede celular da planta (RYAN et al., 1985), fatores da saliva dos insetos (LIN; KOGAN; FISCHER, 1990; STOUT; WORKMAN; DUFFEY, 1994), ou microrganismos associados ao seu aparelho bucal (GRISHAM, et al., 1987).

A resistência induzida já foi documentada em mais de 100 espécies de plantas, incluindo tomate (THALER et al., 1996), arroz (HAMM; STOUT; RIGGIO, 2010), trigo (EL-WAKEIL; VOLKMAR; SALLAM, 2010) e soja (LIN; KOGAN, 1990). Nesta leguminosa, a indução da resistência é conhecida por afetar negativamente a preferência alimentar e desenvolvimento dos insetos (LIN; KOGAN, 1990; KOGAN; FISCHER, 1991). Apesar de os processos bioquímicos serem complexos e ainda não estarem totalmente elucidados, a indução de resistência em soja provavelmente ocorre em função das alterações nas atividades de fitoalexinas e inibidores de proteinases após herbivoria (UNDERWOOD; RAUSHER; COOK, 2002) por diversas espécies de pragas (LIN; KOGAN, 1990; BI; FELTON; MUELLER, 1994; SRINIVAS et al., 2001; FORTUNATO et al., 2007).

Os compostos fenólicos representam um dos maiores grupos de substâncias secundárias do reino vegetal (BOUDET, 2007). Entre os compostos fenólicos destacam-se os flavonoides, isoflavonoides, taninos, ligninas, antocianinas, fitoalexinas, flavonas, gliceolinas, etc. (BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010). Os compostos fenólicos são produzidos em uma das seguintes vias metabólicas nas plantas: via do chiquimato/corismato, via do acetato/malonato e via do acetato/mevalonato (BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010). A síntese e acumulação de compostos secundários nas plantas podem ser influenciadas por

vários fatores bióticos e abióticos, tais como injúria, seca e infecção por patógenos (KEFELI; KALEVITCH, BORSARI, 2003).

Inibidores de proteinases são proteínas que participam como substâncias constitutivas e induzidas de defesa nos tecidos vegetais contra insetos e patógenos (RYAN, 1990). Eles são geralmente específicos a determinadas classes de proteinases, e depende do tipo de proteinase presente no intestino do inseto para que o inibidor de proteinase possa se ligar à proteinase e inibir sua atividade proteolítica (WOLFSON, 1991). O inibidor de tripsina Kunitz é um inibidor de tripsina da classe das serinas presente em soja que tem demonstrado efeitos anti-digestivos em larvas de lepidópteros (BROADWAY; DUFFEY, 1986; JOHNSTON; GATEHOUSE; ANSTEE, 1993; SHUKLA; ARORA; SHARMA, 2005).

A indução de resistência provavelmente é o resultado da ação conjunta da ativação e supressão de diversas enzimas, bem como de seus produtos metabólicos. As enzimas oxidativas peroxidase (POX) e polifenol oxidase (PPO) catalizam a oxidação de compostos fenólicos para quinonas, as quais são tóxicas para microrganismos e insetos (STOUT; WORKMAN; DUFFEY, 1994). Além disso, a enzima POX está associada à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres, que também apresentam propriedades antibióticas (ELSTNER, 1980). A enzima POX também participa na formação de lignina, que tem papel na reestruturação dos tecidos danificados (BOSTOCK; STERMER, 1989). O aumento da atividade enzimática de POX e PPO é relacionado com a resistência induzida de plantas a insetos e demonstraram reduzir o crescimento de lagartas de lepidópteros (FELTON et al., 1989; 1992; FELTON; SUMMERS; MUELLER, 1994). Assim, a quantificação da atividade dessas enzimas pode ser um confiável indicativo de indução de resistência em plantas de soja.

Em vista das informações obtidas até o presente, respostas induzidas em plantas de soja após herbivoria podem proporcionar eficiente defesa contra múltiplos fatores estressores futuros, como o ataque de insetos fitófagos. Portanto, esse estudo testou a hipótese de que plantas de soja injuriadas pelo inseto polífago *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) possa ativar uma resposta induzida nas plantas, e conseqüentemente reduzir o consumo foliar por lagartas dessa espécie. Além disso, tentou-se relacionar a indução de resistência

com o aumento nas concentrações totais de proteínas, compostos fenólicos, inibidor de tripsina, e aumento na atividade das enzimas oxidativas POX e PPO.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado no Departamento de Entomologia e casa de vegetação da Louisiana State University – LSU, em Baton Rouge, LA, EUA, durante o período de julho a dezembro de 2013. A cultivar comercial de soja P 4906 RR foi utilizada em todos os ensaios no estágio vegetativo V4. As lagartas de *S. frugiperda* foram obtidas de populações mantidas em laboratório e alimentadas com dieta artificial. Novos insetos foram coletados anualmente em arroz irrigado e introduzidos nessas populações a fim de manter a variabilidade genética da espécie.

2.1. Indução de resistência no consumo de lagartas de *S. frugiperda* e efeitos na concentração de proteínas totais, compostos fenólicos totais e inibidor de tripsina

Quatro sementes de soja foram semeadas por vaso de 2 L contendo substrato de plantio, e quando as plantas atingiram o estágio V2 foi realizado o desbaste, deixando-se uma planta por vaso. Plantas de soja foram infestadas em seu primeiro folíolo a partir da base com uma lagarta de sexto ínstar de *S. frugiperda*. A lagarta foi confinada no interior de uma gaiola (6 cm de diâmetro no fundo x 4 cm de diâmetro na parte superior x 5 cm de altura) feita com um recipiente plástico com abertura superior coberta com tecido *voile* e a abertura inferior fechada com espuma. A espuma foi usada para evitar qualquer lesão no tecido foliar. Para facilitar a abertura da gaiola para a introdução da lagarta sobre a folha de soja, colou-se uma presilha com uma de suas pontas aderida na parede externa do recipiente plástico e a outra ponta embaixo da espuma.

A lagarta permaneceu na gaiola durante aproximadamente 18 horas (16:00-10:00), e consumiu entre 50 e 80% de toda a folha trifoliada. Após esse período, a

lagarta foi removida e a gaiola retirada da planta. No tratamento utilizado como testemunha, foi utilizada apenas a gaiola sem a infestação da lagarta.

Após dois dias da remoção das lagartas das plantas, o folíolo central da segunda folha trifoliolada a partir da base da planta foi coletado pelo peciólulo por meio de uma tesoura para ser utilizado no teste de preferência alimentar. Os folíolos foram transferidos para sacos plásticos, os quais foram mantidos em um balde com gelo e conduzidos ao laboratório. Dos outros dois folíolos externos remanescentes, um foi utilizado para a realização das análises de compostos fenólicos totais e o outro para a análise de proteínas totais após três dias da remoção das lagartas das plantas.

2.1.1. Efeitos na preferência alimentar de lagartas de *S. frugiperda*

Realizou-se um teste de preferência alimentar com chance de escolha, instalado em delineamento inteiramente casualizado, para avaliar a preferência das lagartas de *S. frugiperda* por plantas injuriadas ou não injuriadas. Para isso, foram preparados discos foliares (2,0 cm de diâmetro) com um vazador a partir dos folíolos centrais das plantas injuriadas e não injuriadas (testemunhas), os quais foram dispostos aos pares em placas de Petri (15,0 cm de diâmetro) revestidas com papel filtro umedecido com água destilada de forma equidistante entre si e próximos à borda da placa. Em seguida, foram liberadas no centro das placas duas lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda*. O teste teve duração de 15 horas, e ao término do ensaio foi quantificada a área foliar consumida pelas lagartas por meio de um aparelho medidor de área foliar eletrônico (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, EUA).

O experimento foi realizado três vezes, sendo que no primeiro experimento foram utilizadas 15 repetições, no segundo 18 repetições, e no terceiro 21 repetições por tratamento, nas quais cada repetição foi constituída por uma placa de Petri. Os dados referentes à área foliar consumida em todos os experimentos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Levene. Pelo fato de os dados não serem normais e apresentarem valores nulos, eles foram transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$ e analisados pelo teste-t ($p < 0,05$).

2.1.2. Efeitos na concentração de proteínas totais

Para o extrato foliar, foi preparada uma solução com 100 ml de solução tampão de fosfato de potássio (pH = 7,0), 1 g de polivinilpirrolidona (PVPP) e 14,6 mg de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Em seguida, um disco foliar (2,0 cm de diâmetro) foi pesado em balança analítica (Ohaus Scale Corp., Florham Park, NJ, EUA) e macerado com 1,5 ml da solução tampão com um pistilo. O líquido foi então transferido para um tubo de ensaio (1,5 cm de diâmetro x 8,0 cm de altura), onde foi adicionado 400 µl de solução de Triton-X a 10%. Os tubos de ensaio foram homogeneizados em um vortex e centrifugado por 10 minutos a 10000 g e 4°C (FELTON; BROADWAY; DUFFEY, 1989).

Para a análise de concentração de proteínas totais, 5 µl do extrato foliar foi adicionado a 795 µl de água e 200 µl do reagente Bio-Rad (BRADFORD, 1976) em tubos de ensaio e incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida, a absorbância foi lida a 595 nm e 25°C em um espectrofotômetro de luz UV. Os resultados foram comparados a uma curva padrão construída com cinco concentrações crescentes de albumina de soro bovino (Sigma, MO, EUA).

Esse ensaio foi conduzido três vezes, utilizando-se oito repetições no primeiro experimento, e 12 repetições no segundo e terceiro experimentos. Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Levene. Os dados apresentaram distribuição normal e foram homocedásticos, e então foram analisados pelo teste-t ($p < 0,05$).

2.1.3. Efeitos na concentração de compostos fenólicos totais

Após a coleta dos folíolos, foram preparados discos foliares (2,0 cm de diâmetro) com um vazador, os quais foram pesados em balança analítica de precisão e depois mantidos em recipientes de vidro contendo 5 ml de metanol (MeOH) a 50% (ADDAI; ABDULLAH; MUTALIB, 2013) para a extração dos compostos fenólicos. Após três dias, pipetaram-se 50 µl da solução com mais 2,7 ml

de água destilada em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionaram-se 500 µl do reagente Folin-Ciocalteu dissolvido em água na proporção de 1:1. Cerca de três minutos depois, foram adicionados 500 µl de solução de carbonato de cálcio (Ca_2CO_3) anidro a 20%, e em seguida os tubos de ensaio foram homogeneizados com um vortex. Os tubos de ensaio foram incubados por uma hora, e então a solução foi transferida para cubetas de 4,5 ml. A absorbância foi aferida a 720 nm e 25°C por meio de um espectrofotômetro de luz UV.

Esse ensaio foi realizado três vezes, cada um com 12 repetições por tratamento. Os dados obtidos foram comparados com uma curva padrão construída com as concentrações de 0, 2, 5, 10, 25, 50 e 100 µl de ácido ferúlico a 0,001M. Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Levene. Os dados apresentaram distribuição normal e foram homocedásticos, e então foram analisados pelo teste-t ($p < 0,05$).

2.2. Efeitos na atividade do inibidor de tripsina

Esse experimento avaliou o efeito do inibidor de tripsina Kunitz em plantas de soja após injúria por lagartas de *S. frugiperda*. Utilizou-se a mesma metodologia para o cultivo das plantas e infestação das lagartas descrita no experimento anterior, e o experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos: plantas injuriadas, plantas não injuriadas e testemunha. O tratamento testemunha foi constituído por tripsina bovina (Sigma, MO, EUA) sem inibidor de tripsina. Após três dias da remoção das lagartas das plantas, um folíolo foi coletado com uma tesoura pelo peciólulo da segunda folha trifoliolada a partir da base da planta, armazenado em saco plástico identificado e mantido em um balde com gelo até a condução ao laboratório.

Os folíolos coletados foram utilizados para a preparação de discos foliares (2,0 cm de diâmetro) por meio de um vazador, e em seguida pesados em balança analítica de precisão. Em seguida, cada disco foliar foi colocado em um cadinho juntamente com 1,5 ml de solução tampão de fosfato de potássio (pH = 7,0) e macerado com um pistilo até a solução ficar homogênea. O líquido obtido foi transferido para tubos de ensaio e centrifugados por 10 minutos, a 10.000 g e

temperatura de 4°C. Após esse processo, os tubos de ensaio foram mantidos em um recipiente com gelo.

Para a avaliação da atividade do inibidor de tripsina nas plantas de soja foi utilizada uma metodologia adaptada de Kakade et al. (1974). Utilizando-se uma pipeta, 50 µl de solução de tripsina bovina, preparada com 5 mg dissolvida em 100 ml de água destilada, foi incubada com 50 µl do sobrenadante obtido da extração foliar em uma cubeta (1,5 ml) por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados na cubeta 400 µl de solução tampão de Tris-HCl e 500 µl de solução de N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA). O tratamento testemunha foi preparado com 450 µl de solução de Tris-HCl, 500 µl de solução de BAPNA e 50 µl de solução de tripsina. Para a cubeta utilizada como referência, utilizaram-se 500 µl de solução de Tris-HCl e 500 µl de solução de BAPNA. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro de luz UV a 410 nm, 37°C, por 3 minutos.

Os dados obtidos foram ajustados a uma curva padrão elaborada com as concentrações de 0, 10, 15, 25 e 50 µl de solução de inibidor de tripsina, correspondendo respectivamente a 0; 0,50; 0,75; 1,25 e 2,5 µg de inibidor de tripsina. Os dados obtidos analisados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Levene. Os dados apresentaram distribuição normal e foram homocedásticos, e foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando significativo utilizou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) para a separação de médias.

2.3. Indução de resistência nas atividades de POX e PPO em diferentes posições da planta e dias após a injúria

Esse ensaio avaliou a resposta induzida de plantas de soja em três posições da planta e após diferentes dias da alimentação de lagartas de *S. frugiperda* nas atividades das enzimas POX e PPO. Foram utilizadas plantas de soja em estágio V4, as quais foram mantidas em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos foram arrançados em um esquema fatorial 2 x 3 x 3, cujo primeiro fator consistiu de plantas injuriadas ou não injuriadas; o segundo fator

compreendeu as folhas em três posições na planta (parte inferior, mediana e superior); e o terceiro fator foi constituído por diferentes dias após a injúria (dois, três e seis dias). Foram utilizadas seis plantas (repetições) para cada tratamento e o experimento foi repetido duas vezes.

Uma lagarta de sexto ínstar de *S. frugiperda* foi transferida em um dos folíolos externos da primeira folha trifoliolada a partir da base da planta e foi confinada em uma gaiola presa ao folíolo, como já descrita anteriormente. A lagarta foi confinada por 18 horas (16:00-10:00), período em que consumiu entre 80 e 100% do folíolo, e então foi removida da planta. Aos dois, três e seis dias após a remoção das lagartas, um folíolo foi coletado com uma tesoura pelo pecíolulo da segunda, terceira e quarta folhas trifolioladas a partir da base da planta, armazenadas em sacos plásticos identificados e mantidos em um balde com gelo até a condução ao laboratório.

Em laboratório foi preparado um extrato foliar de acordo com a metodologia descrita no item 2.1.2 (FELTON; BROADWAY; DUFFEY, 1989). Em seguida, a atividade das enzimas POX e PPO foram medidas por meio de um espectrofotômetro de luz UV a 410 nm e temperatura de 25°C, de acordo com o método de Ryan, Gregory e Tingey (1982). Para POX, utilizaram-se 12 nM de peróxido de hidrogênio e 7,2 nM de guaiacol como substratos, enquanto para PPO utilizou-se L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA).

Os dados das atividades enzimáticas expressos em mABS min⁻¹ foram transformados em log(x) para atender aos pressupostos da normalidade e homocedasticidade. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Foram analisados os efeitos principais da indução de resistência (I), partes da planta (P) e dias após a injúria (D), e interação desses fatores. Na ocasião de efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1.1. Efeitos no consumo de lagartas de *S. frugiperda*

Plantas de soja injuriadas por lagartas de *S. frugiperda* apresentaram significativa redução no consumo foliar por lagartas de terceiro ínstar da mesma

espécie em subsequentes testes com chance de escolha no experimento 1 ($t_{28} = -4,08$; $p = 0,0011$) e experimento 3 ($t_{40} = -3,13$; $p = 0,0052$) (Figura 1).

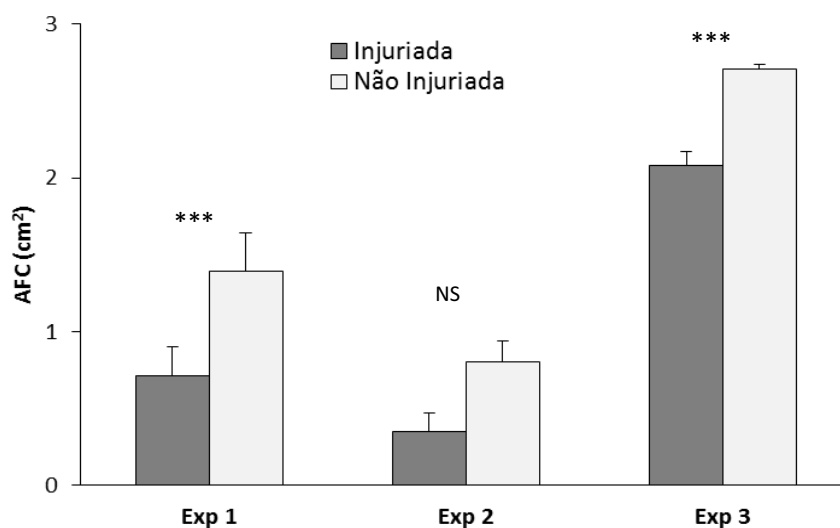


Figura 1. Área foliar consumida (AFC) de discos foliares coletados de plantas de soja injuriadas ou não injuriadas por lagartas de *Spodoptera frugiperda*. *** $p < 0,0001$; ^{NS}não significativo.

No experimento 1, os discos foliares provenientes das plantas injuriadas foram cerca de duas vezes menos consumidos do que aqueles coletados das plantas testemunhas, enquanto no experimento 3, as plantas injuriadas foram 1,3 vezes menos consumidas do que as testemunhas. Embora não tenha ocorrido diferença na indução de resistência nas plantas de soja no experimento 2 ($t_{34} = -2,06$; $p = 0,0545$), os discos foliares das plantas injuriadas foram cerca de duas vezes menos consumidos do que os da testemunha (Figura 1).

3.1.2. Efeitos na concentração de proteínas totais

Não houve diferenças significativas na concentração de proteínas totais entre as plantas de soja injuriadas ou não injuriadas pelas lagartas de *S. frugiperda* no

experimento 1 ($t_{14} = 0,43$; $p = 0,6770$), 2 ($t_{22} = 0,79$; $p = 0,4374$), e 3 ($t_{22} = 0,40$; $p = 0,6895$) (Tabela 1). No entanto, a concentração de proteínas totais foi ligeiramente superior (em média 10%) nas plantas injuriadas.

Tabela 1. Concentração (mg ml^{-1}) de proteínas totais em plantas de soja injuriadas ou não por lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Indução	Proteínas totais (mg ml^{-1})		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3
Injuriada	10,63 \pm 1,24	8,11 \pm 1,60	7,37 \pm 1,05
Não injuriada	9,89 \pm 1,23	6,77 \pm 0,54	6,84 \pm 0,79
<i>t</i>	0,43	0,79	0,40
<i>p</i>	0,6770	0,4374	0,6895

3.1.3. Efeitos na concentração de compostos fenólicos totais

A injúria por lagartas de *S. frugiperda* não proporcionou aumento significativo na concentração de compostos fenólicos totais em plantas de soja no experimento 1 ($t_{22} = 0,37$; $p = 0,7168$), 2 ($t_{22} = 1,60$; $p = 0,1238$), e 3 ($t_{22} = -0,95$; $p = 0,3529$) (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração (nM) de compostos fenólicos totais em plantas de soja injuriadas ou não por lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Indução	Compostos fenólicos totais (nM)		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3
Injuriada	8,55 \pm 0,34	9,02 \pm 0,34	10,63 \pm 0,42
Não injuriada	8,33 \pm 0,49	8,24 \pm 0,35	11,18 \pm 0,39
<i>t</i>	0,37	1,60	-0,95
<i>p</i>	0,7168	0,1238	0,3529

3.2. Efeitos na atividade do inibidor de tripsina

Houve diferença significativa ($F_{2,34} = 13,61$; $p < 0,0001$) na concentração do inibidor de tripsina Kunitz entre plantas de soja injuriadas ou não injuriadas por lagartas de *S. frugiperda* e testemunha (Figura 2). A concentração do inibidor de tripsina nas plantas injuriadas foi 8% superior em relação às plantas não injuriadas, no entanto, não houve diferença significativa entre si. A concentração do inibidor de tripsina nesses dois tratamentos foi significativamente superior em relação à testemunha (tripsina sem o inibidor de tripsina Kunitz).

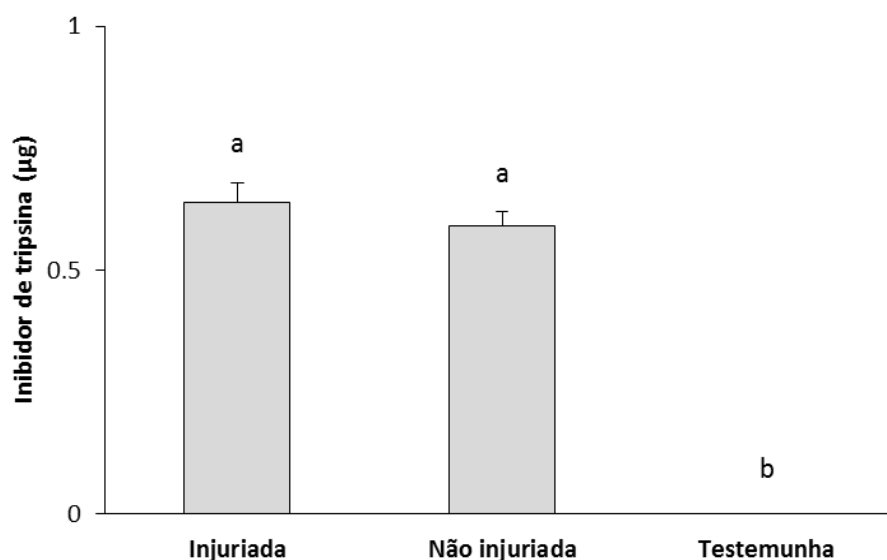


Figura 2. Concentração (µg) do inibidor de tripsina Kunitz em plantas de soja injuriadas ou não por lagartas de *Spodoptera frugiperda* e testemunha.

3.3. Indução de resistência nas atividades de POX e PPO em diferentes posições da planta e dias após a injúria

Experimento 1. Houve diferenças significativas nas atividades das enzimas POX ($F_{1,90} = 25,42$; $p < 0,0001$) e PPO ($F_{1,90} = 18,49$; $p < 0,0001$) entre as plantas de soja injuriadas e não injuriadas por lagartas de *S. frugiperda* (Tabela 3). Ambas as

enzimas oxidativas apresentaram maior atividade nas plantas injuriadas, nas quais POX obteve atividade 19% maior e PPO quase 43% maior do que suas respectivas testemunhas.

Em relação à posição da folha na planta (Tabela 3), a atividade da POX foi significativamente maior ($F_{2,90} = 44,73$; $p < 0,0001$) na folha da parte inferior, ou seja, naquela em que a lagarta se alimentou. No entanto, não houve diferença ($F_{2,90} = 0,37$; $p < 0,6955$) na atividade da PPO entre as folhas da parte inferior, mediana ou superior.

Tabela 3. Atividade (mABS min⁻¹) das enzimas peroxidase (POX) e polifenol oxidase (PPO) em plantas de soja injuriadas ou não, em diferentes posições da folha e dias após a injúria por lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Experimento 1.

Indução (I)	POX	PPO
Injuriada	68,88 ± 2,97a	9,12 ± 0,58a
Não injuriada	57,80 ± 1,96b	6,40 ± 0,39b
Posição da folha (P)		
Inferior	78,41 ± 3,83a	7,79 ± 0,78a
Mediana	54,43 ± 1,62b	7,74 ± 0,65a
Superior	57,20 ± 2,08b	7,74 ± 0,50a
Dias após injúria (D)		
Dois	60,35 ± 3,17b	7,66 ± 0,73a
Três	55,22 ± 1,78b	8,78 ± 0,71a
Seis	74,45 ± 3,55a	6,83 ± 0,44a
I	$F_{1,90} = 25,42$, $p < 0,0001$	$F_{1,90} = 18,49$, $p < 0,0001$
P	$F_{2,90} = 44,73$, $p < 0,0001$	$F_{2,90} = 0,37$, $p = 0,6955$
D	$F_{2,90} = 26,26$, $p < 0,0001$	$F_{2,90} = 2,92$, $p = 0,0592$
I x P	$F_{2,90} = 1,53$, $p = 0,2222$	$F_{2,90} = 0,94$, $p = 0,3930$
I x D	$F_{2,90} = 1,08$, $p = 0,3431$	$F_{2,90} = 0,91$, $p = 0,4058$
P x D	$F_{4,90} = 1,57$, $p = 0,1903$	$F_{4,90} = 0,62$, $p = 0,6497$
I x P x D	$F_{4,90} = 0,82$, $p = 0,5179$	$F_{4,90} = 0,12$, $p = 0,9771$

Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Plantas injuriadas por *S. frugiperda* apresentaram maior atividade da enzima POX ($F_{2,90} = 26,26$; $p < 0,0001$) aos seis dias após a alimentação das lagartas, não havendo, contudo, diferença entre o segundo e terceiro dia (Tabela 3). Por outro

lado, a atividade da PPO manteve-se semelhante aos dois, três e seis dias após injúria ($F_{2,90} = 2,92$; $p < 0,0592$).

Não houve diferença significativa na interação entre indução x posição da folha (POX, $F_{2,90} = 1,53$; $p = 0,2222$; PPO, $F_{2,90} = 0,94$; $p = 0,3930$), indução x dias após injúria (POX, $F_{2,90} = 1,08$; $p = 0,3431$; PPO, $F_{2,90} = 0,91$; $p = 0,4058$), posição da folha x dias após injúria (POX, $F_{4,90} = 1,57$; $p = 0,1903$; POD, $F_{4,90} = 0,62$; $p = 0,6497$) e indução x posição da folha x dias após injúria (POX, $F_{4,90} = 0,82$; $p = 0,5179$; PPO, $F_{4,90} = 0,12$; $p = 0,9771$) para ambas as enzimas oxidativas (Tabela 3).

Experimento 2. Plantas de soja injuriadas por lagartas de *S. frugiperda* apresentaram maior atividade das enzimas POX ($F_{1,90} = 22,03$; $p < 0,0001$) e PPO ($F_{1,90} = 4,78$; $p < 0,0315$) em relação às plantas não injuriadas (Tabela 4). A atividade da POX foi 15% superior nas plantas injuriadas em relação à testemunha, enquanto a atividade da PPO foi 37% superior.

A folha da parte inferior da planta, isto é, aquela que recebeu injúria direta por *S. frugiperda*, apresentou atividade da enzima POX significativamente maior ($F_{2,90} = 9,10$; $p = 0,0003$) do que as folhas da parte mediana e superior, que não diferiram entre si (Tabela 4). Por outro lado, a atividade da PPO foi semelhante entre as posições da folha na planta ($F_{2,90} = 0,57$; $p = 0,5706$).

A atividade da enzima POX foi significativamente afetada em relação aos dias após a injúria pelas lagartas ($F_{2,90} = 6,03$; $p = 0,0035$) (Tabela 4). A atividade dessa enzima apresentou um aumento do segundo para o terceiro dia após a injúria, com posterior decréscimo até o sexto dia. A atividade da PPO manteve-se praticamente constante ($F_{2,90} = 2,28$; $p = 0,1079$) nos diferentes dias após a injúria.

As interações entre indução x posição da folha ($F_{2,90} = 7,49$; $p = 0,0010$), indução x dias após injúria ($F_{2,90} = 6,78$; $p = 0,0018$) e indução x posição da folha x dias após injúria ($F_{4,90} = 2,66$; $p = 0,0379$) apresentaram diferenças significativas para a enzima POX (Tabela 4), enquanto para PPO não houve diferença para a primeira ($F_{2,90} = 0,68$; $p = 0,5118$), segunda ($F_{2,90} = 1,22$; $p = 0,3001$), e terceira interações ($F_{4,90} = 0,21$; $p = 0,9308$). A interação entre posição da folha x dias após

injúria não foi significativa para POX ($F_{4,90} = 2,45$; $p = 0,0517$), nem PPO ($F_{4,90} = 0,37$; $p = 0,8299$).

Tabela 4. Atividade (mABS min⁻¹) das enzimas peroxidase (POX) e polifenol oxidase (PPO) em plantas de soja injuriadas ou não, em diferentes posições da folha e dias após a injúria por lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Experimento 2.

Indução (I)	POX	PPO
Injuriada	89,93 ± 2,72a	8,10 ± 0,88a
Não injuriada	78,51 ± 1,35b	5,92 ± 0,63b
Posição da folha (P)		
Inferior	91,50 ± 3,74a	8,03 ± 1,12a
Mediana	82,49 ± 2,08b	5,65 ± 0,61a
Superior	78,66 ± 1,74b	7,38 ± 1,02a
Dias após injúria (D)		
Dois	81,42 ± 2,31b	6,36 ± 0,79a
Três	90,35 ± 3,64a	6,66 ± 1,12a
Seis	80,89 ± 1,88b	8,02 ± 0,93a
I	$F_{1,90} = 22,03$, $p < 0,0001$	$F_{1,90} = 4,78$, $p = 0,0315$
P	$F_{2,90} = 9,10$, $p = 0,0003$	$F_{2,90} = 0,57$, $p = 0,5706$
D	$F_{2,90} = 6,03$, $p = 0,0035$	$F_{2,90} = 2,28$, $p = 0,1079$
I x P	$F_{2,90} = 7,49$, $p = 0,0010$	$F_{2,90} = 0,68$, $p = 0,5118$
I x D	$F_{2,90} = 6,78$, $p = 0,0018$	$F_{2,90} = 1,22$, $p = 0,3001$
P x D	$F_{4,90} = 2,45$, $p = 0,0517$	$F_{4,90} = 0,37$, $p = 0,8299$
I x P x D	$F_{4,90} = 2,66$, $p = 0,0379$	$F_{4,90} = 0,21$, $p = 0,9308$

Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na interação entre indução x posição da folha (Tabela 5), a atividade da POX nas plantas injuriadas foi maior na folha da parte inferior, diferindo significativamente das folhas da parte mediana e superior, as quais não diferiram entre si. A atividade dessa enzima foi constante entre as posições da folha nas plantas não atacadas pelas lagartas. Pode-se observar ainda, que houve diferença na atividade enzimática apenas na folha da parte inferior entre as plantas injuriadas e não injuriadas.

Tabela 5. Indução x posição da folha na atividade da peroxidase (mABS min⁻¹) em plantas de soja submetidas ou não à injúria por lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Indução	Posição da folha		
	Inferior	Mediana	Superior
Injuriada	104,18 ± 5,75aA	84,74 ± 3,30aB	80,85 ± 2,65aB
Não injuriada	78,83 ± 2,35bA	80,24 ± 2,50aA	76,46 ± 2,22aA

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na interação indução x dias após injúria (Tabela 6), maior atividade da enzima POX ocorreu aos três dias nas plantas injuriadas por *S. frugiperda*, diferindo significativamente do segundo e sexto dia após injúria, os quais não diferiram entre si. Nas plantas não injuriadas, a atividade dessa enzima não apresentou aumento ou decréscimo ao longo do tempo. Observa-se que a indução de resistência foi maior aos dois e três dias após injúria em relação à testemunha, não sendo possível verificar diferença na atividade da enzima POX entre as plantas injuriadas e não injuriadas aos seis dias após injúria.

Tabela 6. Indução x dias após injúria na atividade da peroxidase (mABS min⁻¹) em plantas de soja submetidas ou não à injúria por lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Indução	Dias após injúria		
	Dois	Três	Seis
Injuriada	87,40 ± 3,51aB	102,42 ± 5,82aA	80,96 ± 3,20aB
Não injuriada	75,44 ± 2,35bA	79,27 ± 2,52bA	80,82 ± 2,08aA

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A interação entre indução x posição da folha x dias após injúria na atividade da POX (Tabela 7) aos dois dias após injúria por *S. frugiperda* apresentou diferença significativa entre as plantas injuriadas e não injuriadas apenas na folha da parte inferior da planta.

Tabela 7. Indução x posição da folha x dias após injúria na atividade da peroxidase (mABS min⁻¹) em plantas de soja submetidas ou não à injúria por lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Indução	2 dias após injúria		
	Inferior	Mediana	Superior
Injuriada	102,48 ± 4,54	81,80 ± 5,16	77,92 ± 2,96
Não injuriada	71,16 ± 3,97	78,53 ± 4,18	76,62 ± 4,18
Indução	3 dias após injúria		
	Inferior	Mediana	Superior
Injuriada	126,16 ± 9,52	94,03 ± 6,89	84,08 ± 3,71
Não injuriada	80,47 ± 3,67	86,12 ± 4,71	71,23 ± 2,60
Indução	6 dias após injúria		
	Inferior	Mediana	Superior
Injuriada	83,92 ± 6,81	78,40 ± 3,19	80,56 ± 6,71
Não injuriada	84,85 ± 2,76	76,08 ± 3,61	81,54 ± 3,94

Além disso, a atividade da POX na folha da parte inferior foi significativamente maior em relação às folhas da parte mediana e superior, que não diferiram entre si entre as plantas injuriadas. A atividade da POX foi semelhante entre as folhas das diferentes partes nas plantas não injuriadas. O mesmo ocorreu para a atividade da POX aos três dias após injúria. Todavia, aos seis dias após injúria, não houve diferenças na atividade da POX entre plantas injuriadas e não injuriadas dentro de qualquer posição da folha na planta, bem como entre as folhas dentro de plantas injuriadas e não injuriadas. Por fim, a atividade da POX na folha da parte inferior da planta aumentou significativamente do segundo para o terceiro dia após a injúria, reduzindo até o sexto dia, onde atingiu valores próximos aos das folhas não injuriadas. Essa diferença na atividade da enzima POX só ocorreu na folha da parte inferior da planta, ou seja, aquela que recebeu diretamente a injúria pela lagarta de *S. frugiperda*.

4. Discussão

O presente estudo demonstrou que as plantas de soja podem ter sua resistência induzida a *S. frugiperda* após injúria prévia por lagartas dessa mesma espécie. Foi possível ainda relacionar quais mecanismos desempenham papel na resposta de defesa ao inseto. Além disso, verificou-se que a atividade de enzimas oxidativas envolvidas na resistência induzida apresentam distintas intensidades de resposta nas diferentes posições da folha na planta e tempo após a injúria inicial pelas lagartas.

No primeiro ensaio de preferência alimentar com *S. frugiperda*, a injúria prévia por lagartas dessa espécie nas plantas de soja proporcionou uma resposta induzida em dois dos três experimentos realizados. Plantas previamente injuriadas pela lagarta-militar proporcionaram redução na área foliar consumida em subsequentes testes de preferência com chance de escolha em comparação às plantas não injuriadas. Em um dos três experimentos, embora não tenha ocorrido diferença significativa, o consumo foliar foi cerca de duas vezes menor nas plantas previamente injuriadas por *S. frugiperda*. Porém, nesse experimento houve grande variação nos dados de consumo foliar, e por isso não foi possível verificar diferença significativa entre tratamentos.

Vários trabalhos já demonstraram a ocorrência de resistência induzida em soja após injúria por espécies de artrópodes fitófagos. Entre as espécies, podem-se destacar *Chrysodeixis includens* (Walker), *Epilachna varivestis* (Mulsant) (LIN; KOGAN, 1990), *Tetranychus urticae* Koch (BROWN et al., 1991), *Helicoverpa zea* (Boddie) (BI; FELTON; MUELLER, 1994), e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (FORTUNATO et al., 2007). Os resultados desses estudos claramente demonstraram que plantas previamente injuriadas afetaram negativamente a subsequente preferência alimentar e/ou desenvolvimento dos insetos testados.

O presente estudo é o primeiro registro na literatura envolvendo uma resposta induzida em soja à lagarta-militar *S. frugiperda*. Embora haja evidência de ocorrência de indução de resistência em plantas previamente injuriadas por essa espécie nesse

estudo, foi demonstrado apenas os efeitos na preferência alimentar quando as lagartas receberam chance de escolha entre discos foliares de plantas injuriadas ou não injuriadas. Assim, futuros experimentos devem também avaliar os efeitos da resposta induzida da planta no desenvolvimento do inseto, a fim de confirmar se esse fenômeno também pode causar efeitos deletérios às fases larval, pupal e reprodutiva de *S. frugiperda*.

As concentrações totais de proteínas e compostos fenólicos não exerceram influência no consumo foliar pelas lagartas de *S. frugiperda* nas plantas injuriadas. Compostos fenólicos representam um grupo de substâncias secundárias que possuem função importante na defesa a estresses ambientais (HAHLBROCK; SCHEEL, 1989) e insetos fitófagos (APPEL, 1993). No entanto, é difícil inferir nesse trabalho se os compostos fenólicos são relacionados ou não à indução de resistência à lagarta-militar. O método utilizado nas análises quantificou a concentração de todas as moléculas de compostos que apresentam um grupo fenil com uma hidroxila ligada, como flavonoides, flavonas, isoflavonas, taninos, antocianinas, etc. (BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010). O mesmo é válido para o método utilizado para avaliar a concentração de proteínas totais, o qual quantificou conjuntamente o conteúdo de aminoácidos, enzimas, peptídeos, proteínas estruturais, proteínas transportadoras, e outros tipos de proteínas presentes na planta. Portanto, a quantificação da concentração de compostos fenólicos totais e proteínas totais provavelmente não constituem bons parâmetros para serem usados como indicativos de resistência induzida em plantas de soja após herbivoria pela lagarta-militar.

Há evidência de que o inibidor de tripsina Kunitz tenha influenciado apenas a resistência constitutiva em soja contra *S. frugiperda* nesse estudo. Embora a concentração do inibidor de tripsina tenha sido 8% superior nas plantas injuriadas pelas lagartas de *S. frugiperda* em relação às plantas não injuriadas, não houve diferença significativa entre as mesmas, o que suporta essa hipótese. Nesse experimento, a concentração do inibidor de tripsina Kunitz foi avaliada em plantas de soja após três dias da injúria inicial pelas lagartas. Desse modo, futuros ensaios são instigados a quantificar a concentração do inibidor de tripsina Kunitz ao longo do tempo após a injúria pela lagarta-militar para verificar se as plantas de soja

acumulam maiores concentrações desses compostos como mecanismo de defesa à herbivoria futura.

Os inibidores de proteinases são proteínas estáveis e abundantes, de estrutura molecular pequena, que são encontrados em tecidos vegetativos, órgãos reprodutivos e órgãos de reserva das plantas. Podem desempenhar função de proteínas de reserva, reguladores enzimáticos e participar do processo de defesa da planta contra estresses bióticos, como o ataque de insetos e infecção por patógenos (WALKER et al., 1997). O inibidor de tripsina Kunitz, avaliado nesse estudo, também demonstrou influenciar negativamente o desenvolvimento larval dos lepidópteros *Helicoverpa zea* (Boddie), *Spodoptera exigua* (Hübner) (BROADWAY; DUFFEY, 1986), *Spodoptera litura* (Fabricius) (MCMANUS; BURGESS, 1995), e *Helicoverpa armigera* (Hübner) (JOHNSTON; GATEHOUSE; ANSTEE, 1993; SHUKLA; ARORA; SHARMA, 2005). Contudo, aparentemente esse inibidor de tripsina não tem sua concentração aumentada nas plantas de soja após injúria por *S. frugiperda*, e parece desempenhar apenas função de defesa constitutiva ao inseto.

Em ambos os experimentos realizados, as atividades das enzimas POX e PPO aumentaram significativamente após a injúria por lagartas de *S. frugiperda*. Além disso, a atividade da POX foi maior na folha da parte inferior da planta, sobre a qual a lagarta se alimentou diretamente. Todavia, as folhas da parte mediana e superior não apresentaram aumento na atividade enzimática. A atividade da PPO, em contraste, apresentou a mesma intensidade nas três posições da folha na planta. Ainda, a atividade da POX apresentou diferenças no tempo após a injúria pela lagarta-militar, porém, diferenças não foram encontradas para PPO. No primeiro experimento, a maior atividade da POX foi verificada aos seis dias após a injúria por *S. frugiperda*. No segundo experimento, houve aumento da atividade da POX aos dois dias após a injúria, porém, o pico foi atingido aos três dias após a injúria, com decréscimo de sua atividade em níveis próximos aos de plantas não injuriadas aos seis dias após a injúria.

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas durante o metabolismo celular, porém, são moléculas tóxicas às células (MITTLER, 2002). Em condições de grande estresse por diversos fatores bióticos e abióticos há um aumento na

produção das ERO (OLSON; VARNER, 1993; BI; FELTON, 1995; MALLICK; RAI, 1999; SHARMA; DUBEY, 2005). Assim, devido à toxicidade das moléculas de ERO às células vegetais, as plantas se protegem por meio da produção de enzimas oxidativas para degradar as moléculas de ERO, destacando-se entre elas as enzimas POX e PPO (MITTLER, 2002). O aumento da atividade da POX e PPO é relacionado com a resistência induzida a várias lagartas de lepidópteros (FELTON et al., 1989; 1992; FELTON; SUMMERS; MUELLER, 1994), e também parece influenciar a resistência induzida em soja para a lagarta-militar, como demonstrado nesse estudo.

Os resultados do segundo experimento corroboram os resultados de Underwood (1998). Em seu estudo demonstrou que as quatro cultivares de soja avaliadas apresentaram indução de resistência até os três dias após a injúria pelo besouro-mexicano *E. varivestis* em subsequentes testes de preferência alimentar. Além disso, Underwood (1998) também demonstrou que o nível de resistência nas plantas decaiu drasticamente após 15 dias da injúria inicial, não diferindo das plantas não injuriadas; e após 20 dias, houve indução de suscetibilidade, de modo que as plantas injuriadas foram mais preferidas pelos adultos de *E. varivestis* em relação às plantas não injuriadas. Esses resultados demonstram que a resistência é induzida nas plantas até atingir o pico em poucos dias após a injúria, reduzindo então sua resposta, e aparentemente pode até tornar as plantas mais suscetíveis após determinado momento. Assim, fica evidente que os recursos que a planta possui para investir energia em defesa contra os insetos são limitados, e dependem das condições ambientais em que estão submetidas, como evidenciado por Simms (1992).

As lagartas de *S. frugiperda* apresentaram deterrência alimentar aos discos foliares de plantas previamente injuriadas por *S. frugiperda*. Neste ensaio, os discos foliares foram preparados com a segunda folha a partir da base das plantas de soja, enquanto a injúria inicial pelas lagartas ocorreu na primeira folha a partir da base. No entanto, a atividade da POX aumentou significativamente apenas na folha que foi diretamente injuriada por *S. frugiperda*, isto é, na primeira folha a partir da base das plantas, enquanto o segundo e terceiro trifólios não apresentaram aumento na atividade enzimática. É bem provável que as ERO produzidas a partir da injúria

inicial pelas lagartas de *S. frugiperda* tenham proporcionado o aumento de produção da enzima POX para a degradação de suas moléculas. No entanto, também há indícios de que as ERO produzidas durante a injúria também tenham participado como elicitores em uma cascada de reações de indução de defesa sistêmica na planta toda. Isso é sugerido, pois a injúria por insetos proporciona a acumulação de ERO nas plantas até um determinado limiar, passado o qual as plantas ativam um conjunto de sistemas de defesa em resposta ao fator estressor (MITHOFER; WANNER; BOLAND, 2005).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), utilizado como substrato da enzima POX avaliada nesse estudo, é uma das ERO formadas no tecido foliar após injúria (OLSON; VARNER, 1993; BI; FELTON, 1995), resultando em uma resposta local e sistêmica (OROZCO-CARDENAS; RYAN, 1999). O acúmulo de peróxido de hidrogênio no tecido vegetal danificado desempenha função de molécula sinalizadora que ativa uma reação em cadeia através da via octadecanoide, levando à produção de ácido jasmônico e à tradução de proteínas de defesa na planta (GATEHOUSE, 2002). Assim, torna-se importante avaliar outros compostos a fim de se conhecer mais profundamente os mecanismos bioquímicos pelos quais as plantas de soja se utilizam para se defender das injúrias pela lagarta-militar e outros herbívoros, bem como os produtos finais resultantes dessas rotas bioquímicas. Tais conhecimentos irão certamente auxiliar como indicativos confiáveis na avaliação da resistência induzida das plantas.

Comparando os dois experimentos com as enzimas oxidativas, a atividade da POX foi sempre superior no segundo experimento, independentemente se foram avaliadas em plantas injuriadas ou não injuriadas. No entanto, o aumento da atividade da POX nas plantas injuriadas em relação à testemunha em média foi muito similar em ambos os experimentos (13 e 16% no primeiro e segundo experimento, respectivamente). Possivelmente, as baixas temperaturas ocorridas no inverno durante a condução do segundo experimento (Novembro/Dezembro de 2013) influenciaram positivamente na maior concentração e antecipado aumento na atividade da POX.

Baixas temperaturas afetam os componentes celulares e o metabolismo da planta, e o nível de severidade é em função da intensidade e duração do estresse pela temperatura (JAN; HUSSAIN; ANDRABI, 2009). Além disso, baixas temperaturas podem causar estresse na planta de duas formas: devido aos efeitos da baixa temperatura propriamente dita; e devido à desidratação das células e tecidos quando a água celular congela (BECK; HEIM; HENSEN, 2004). A desnaturação da proteína pode ocorrer sob baixas temperaturas, resultando em dano celular (GUY; HASKELL; LI, 1998). Após esse evento, o aumento de mecanismos oxidativos pode ocorrer (AROUCA; IRIGOYEN; SÁNCHEZ-DÍAZ, 2003), bem como a indução de genes que codificam chaperonas moleculares (GUY; LI, 1998), resultando em aumento da defesa da planta. Portanto, é bem possível que as temperaturas mais baixas durante o segundo experimento tenham contribuído para o aumento na atividade da POX nas plantas injuriadas por *S. frugiperda* e nas plantas não injuriadas.

É importante mencionar que em todos os ensaios foi utilizada a cultivar P 4906 RR. O genótipo da planta é um dos principais fatores que podem influenciar a indução de resistência contra herbívoros. Diferentes genótipos de plantas apresentam distintos padrões fisiológicos de aquisição de nutrientes e sua alocação para crescimento ou defesa dependendo das condições ambientais em que as plantas são submetidas (TALLAMY; RAUP, 1991). Assim, genótipos que expressam diferentes níveis de resistência constitutiva podem proporcionar distintas intensidades de respostas induzidas contra insetos fitófagos. Portanto, futuros estudos utilizando genótipos de soja com diferentes níveis de resistência constitutiva devem ser conduzidos com o objetivo de elucidar a intensidade das respostas induzidas que as plantas podem expressar contra a lagarta-militar, bem como as atividades das enzimas POX e PPO, e inibidor de tripsina. Também são instigados estudos que avaliem a concentração de compostos fenólicos específicos, tais como flavonoides, em resposta à injúria por lagartas de *S. frugiperda*, além da influência de diferentes níveis e tempos de desfolha na indução de resistência nas plantas de soja.

5. Conclusões

Plantas de soja previamente injuriadas por *S. frugiperda* são menos preferidas pelas lagartas da mesma espécie a plantas não injuriadas. As enzimas peroxidase e polifenol oxidase influenciam a indução da resistência, enquanto os inibidores de tripsina Kunitz são relacionados apenas à resistência constitutiva. As concentrações totais de compostos fenólicos e proteínas não são parâmetros confiáveis para serem utilizados como indicativos de resistência induzida em soja. A atividade da enzima peroxidase é maior na folha que recebeu a injúria, com aumento da atividade entre três e seis dias após a injúria, fenômenos que não ocorrem para a enzima polifenol oxidase.

6. Referências

ADDAI, Z. R.; ABDULLAH, A.; MUTALIB, S. A. Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant properties of two papaya cultivars. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 7, n. 47, p. 3354-3359, 2013.

APPEL, H. M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, p. 1521-1552, 1993.

AROUCA, R.; IRIGOYEN, J. J.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Drought enhances maize chilling tolerance. II. Photosynthetic traits and protective mechanisms against oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 117, n. 4, p. 540-549, 2003.

BALDWIN, I. T.; SCHULTZ, J. C. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. **Science**, Madison, v. 221, p. 277-278, 1985.

BECK, E. H.; HEIM, R.; HENSEN, J. Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 29, n. 4, p. 449-459, 2004.

BHATTACHARYA, A.; SOOD, P.; CITOVSKY, V. The role of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 5, p. 705-719, 2010.

BI, J. L.; FELTON, G. W. Foliar oxidative stress and insect herbivory – primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 21, p. 1511-1530, 1995.

BI, J. L.; FELTON, G. W.; MUELLER, A. J. Induced resistance in soybean to *Helicoverpa zea*: role of plant protein quality. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 183-198, 1994.

BOSTOCK, R. M.; STERMER, B. A. Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 343-371, 1989.

BOUDET, A. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2722-2735, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 7, p. 248-254, 1976.

BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 32, n. 10, p. 827-833, 1986.

BROWN, G. C.; NURDIN, F.; RODRIGUEZ, J. G.; HILDEBRAND, D. F. Inducible resistance of soybean (var 'Williams') to twospotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Manhattan, v. 64, n. 4, p. 388-393, 1991.

COLEMAN, J. S.; JONES, C. G. A phyto-centric perspective of phytochemical induction by herbivores. In: TALLAMY, D. W.; RAUPP, M. J. (Eds.). **Phytochemical induction by herbivores**. New York: Wiley, 1991. p. 3-45.

CONCOMI, A.; SMERDON, M. J.; HOWE, G. A.; RYAN, C. A. The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. **Nature**, London, v. 383, p. 826-829, 1996.

ELSTNER, E. F. Metabolism of activated oxygen species. In: DAVIES, D. D. (Ed.). **The biochemistry of plants**. A comprehensive treatise. v. 11. Biochemistry and metabolism. New York: Academic Press, 1980. p. 253-315.

EL-WAKEIL, N. E.; VOLKMAR, C.; SALLAM, A. A. Jasmonic acid induces resistance to economically important insect pests in winter wheat. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 549-554, 2010.

FELTON, G. W.; BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Inactivation of proteinase inhibitor activity by plant-derived quinones: complications for host-plant resistance against noctuid herbivores. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 35, p. 981-990, 1989.

FELTON, G. W.; DONATO, K. K.; BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 38, p. 277-285, 1992.

FELTON, G. W.; DONATO, K.; DEL VECCHIO, R. J.; DUFFEY, S. S. Activation of plant polyphenol oxidases by insect feeding reduces the nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 15, p. 2667-2694, 1989.

FELTON, G. W.; SUMMERS, C. B.; MUELLER, A. J. Oxidative responses in soybean foliage to herbivory by bean leaf beetle and three-cornered alfalfa hopper. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 639-649, 1994.

FORTUNATO, F. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; BRUMANO, M. H. N.; SILVA, C. H. O.; GUEDES, R. N. C.; MOREIRA, M. A. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 80, p. 241-247, 2007.

GATEHOUSE, J. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytologist**, v. 156, p. 145-169, 2002.

GUY, C.; LI, Q. B. The organization and evolution of the spinach trees 70 molecular chaperone gene family. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 4, p. 539-566, 1998.

GUY, C.; HASKELL, D.; LI, Q. B. Association of proteins with the stress 70 molecular chaperones at low temperature: evidence for the existence of cold labile proteins in spinach. **Cryobiology**, San Diego, v. 36, n. 4, p. 301-314, 1998.

GRISHAM, M. P.; STERLING, W. L.; POWELL, R. D.; MORGAN, P. W. Characterization of the induction of stress ethylene synthesis in cotton caused by the cotton fleahopper (Hemiptera: Miridae) and its microorganisms. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 80, p. 411-416, 1987.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 347-369, 1989.

HAMM, J. C.; STOUT, M. J.; RIGGIO, R. M. Herbivore- and elicitor-induced resistance in rice to the rice water weevil (*Lissorhoptus oryzaophilus* Kuschel) in the laboratory and field. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 36, p. 191-199, 2010.

JAN, N.; HUSSAIN, M.U.; ANDRABI, K. I. Cold resistance in plants: a mystery unresolved. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3, 2009. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol12/issue3/full/3/index.html>. Acesso em: 17 ago. 2014.

JOHNSTON, K. A.; GATEHOUSE, J. A.; ANSTEE, J. H. Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 39, p. 657-664, 1993.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 51, p. 376-381, 1974.

KEFELI, V. I.; KALEVITCH, M. V.; BORSARI, B. Phenolic cycle in plants and environment. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 13-18, 2007.

KOGAN, M.; FISCHER, D. C. Inducible defenses in soybean against herbivorous insects. In: TALLAMY, D. W.; RAUPP, M. J. (Eds.). **Phytochemical induction by herbivores**. New York: Wiley, 1991. p. 347-378.

LIN, H.; KOGAN, M. Influence of induced resistance in soybean on the development and nutrition of the soybean looper and the Mexican bean beetle. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 55, p. 131-138, 1990.

LIN, H.; KOGAN, M.; FISCHER, D. Induced resistance in soybean to the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae): comparison of inducing factors. **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, p. 1852-1857, 1990.

MALLICK, N.; RAI, L. C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to the copper. **Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v. 155, p. 146-149, 1999.

MCMANUS, M. T.; BURGESS, E. P. J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive protease of larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 731-738, 1995.

MITHOFER, A.; WANNER, G.; BOLAND, WILHELM. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. **Plant Physiology**, Washington, v. 137, p. 1160-1168, 2005.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 405-410, 2002.

OLSON, P. D.; VARNER, J. E. Hydrogen peroxide and lignification. **Plant Journal**, Oxford, v. 4, p. 887-892, 1993.

OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and sistemin via de octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 96, p. 6553-6557, 1999.

RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insect and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-429, 1990.

RYAN, C. A.; BISHOP, P. D.; GRAHAM, J. S.; BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Plant and fungal cell wall fragments activate the expression of proteinase inhibitor genes for plant defense. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 12, p. 1025-1036, 1985.

RYAN, J. D.; GREGORY, P.; TINGEY, W. Phenolic oxidase activities in glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. **Phytochemistry**, New York, v. 21, p. 1885-1887, 1982.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 46, n. 3, p. 209-221, 2005.

SHUKLA, S.; ARORA, R.; SHARMA, H. C. Biological activity of soybean trypsin inhibitor and plant lectins against cotton bollworm/legume pod borer, *Helicoverpa armigera*. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 22, n. 1, p. 1-6, 2005.

SIMMS, E. L. Costs of plant resistance to herbivory. In: FRITZ, R. S.; SIMMS, E. L. (Eds.). **Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics**. Chicago: University of Chicago Press, 1992. p. 392-425.

SRINIVAS, P.; DANIELSON, S. D.; SMITH, M. C.; FOSTER, J. E. Cross-resistance and resistance longevity as induced by bean leaf beetle, *Cerotoma trifurcata* and soybean looper, *Pseudoplusia includens* herbivory on soybean. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 1, p. 1-5, 2001.

STOUT, M. J.; WORKMAN, J.; DUFFEY, S. S. Differential induction of tomato foliar proteins by arthropod herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 10, p. 2575-2594, 1994.

THALER, J. S.; STOUT, M. J.; KARBAN, R.; DUFFEY, S. S. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, p. 1767-1781, 1996.

UNDERWOOD, N. The timing of induced resistance and induced susceptibility in the soybean-Mexican bean beetle system. **Oecologia**, Berlin, v. 114, n. 3, p. 376-381, 1998.

UNDERWOOD, N.; RAUSHER, M.; COOK, W. Bioassay versus chemical assay: measuring the impact of induced and constitutive resistance on herbivores in the field. **Oecologia**, Berlin, v. 131, p. 211-219, 2002.

WALKER, A. J.; FORD, L.; MAJERUS, M. E. N.; GEOGHEGAN, A. E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, p. 173-180, 1997.

WOLFSON, J. L. The effects of induced plant proteinase inhibitors on herbivorous insects. In: TALLAMY, D. W.; RAUPP, M. J. (Eds.). **Phytochemical induction by herbivores**. New York: John Willey & Sons, 1991. p. 223-244.

CAPÍTULO 5 – Considerações finais

A cultura da soja representa uma importante fonte de recursos econômicos e matéria-prima para o Brasil. A soja é considerada uma das principais *commodities* para o país devido a sua alta produtividade, geração de renda, e participação nas exportações e na balança comercial mundial. A produção dessa leguminosa no Brasil é responsável por cerca de 30% da produção mundial (PONTES; CARMO; PORTO, 2009). Na safra 2013/2014, a produção no país foi de aproximadamente 85 milhões de toneladas em 30 milhões de hectares plantados (CONAB, 2014), e seu uso se estende desde a extração do óleo para frituras, temperos e produção de biodiesel à fonte de proteínas, diretamente para consumo *in natura* ou indiretamente como componente de rações para criação animal.

A cultura da soja está sujeita a vários problemas fitossanitários, com destaque para lagartas desfolhadoras de lepidópteros, cujos ataques reduzem significativamente o potencial produtivo das plantas. Várias espécies de lagartas desfolhadoras podem atacar a cultura da soja, algumas com importância de longa data, como a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* Hübner, e outras com importância mais recente, como é o caso da lagarta-militar *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Desse modo, a adoção de métodos de controle é imprescindível para alcançar uma produção rentável e de qualidade, mas que também seja menos impactante ao ambiente, que deixe o mínimo de resíduos nas plantas e em seus subprodutos que serão consumidos por animais e humanos, e que pouco interfira nas interações ecológicas envolvendo organismos não alvos.

A resistência de plantas é uma tática de controle dentro dos preceitos ideológicos do manejo integrado de pragas, que atende todas as pressuposições previamente mencionadas. Plantas de diversas espécies que evidenciam a presença de genes em seu genoma que expressam características fenotípicas adversas a insetos em níveis moderados ou altos já foram extensivamente relatadas na literatura. Para algumas espécies de plantas, ainda, já existem resultados conclusivos sobre qual gene ou quais genes governam a expressão dessas características. Todavia, os genes das plantas podem sofrer influências de inúmeros

fatores, inerentes à planta, ao inseto e a fatores ambientais, podendo alterar a intensidade da expressão da resistência aos insetos. Desse modo, estudos visando à avaliação de tais fatores devem ser conduzidos para gerar conhecimentos importantes acerca das condições mais propícias para a planta manifestar essa resposta; elaborar um protocolo metodológico adequado para cada espécie de planta e de inseto, e proporcionar maior praticidade em ensaios de seleção de genótipos ou *screening*.

Esse trabalho partiu do princípio de avaliar diversos fatores que potencialmente poderiam influenciar a antixenose em plantas do genótipo resistente IAC 100 e do genótipo suscetível BRSGO 8360 às espécies de lagartas oligófaga *A. gemmatalis* e polífaga *S. frugiperda*. Os ensaios com e sem chance de escolha resultaram em dados interessantes sobre a preferência alimentar de cada espécie, principalmente quanto às partes e idades das plantas. Como conclusões desse primeiro experimento, o uso de duas lagartas por disco foliar, sem suspensão de alimentação antes dos ensaios, utilizando-se discos foliares provenientes da parte superior das plantas em estágio reprodutivo proporciona a melhor diferenciação da antixenose em genótipos de soja a *A. gemmatalis*; enquanto que para *S. frugiperda*, o uso de uma lagarta por disco foliar, sem suspensão de alimentação antes dos ensaios, utilizando-se discos foliares retirados da parte inferior das plantas em estágio reprodutivo proporciona resultados mais satisfatórios. Certamente, essas informações serão valiosas em futuros *screenings* de genótipos de soja a essas pragas, principalmente em programas que partem de um grande número de materiais a serem testados.

A partir dos resultados encontrados nesses ensaios, o segundo experimento avaliou o desenvolvimento da lagarta-da-soja e da lagarta-militar em folhas das partes superior ou inferior e de plantas em estágio vegetativo ou reprodutivo. Nesse experimento foram utilizados os genótipos resistente PI 227687 e suscetível IGRA RA 626 RR. Além disso, foram avaliadas concentrações dos macro e micronutrientes e de nove flavonoides nas folhas, suportando hipóteses de que estes podem ser alguns dos mecanismos responsáveis pelos níveis de antibiose expressos principalmente no genótipo resistente.

Tanto a lagarta-da-soja quanto a lagarta-militar apresentaram desenvolvimento negativamente afetado quando foram alimentadas com folhas do genótipo resistente PI 227687, folhas da parte inferior e de plantas em estágio reprodutivo. De forma geral, a alimentação das lagartas com folhas da parte superior ou com plantas no estágio vegetativo não permitiram a diferenciação do genótipo resistente do suscetível, com base nos parâmetros biológicos dos insetos. Essas informações são de grande relevância, uma vez que em uma possível seleção de genótipos, o uso arbitrário de partes ou idades da planta que não apresentam as características, químicas ou morfológicas, que conferem resistência ao inseto pode levar a conclusões errôneas, e até mesmo a descartar genótipos que apresentem genes de resistência.

As diferenças nos parâmetros biológicos dos insetos foram fortemente relacionadas às diferenças nas concentrações de nutrientes e flavonoides nas folhas, ou mesmo ao efeito associado entre eles. Os efeitos adversos em *A. gemmatilis* e *S. frugiperda* são relacionados às menores concentrações dos nutrientes N, P, K e S; maiores concentrações de Cu, Fe e Ca; e maiores concentrações dos flavonoides rutina, isoquercetrina, daidzina, daidzeína e hesperidina nas folhas das plantas. Com base nesses resultados, futuros estudos são necessários com o intuito de avaliar a influência dos flavonoides encontrados nas plantas de soja na seleção hospedeira e desenvolvimento da lagarta-da-soja e lagarta-militar, seus efeitos isolados e a interação entre eles; identificação e quantificação de outros flavonoides e seus efeitos sobre os insetos; e a influência da aplicação de nutrientes nas plantas, sua relação com a produção de flavonoides, e os impactos na interação com as lagartas.

A resistência nas plantas pode ser dividida em constitutiva e induzida. A resistência constitutiva ocorre quando as características relacionadas à defesa são expressas constantemente nas plantas, sem depender do reconhecimento de elicitores, como o ataque de insetos fitófagos. Por outro lado, a resistência induzida é manifestada na planta como uma resposta em função da herbivoria (STOUT, 2013; BOIÇA JÚNIOR et al., 2014; SOUZA; BOIÇA JÚNIOR, 2014). Nesse contexto, o terceiro experimento objetivou avaliar se as plantas de soja são capazes de induzir

uma resposta de defesa a *S. frugiperda* após injúria por lagartas dessa espécie, bem como quantificar quais os potenciais mecanismos químicos envolvidos. Na maioria dos ensaios realizados, plantas previamente injuriadas pelas lagartas foram menos preferidas em testes com chance de escolha. A resistência induzida em soja é relacionada às maiores atividades das enzimas oxidativas peroxidase e polifenol oxidase, enquanto os inibidores de tripsina parecem influenciar apenas a resistência constitutiva. As concentrações totais de proteínas e compostos fenólicos foram parâmetros muito gerais e não representam bons indicadores da resposta induzida de defesa em soja à lagarta-militar.

Esse experimento utilizou a cultivar comercial P 4906 RR, considerada suscetível ao ataque de insetos, e assim, futuros estudos devem avaliar genótipos com diferentes níveis de resistência constitutiva. Os resultados advindos desses estudos auxiliarão no conhecimento sobre as respostas induzidas nas plantas a lagartas desfolhadoras, e quais são os papéis das enzimas oxidativas e inibidores de proteinases. Também são encorajados estudos que avaliem a concentração de compostos fenólicos específicos, como os flavonoides, após herbivoria, e a influência de intensidades e tempos de desfolha na indução de resistência em soja.

O conjunto de conhecimentos básicos acerca dos mecanismos que governam a resistência constitutiva e induzida em soja darão subsídios para a atualização do Manejo Integrado de Pragas nessa cultura. O MIP-Soja foi um dos programas de maior sucesso no mundo. Antes de sua implantação, até a década de 1970, o controle de pragas era realizado sem qualquer critério técnico-científico, e baseava-se apenas na experiência dos agricultores. Essa prática resultava em elevado número de aplicações e altas doses de inseticidas (MOSCARDI; SOSA-GÓMEZ, 1996). Com a prática do MIP-Soja, a frequência de aplicações foi reduzida em mais de 50% no Brasil, sem diminuir a produtividade (GAZZONI, 1994).

Espera-se que os resultados encontrados nesse trabalho possam contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos de defesa das plantas de soja às lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*. Além disso, as informações aqui fornecidas podem servir como base para futuros estudos a serem aplicados em programas de Manejo Integrado de Pragas na cultura da soja.

Nesse contexto, por exemplo, essas informações poderiam ser úteis para auxiliar na estimativa de novos níveis de dano econômico baseando na intensidade da resposta de defesa das plantas em função de diferentes níveis de injúria. Assim, saberia-se especificamente para cada espécie de praga e cultivar de soja quais os limites máximos suportados pelas plantas e necessários para desencadear uma resposta de defesa, e se a ativação da defesa induzida influencia o crescimento das plantas. Além disso, a avaliação da fertilização mineral em diferentes doses em cultivares resistentes e suscetíveis de soja poderiam resultar em diferentes padrões de alocação desses nutrientes para crescimento ou defesa da planta contra insetos fitófagos, e essas informações seriam muito importantes para o conhecimento de uma fertilização balanceada para cada cultivar. Por fim, o mapeamento dos genes responsáveis pela resistência induzida em soja por meio de marcadores moleculares poderia contribuir para sua futura introgressão em cultivares com características agronômicas desejáveis, possibilitando, assim, à planta ativar uma resposta de defesa apenas quando os fatores de estresse estivessem presente.

Referências

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; COSTA, E. N.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I.; RIBEIRO, Z. A. Resistência de plantas e produtos naturais e as implicações na interação inseto-planta. In: BUSOLI, A. C.; SOUZA, L. A.; ALENCAR, J. R. D. C. C.; FRAGA, D. F.; GRIGOLLI, J. F. J. **Tópicos em entomologia agrícola – VII**. Jaboticabal: Gráfica Multipress, 2014. p. 291-308.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto/2014**. Brasília: Conab, 2014. 84 p.

GAZZONI, D. L. **Manejo de pragas na soja: uma abordagem histórica**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 72 p. (EMBRAPA CNPSo. Documentos, 78).

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Soybean in Brazil. In: PERSLEY, G. J. (Ed.). **Biotechnology and pest management**. London: CAB International, 1996. p. 95-108.

PONTES, H. L. J.; CARMO, B. B. T.; PORTO, A. J. V. Problemas logísticos na exportação brasileira de soja em grão. **Revista Eletrônica Sistemas & Gestão**, v. 4, n. 2, p. 155-181, 2009.

SOUZA, B. H. S.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Resistência induzida em plantas para o controle de pragas agrícolas. In: BUSOLI, A. C.; SOUZA, L. A.; ALENCAR, J. R. D. C. C.; FRAGA, D. F.; GRIGOLLI, J. F. J. **Tópicos em entomologia agrícola – VII**. Jaboticabal: Gráfica Multipress, 2014. p. 79-88.

STOUT, M. J. Reevaluating the conceptual framework for applied research on host-plant resistance. **Insect Science**, v. 20, p. 263-272, 2013.