

**Tabela 2.3.** Altura de planta e danos causados por *Sternechus subsignatus* em diversos genótipos de soja em situação de livre escolha em caixas de amianto<sup>1</sup>. Ensaio 2. dezembro 2001.

| Genótipo   | Altura de planta (cm) | Número de danos             |                    |          |                |        |               |                          |
|------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------|----------|----------------|--------|---------------|--------------------------|
|            |                       | Alimenta-ção <sup>2,3</sup> | Trifólios cortados | Posturas | Plantas mortas | Galhas | Larvas mortas | Danos total <sup>4</sup> |
| BR-16      | 54,8 a                | 1,0                         | 5,2 a <sup>3</sup> | 9,4 a    | 0,4            | 4,5 a  | 4,6           | 16,0 a                   |
| IAC 23     | 51,5 a                | 1,7                         | 4,7 ab             | 8,9 a    | 0,7            | 2,3 ab | 3,9           | 16,0 a                   |
| FT-2       | 50,0 a                | 1,6                         | 6,0 a              | 5,5 a    | 0,4            | 2,4 ab | 3,2           | 13,2 ab                  |
| BRSMG 68   | 49,1 ab               | 1,5                         | 4,3 ab             | 5,4 abc  | 0,8            | 1,1 b  | 4,3           | 12,0 abc                 |
| PI 229358  | 42,3 b                | 1,3                         | 4,2 ab             | 5,9 abc  | 0,3            | 2,3 ab | 3,4           | 11,7 abc                 |
| IAC 24     | 51,1 a                | 1,0                         | 3,1 bc             | 7,2 ab   | 0,5            | 2,8 ab | 3,6           | 10,9 bc                  |
| IAC 100    | 41,8 b                | 1,2                         | 2,7 c              | 4,0 bc   | 0,9            | 0,4 b  | 3,6           | 8,5 bc                   |
| PI 227687  | 43,1 b                | 1,4                         | 3,1 bc             | 3,1 c    | 0,2            | 0,8 b  | 2,4           | 8,0 bc                   |
| PI 171451  | 31,4 c                | 0,8                         | 2,7 c              | 3,5 bc   | 0,4            | 0,4 b  | 2,3           | 7,4 c                    |
| Valor de F | 11,69                 | 1,805                       | 7,198              | 6,115    | 1,469          |        | 5,442         | 1,090                    |
| Prob. F.   | <0,001                | 0,09                        | <0,001             | <0,001   | 0,184          | <0,001 | <0,001        | 0,381                    |

<sup>1</sup> 9 plantas e 18 adultos/caixa. Os insetos foram retirados das caixas 6 dias após a infestação, realizada 40 dias após a semeadura

<sup>2</sup> Dano por alimentação: raspagens de 1 a 5 cm nos ramos e/ou caule

<sup>3</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%



## 2.2. Isolamento e identificação de substâncias químicas relacionadas à resistência da soja a insetos (04.2000.336-02)

Clara Beatriz Hoffmann-Campo<sup>1</sup>  
Lenita Jacob Oliveira<sup>1</sup>, Rodrigo M. Monte<sup>2</sup>,  
Giorla Carla Piubelli<sup>3</sup>  
& Angélica Maria de Toledo<sup>4</sup>

### 2.2.1. Identificação de flavonóides nas fontes de resistência (PI171451, PI 227687, PI 229358 e PI 274454) e outros genótipos de interesse.

Para identificar substâncias químicas envolvidas na resistência de germe-

plasma de soja a insetos desfolhadores, folhas da PI 274454, PI 229358, PI 171451, PI 227687, 'IAC 100' (resistentes) e '' (suscetível) foram submetidas à extração em etanol (EtOH) 70%. Após 12h de agitação, o extrato foi filtrado e eluído com MeOH 80%, em coluna cromatográfica aberta de vidro com Amberlite XAD-4. O extrato resultante, foi concentrado em rotavapor, sendo uma alíquota retirada, diluída na

<sup>1</sup> Embrapa Soja

<sup>2</sup> Estudante UNOPAR

<sup>3</sup> Estudante de Doutorado UFPR

<sup>4</sup> Estudante UNIFIL

proporção 30:1 com MeOH 80% e injetada no HPLC.

Vagens de soja das cultivares, 'IAC 100' (resistentes) 'Embrapa-4' e 'BRSMG 68' foram colhidas e pesadas, sendo uma alíquota (200 mg) de cada amostra acondicionada em 'ependorf' e macerada com pistilo adaptado ao recipiente, com 1 ml de MeOH 80% e centrifugada por 10 min. O sobrenadante foi seco, através do fluxo de nitrogênio, e ressolubilizado em MeOH 80%, de onde retirou-se uma amostra que foi diluída (1:5) e injetada (20 L) no HPLC. Os cromatogramas de folhas e vagens foram armazenados para a identificação das substâncias. Para tanto, os espectros (UV) de cada pico foram comparados com padrões autênticos ou com dados obtidos na literatura.

Nas folhas, observou-se a predominância dos flavonóis glicosídicos baseados em quercitina (3,5,7,3',4'-OH), canferól (3,5,7,4'-OH) e isoramnetina (3' Me quercetina); as isoflavonas daidzeina (7,4'-OH) e genisteina (5,7,4'-OH) e seus glicosídeos foram observadas em vagens. De modo geral, os genótipos com característica de resistência a desfolhadores apresentaram rotina (quercitina 3-O- rutinosídeo) em sua composição química foliar. Esse flavonóide e outras quercitinas glicosídicas, embora muito freqüentes nas plantas em geral, tem sido citadas como biologicamente ativas, afetando, não só o comportamento como a fisiologia de pragas da soja (Hoffmann-Campo et al. 2001, Entomol. Exp. et Appl. 98: 181-194), inclusive da lagarta da soja. Na cultivar testemunha susceptível o maior

traço observado foi o correspondente ao espectro de um canferól glicosídico. Como essa característica foi também foi observado em 'Davis', provavelmente a medida que os genótipos vão sendo melhorados para outras características, vão perdendo as substâncias que lhe conferem resistência a insetos e aumentando a de outros flavonóis.

Os picos correspondentes às isoflavonas (genistina e daidzina) foram observadas apenas em folhas nos cromatogramas de 'IAC 100' e da PI 227687, genótipos que são reconhecidamente resistente a insetos, especialmente lagartas. Por outro lado, esses isoflavonóides foram identificados em extratos de vagens de todos os genótipos testados.

Os dados, entretanto, não são conclusivos e mais estudos precisam ser realizados, principalmente, no que diz respeito à análise quantitativa dos flavonóides em folhas e vagens de genótipos de soja com característica de resistência.

### 2.2.2 Avaliação de métodos de eluição no HPLC para separação de flavonóides extraídos de folhas de soja

A eficiência de dois métodos de separação de flavonóides através de HPLC (Shimadzu, modelo SPD-M10A VP) foram testados, sendo um uma modificação do método desenvolvido por Hoffmann-Campo (University of Reading, PhD Thesis, 1995) e outro o método padrão utilizado no Phytochemistry Lab. (School of Plant

Science, The Reading University, UK). Os dois métodos seguiram o sistema de gradiente linear e a fase móvel de ambos foi composta de duas fase: ácido acético 2% (fase A) e uma solução de MEQH:AA:H<sub>2</sub>O, na proporção de 18:1:1 (fase B).

No primeiro, a condição inicial foi 70% de A e 30% de B, atingindo aos 15 min o valor de 62% de A e 38% de B, permanecendo assim até os 38 min. Aos 40 min, voltou-se à condição inicial de 70% de A e 30% de B quando então, os flavonóides já haviam sido eluídos e detectados. No segundo método, a condição inicial foi de 75% de A e 25% de B passando para 35% de A e 65% de B em 23 min, voltando para a condição inicial aos 25 min e assim mantido até 30 min para limpeza da coluna. Amostras de 20L dos extratos de cada genótipo foram injetadas e eluídas num fluxo de solvente de 1,0 ml/min; a absorção UV foi medida a 260 nm. A temperatura da coluna foi mantida em 26°C. Os cromatogramas foram armazenados, sendo os espectros (UV) e o tempo de retenção de cada picos comparados com padrões autênticos ou com dados obtidos na literatura.

O resultados obtidos sugerem que o método 2 possibilitou uma diminuição no tempo para o desenvolvimento total do cromatograma de mais ou menos 10 min e, conseqüentemente, economia de solvente. O tempo de retenção dos flavonóides de interesse para a resistência a insetos não variaram muito sendo o de rutina 19:49 e 16:44 min e o de genistina 16:52 e 14:52 min, respectivamente, na média. Além disso,

os picos dos flavonóides nos genótipos com característica de resistência a insetos ficaram mais separados, permitindo a identificação dos flavonóides de interesse. Porém, para a sua quantificação esses método precisa ser aprimorado.

No extrato da cultivar testemunha não foram detectados nenhum dos flavonóides de interesse para a resistência a insetos desfolhadores (Tabela 1). Apesar de não apresentarem precisão absoluta, os dados de área dos picos indicam a concentração relativa das substâncias. Assim, a maior concentração, tanto de genistina como de rutina foi observada no extrato de folhas da PI 274454. A isoflavona daidzina não foi observada nos cromatogramas de extratos de folhas; esta substância parece ser mais específica de vagens de soja.



### 2.3. Bioatividade de genótipos de soja resistentes a insetos e interações das suas substâncias químicas com as pragas e os inimigos naturais (04.2000.336-03)

Lenita J. Oliveira<sup>1</sup>, Giorla C. Piubelli<sup>2</sup>,  
Angélica Maria de Toledo<sup>3</sup>, Clara Beatriz  
Hoffmann-Campo<sup>1</sup> & Flávio Moscardi<sup>1</sup>

#### 2.3.1. Teste de atividade biológica de extratos de folhas de diversos genótipos de soja, misturados à

<sup>1</sup> Embrapa Soja

<sup>2</sup> Doutoranda UFPR

<sup>3</sup> Estudante de biologia UNIFIL