

Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e indução dos compostos fenólicos da soja

UEDA, T. E.¹; GRAÇA, J. P.²; SALVADOR, M. C.³; GOIS, M. S.⁴; LUSKI, P. G.⁵; DIAS, B. F.⁶; VENTURA, M. U.⁷; OLIVEIRA, M. C. N. DE⁸; HOFFMANN-CAMPO, C. B.⁸

¹Doutoranda, Universidade Estadual de Londrina, tatiana_ueda@hotmail.com; ²Pós-doutorando, CNPq; ³Professor, Instituto Federal de Mato Grosso; ⁴Mestranda, Universidade Estadual de Londrina; ⁵Graduanda, Centro Universitário Filadélfia; ⁶Graduanda, Universidade Norte do Paraná; ⁷Professor, Universidade Estadual de Londrina; ⁸Pesquisador, Embrapa Soja

Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é um dos produtos agrícolas de maior importância econômica para o Brasil, considerando-se sua produtividade e participação nas exportações no mercado internacional. Estima-se que a safra brasileira 2015/2016, a qual está praticamente finalizada, atinja uma produção de 96 milhões de toneladas, ocupando posição de destaque nas exportações do país (CONAB, 2016).

Durante todo o ciclo, espécies vegetais de importância econômica estão vulneráveis ao ataque de diversos insetos e patógenos. Na cultura da soja, estimativas de perda são da ordem de 37% da produção, das quais aproximadamente 13% são causadas por insetos (SILVA-FILHO;

FALCO, 2000). Dentre as principais pragas desfolhadoras da cultura, podemos destacar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) que pode consumir até cerca de 100 a 150 cm² de área foliar, na sua fase larval (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000), causando severos danos à planta, em regiões cultivadas em todo o país.

Dentro do melhoramento vegetal, a resistência das plantas visa o estudo e a busca de novos materiais ou fontes de resistência (PI “Plant introduction”, genótipos selvagens, etc) de interesse agrônômico e biológico (SCHOONHOVEN et al., 2005) para o desenvolvimento de cultivares tolerantes e/ou resistentes a pragas. Durante a interação inseto-planta vários metabólitos secundários são relacionados aos mecanismos de resistência das plantas, como antibiose e antixenose (KIM et al., 2014; YAN et al., 2015). Na soja, os flavonoides, constituem um grupo de substâncias derivados da rota dos fenilpropanoides, conhecidos pela sua capacidade de afetar o desenvolvimento de pragas (DU et al., 2010). Essas substâncias químicas podem ser tóxicas ou repelentes com efeitos deletérios sobre importantes pragas da soja (HOFFMANN-CAMPO, 1995). Algumas dessas substâncias são constitutivas da planta, no entanto, podem ter suas rotas metabólicas induzidas (STOUT, 2013).

Assim, este trabalho teve como objetivo determinar a capacidade de IAC 24, PI 227687 (resistentes a insetos) induzirem a ativação da rota de fenilpropanoides, em comparação com as cultivares BRS 257 e BMX Potência RR, avaliando a interferência dessa indução na capacidade de defesa das plantas ao ataque de *A. gemmatalis*.

Material e Métodos

Cultivo das plantas: Os genótipos IAC 24, PI 227687 (resistentes à insetos), BRS 257 e BMX Potência RR (suscetíveis) foram semeados em vasos plásticos de 5 litros e cultivados em casa-de-vegetação sob temperatura (28 °C ± 2 °C), umidade relativa (70%) e fotoperíodo (14 h) controlados. No estágio V5 (FEHR; CAVINESS, 1977), os trifólios foram coletados, lavados em água com 5% de hipoclorito de sódio, enxaguados, secos, sendo o pecíolo enrolado em algodão úmido para

evitar o ressecamento da folha e oferecidas às lagartas.

Biologia dos insetos: As lagartas da espécie *A. gemmatalis* foram obtidas da criação massal da Embrapa Soja. No 3º instar, as lagartas foram pesadas e individualizadas em recipientes plásticos (200 mL). Durante o desenvolvimento, os insetos foram mantidos em câmara B.O.D. (“Biochemical Oxygen Demand”) em condições controladas de temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotoperíodo (14 h). Foram realizadas avaliações diárias do inseto até atingir a fase de pupa, observando-se a duração dos estágios larvais e pupal (dias) e mortalidade (%). Após 48 h da transformação, as pupas foram pesadas. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 50 repetições por tratamento (genótipo).

Metabólitos constitutivos e induzidos por *A. gemmatalis*: Para observação do comportamento dos flavonoides constitutivos e induzidos, plantas de soja foram crescidas nas condições descritas anteriormente até o estágio V5, e seus trifólios individualizados em gaiolas de tecido de voil (sem removê-los da planta). Para ocasionar a indução, foram utilizadas lagartas de 5º instar de *A. gemmatalis* para herbivoria. Após 48 h, os trifólios lesionados e controle foram coletados, imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para extração dos compostos fenólicos, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido em almofariz, transferidas para tubo “Falcon” (15 mL) e pesadas, seguido da adição de 5 mL de MeOH 90%. As amostras foram então submetidas ao banho de ultrassom por 20 minutos e centrifugadas a 5650 rpm a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. O sobrenadante das amostras foi coletado com auxílio de pipetas Pasteur, transferido para tubos, e secos sob corrente de vácuo. Depois de completamente secas, as amostras foram resolubilizadas em 1,5 mL de MeOH 80% e filtradas em filtros-seringa (“Acrodiscos”) com membrana Millipore® $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e transferidas para os *vials* do auto-injetor. A identificação e quantificação dos isoflavonoides foi realizado em HPLC-Shimadzu (modelo Prominence 20A®) com detecção (SPD-M20A), coluna C18, 5μ , $4,6 \times 250\text{mm}$ (Thermo Scientific®); fase móvel (A) MeOH/CH₃COOH/H₂O – 90:5:5 v/v e (B) H₂O/CH₃COOH – 98:2 v/v,

em gradiente 75 até 25% da fase B em 40 minutos, seguido de regime isocrático por 5 minutos e mais 5 minutos nas condições iniciais.

Análise estatística: O delineamento estatístico para este experimento foi o inteiramente casualizado com quatro genótipos e dois tratamentos: Induzido (com dano) e Constitutivo (sem dano), com 10 repetições. A mortalidade das lagartas foi comparada pelo teste de qui-quadrado (χ^2), conforme Banzatto & Kronka (1992), ao nível de 5% de probabilidade. As demais variáveis foram submetidas à análise exploratória para a verificação dos pressupostos exigidos para a análise de variância (ANOVA). Em seguida, foram realizadas comparações múltiplas das médias pelo teste de Tukey e Duncan a 5% de probabilidade, utilizando o pacote Statistical Analysis System, versão 9.2 (2009).

Resultados e Discussão

Biologia de *A. gemmatalis*

De modo geral, os aspectos biológicos avaliados em *A. gemmatalis* foram afetados pelos genótipos de soja. O maior peso inicial ($p < 0,05$) de lagartas foi observado nas lagartas alimentadas na cultivar suscetível BMX Potência RR e uma redução importante do peso das pupas foi observado quando as lagartas se alimentaram da PI 227687. Com relação à duração do estágio larval, o maior período foi observado no grupo de lagarta alimentada com folhas de IAC 24 e, o menor, naquelas alimentadas com a cultivar suscetível BMX Potência RR (Tabela 1).

A mortalidade das lagartas ocorreu em função do genótipo que elas se alimentaram ($3; c^2 > 0,05$). A maior porcentagem de mortalidade foi observada para *A. gemmatalis* alimentada na cultivar IAC 24 (22%). Enquanto, as menores porcentagens de mortalidade, ocorreram nas lagartas alimentadas de folhas das cultivares suscetíveis, BRS 257(4%) e BMX Potência RR (2%). Esse efeito sobre os insetos herbívoros pode estar relacionado com os componentes químicos dos genótipos que apresentam características de resistência aos insetos praga (PIUBELLI et al., 2005).

Metabólitos secundários em genótipos de soja

Os resultados obtidos indicaram que a herbivoria causada pela lagarta desencadeou a ativação da rota dos fenilpropanoides. De forma geral, foi possível observar o aumento da concentração dos isoflavonoides analisados, como daidzina, genistina, malonil daidzina, malonil glicitina, acetil daidzina, daidzeína e genisteína. Dentre os isoflavonoides analisados nas amostras quantificadas, destacou-se o glicosídeo genistina que apresentou aumento na concentração em todas as cultivares analisadas após injúria. Outros isoflavonoides como glicitina, malonil genistina e acetil daidzina não haviam sido detectados nas plantas intactas (sem danos), sugerindo a sua indução após a herbivoria. Além dessas substâncias, a fitoalexina coumestrol também foi induzida em todas as cultivares, enquanto o flavonol rutina apresentou aumento de sua concentração apenas na cultivar PI 227687, e induzida apenas no genótipo IAC 24 em resposta ao dano (Tabela 2). No caso do coumestrol estudos relacionados à adição deste composto à dieta artificial provocaram redução no peso de *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) (ROSE et al., 1988). Nesse trabalho, este composto foi induzido em todas as cultivares após dano ocasionado por *A. gemmatalis*, mostrando-se um composto constitutivo da planta, estando a sua produção relacionada possivelmente como um mecanismo de defesa a injúria ocasionada pela lagarta.

Os flavonoides são descritos como os principais metabólitos secundários da soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001), sendo o seu efeito, variável conforme a sua concentração, atuando como atraente, deterrente, repelente, ou até mesmo tóxico para determinadas pragas da cultura. Alguns compostos em suas formas glicosídicas como, daidzina e genistina, por exemplo, são compostos constitutivos da planta, no entanto, podem aumentar suas concentrações após serem danificadas por percevejos, incrementando a sua ação deletéria sobre esse inseto (PIUBELLI et al., 2003), ou, após hidrólise podem produzir as agliconas, que em geral são ainda mais tóxicas para os insetos. Neste trabalho, resultado similar foi verificado com genistina, que apresentou um aumento na sua concentração em todas as cultivares analisadas após

dano ocasionado por *A. gemmatalis*. Outros autores como Piubelli et al. (2003) também avaliaram genótipos de soja resistentes (PI 227687, IAC 100 e PI 274454) e verificaram que estes, apresentaram um aumento na concentração de genistina após serem danificados. Este glicosídeo junto com o flavonol rutina, possuem ação sinérgica, e são conhecidos por afetarem negativamente o desenvolvimento de lagartas como *Trichoplusia ni* (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001) e *A. gemmatalis* (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). Tal fato pode estar relacionado à maior mortalidade observada nos genótipos IAC 24 e PI 227687 já que estes foram as únicas cultivares a apresentarem rutina associada à genistina em sua composição fisiológica.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam que os genótipos IAC 24 e PI 227687 causam maior mortalidade da lagarta em relação às demais cultivares. 'IAC 24' também afeta o tempo de desenvolvimento de *A. gemmatalis* aumentando a duração do período larval. Com relação à injúria às folhas causadas por *A. gemmatalis*, é possível sugerir que em resposta ao ataque, as cultivares de soja utilizam a via dos fenilpropanoides, aumentando e/ou induzindo compostos fenólicos, como o coumestrol, composto este detectado apenas após herbivoria. Já genistina, presente constitutivamente nas plantas controle, aumenta a sua concentração após o dano. Esse composto, provavelmente em ação conjunta com a rutina, causa efeito negativo na lagarta. Assim, o conhecimento do comportamento de defesa e proteção das plantas é um fator importante para obtenção, por melhoramento genético, de cultivares mais resistentes a estresses. As informações relacionadas à ativação do metabolismo secundário de plantas pode ser um aliado na ativação ou silenciamento de rotas metabólicas, acelerando o processo de obtenção de genótipos resistentes, através do melhoramento tradicional ou pelas modernas técnicas biotecnológicas.

Referências

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação Agrícola.**

Jaboticabal: FUNEP, 1992. 247p.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_16_49_15_boletim_graos_junho__2016_-_final.pdf> Acesso em: 08 jun. 2016.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development.**

Cooperative Extension Service; Agriculture and Home Economics Experiment Station, Iowa State University of Science and Technology, 1977. p. 25-26.

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

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; HARBORNE, J.B.; MCCAFFERRY, A.R. Pre-ingestive and postingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 98, n. 2, p. 181-194, 2001.

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

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

KIM, H.; XING, G.; WANG, Y.; ZHAO, T.; YU, D.; YANG, S.; GAI, J. Constitution of resistance to common cutworm in terms of antibiosis and antixenosis in soybean RIL populations. **Euphytica**, v. 196, n. 1, p. 137-154, 2014.

PIUBELLI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; ARRUDA, I.C.; LARA, F.M. Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on soybean genotypes. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 127-132, 2003.

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

ROSE, R.L.; SPARKS, T.C.; SMITH, M.C. Insecticide toxicity to the soybean looper and the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) as influenced by feeding on resistant soybean (PI 227687) leaves and coumestrol. **Journal of Economy Entomology**, v. 81, p. 1288-1294, 1988.

SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M.C. Interação planta inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 12, p. 38-42, 2000.

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

YAN, Z.; ZENG, L.; JIN, H.; QIN, B. Potential ecological roles of flavonoids from *Stellera chamaejasme*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, n. 3, 2015.

Tabela 1. Peso inicial de lagartas (mg), peso de pupa (mg) e tempo de desenvolvimento (dias) de *Anticarsia gemmatilis* alimentadas em diferentes cultivares de soja. (Média ± EP) n=50.

Genotipo	Peso inicial (mg)	Peso de Pupa (mg)	Tempo de Desenvolvimento (dias)
'POTENCIA'	2.46 ± 0.06 a	241.88 ± 5.99 a	9.71 ± 0.13 c
'IAC 24'	2.17 ± 0.07 b	249.47 ± 5.81 a	12.44 ± 0.16 a
'BRS 257'	1.83 ± 0.05 c	262.36 ± 4.79 a	11.03 ± 0.07 b
'PI 227687'	1.71 ± 0.05 c	218.23 ± 6.12 b	11.30 ± 0.18 b
CV	14.61	12.79	6.91
F	39.77***	10.05***	64.64***

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

** P< 0,01; ***P<0,001

Tabela 2. Flavonoides identificados nas análises foliares das cultivares de soja que tiveram sua concentração aumentada (+/+) e induzida (+/-).

Flavonoide	Genotipos			
	Potencia	IAC 24	BRS 257	PI 227687
Rutina	-	(-/+)	-	(++)
Glicitina	(+/-)	-	(+/-)	(+/-)
Daidzina	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(++)
Genistina	(++)	(++)	(++)	(++)
Malonil glicitina	(+/-)	(+/-)	(++)	(++)
Malonil genistina	(+/-)	(+/-)	(+/-)	-
Malonil daidzina	(+/-)	(+/-)	(++)	(+/-)
Acetil glicitina	(+/-)	(+/-)	(+/-)	-
Acetil daidzina	-	-	-	(+/-)
Geniste na	(++)	-	(+/-)	-
Daidze na	(+/-)	-	(+/-)	(++)
Coumestrol	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)