

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:H₂O, 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. Oliveira¹, Giorla C. Piubelli²,
Angélica Maria de Toledo³, Clara Beatriz
Hoffmann-Campo¹ & Flávio Moscardi¹

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

¹ Embrapa Soja

² Doutoranda UFPR

³ Estudante de biologia UNIFIL

dieta artificial, em *Anticarsia gemmatalis*

Em 2001, foram realizados 3 ensaios visando reavaliar alguns genótipos de soja, testados, com características de resistência (PI 171451, PI 274454, PI 227687, PI 229358, IAC 100) e suscetível 'BR-16' à lagarta da soja, *A. gemmatalis*. Os genótipos de soja foram semeados em vasos em casas de vegetação e as folhas foram colhidas, antes da floração, para a preparação dos extratos, que após redução em rotavapor, foram eluídos em coluna cromatográfica aberta de vidro, preenchida com a resina Amberlite, estabilizada com água pH 2, acidificada com ácido acético. O extrato reduzido foi aplicado no topo da coluna, sendo as fases móveis da coluna: 250 ml de água pH 2, seguida de 500 ml de água pH 7 e 2000 ml de metanol (MeOH) 80%. Os extratos resultantes da eluição em água pH 2 e pH 7 foram descartados. O extrato eluído com MeOH 80% foi concentrado em rotavapor e adicionado à dieta para os bioensaios.

Os delineamento experimental dos bioensaios foi inteiramente casualizado, com 30 repetições e como testemunha utilizou-se dieta pura (sem adição de extratos). Inicialmente as lagartas foram mantidas agrupadas em copos contendo dieta correspondente ao respectivo tratamento. As lagartas (2º/3º ínstar) foram pesadas e individualizadas em placas de petri contendo dieta artificial com ou sem extrato e observadas diariamente, até a transformação em pupas.

Os resultados obtidos em 2000 e 2001 foram analisados em conjunto, após a realização das análises exploratórias individuais. Observou-se que a mortalidade foi maior (50,0%) quando as lagartas se alimentaram da dieta contendo extrato da PI 274454, seguida, respectivamente, pelas lagartas alimentadas em dietas contendo extratos dos genótipos 'IAC 100' (43,3%) e PI 227687 (31,7%) (Tabela 2.4). O tempo de desenvolvimento larval de *A. gemmatalis* foi maior quando as lagartas alimentaram-se em dietas contendo extrato da

Tabela 2.4. Porcentagem de mortalidade de *A. gemmatalis* alimentadas em dieta artificial contendo diferentes extratos de genótipos de soja.

Genótipos	Terceiro	Quarto	Quinto	Sexto	Pré-Pupa	Total (%)
Testemunha	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	1,1
'BR-16'	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7
PI 229358	1,7	0,0	5,0	1,7	1,7	10,0
PI 171451	5,0	5,0	0,0	0,0	1,7	11,7
PI 227687	0,0	10,0	11,7	10,0	0,0	31,7
PI 274454	5,0	28,3	11,7	5,0	0,0	50,0
'IAC 100'	13,3	18,3	8,3	1,7	1,7	43,3
χ^2	24,24*	64,12*	28,82*	26,65*	4,94 ^{ns}	98,30*

*significativo a 5% de probabilidade pelo teste do qui-quadrado, baseado em 6 graus de liberdade.

^{ns}não significativo

PI 274454 (15,7 dias), PI 227687 (14,8 dias) e 'IAC 100' (14,5 dias), em comparação em dieta sem extrato (7,4 dias) (Tabela 2.5). O peso inicial de lagartas (2º/3º ínstar) e o peso de pupas também foram influenciados negativamente pelos genótipos PI 274454, 'IAC 100' e PI 227687 (Tabela 2.6). Não houve diferen-

ça entre a quantidade de dieta consumida por *A. gemmatalis* entre as dietas contendo extratos, apenas em relação a dieta sem extrato (Tabela 2.6). Os genótipos que proporcionaram menor acúmulo de lipídio nas pupas foram 'BR-16', 'IAC 100', PI 171451 e PI 274454 (Tabela 2.6).

Tabela 2.5. Duração do segundo, terceiro, quarto, quinto e sexto ínstar (dias) e duração total (dias) de *A. gemmatalis* alimentadas em dieta artificial contendo diferentes extratos de genótipos de soja.

Genótipos	Número de dias/ ínstar ¹					Tempo total (dias) ¹
	2º/3º	3º	4º	5º	6º	
Testemunha	1,0 c	1,4 d	2,1 c	1,7 c	1,2 d	7,4 d
'BR-16'	1,1 ab	2,1 bc	2,4 c	2,1 bc	2,0 cd	9,7 c
PI 229358	1,0 c	2,0 c	2,3 c	2,4 b	2,5 c	10,2 c
PI 171451	1,0 c	2,1 bc	2,4 bc	3,2 a	4,8 ab	13,5 b
PI 227687	1,0 c	2,4 b	2,8 ab	3,6 a	5,0 a	14,8 ab
PI 274454	1,0 bc	2,7 a	3,1 a	3,6 a	5,0 a	15,7 a
'IAC 100'	1,2 a	2,7 a	2,9 a	3,6 a	4,1 b	14,5 ab
Valor de F	9,19***	35,55***	11,88***	39,80***	67,48***	109,03***

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 2.6. Peso (mg) inicial de lagartas em 2º/3º ínstar, de pupa, de dieta consumida, de lipídio, de fezes (mg) e % de lipídio de *A. gemmatalis* alimentadas em dieta artificial contendo diferentes extratos de genótipos de soja

Genótipos	Peso (mg)				Lipídio (%)
	Inicial de lagartas	Pupa	Dieta consumida	Fezes	
Testemunha	4,3 a ¹	201,5 a	341,6 a	134,8 a	32,9 ab
'BR-16'	3,7 b	188,5 ab	189,4 b	134,4 a	18,7 c
PI 229358	3,5 b	195,2 a	238,8 b	126,1 ab	42,0 a
PI 171451	2,7 c	185,5 ab	239,7 b	134,8 a	26,3 bc
PI 227687	2,3 c	163,6 bc	218,6 b	120,6 ab	33,3 ab
PI 274454	2,3 c	150,9 c	205,8 b	116,7 b	27,6 bc
'IAC 100'	2,6 c	153,0 c	225,8 b	116,0 b	18,8 c
Valor de F	49,89***	9,67***	25,76***	4,21***	8,47***

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A resistência de plantas a insetos pode afetar a fisiologia (antibiose) ou o comportamento dos insetos (antixenose). Como, nos ensaios realizados, os fatores físicos (pelos, espinhos, etc) foram descartados após extração, possivelmente, a resistência foi em decorrência dos fatores químicos. Os três genótipos que apresentaram maior bioatividade (PI 274454, 'IAC100' e PI 227687) possuem vários flavonóides, entre eles rutina em sua composição química. Sendo assim, os resultados indicam que essa substância, anteriormente relatada causando efeito antibiótico e/ou antinutricional em insetos mastigadores que atacam a soja, seja a mais provável causa da resistência.

2.3.2 Interação entre extratos de folhas de genótipos de soja e *Baculovirus anticarsia* na mortalidade de populações de *Anticarsia gemmatilis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV

Para determinar o efeito da interação entre *Baculovirus anticarsia* e extratos de genótipos de soja com característica de resistência foram utilizadas populações de *A. gemmatilis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV. Os extratos dos genótipos de PI 227687 e PI 274454 foram preparados em coluna cromatográfica aberta de vidro. A concentração do produto à base de *Baculovirus* foram diferenciadas de acordo com a população de *A. gemmatilis*, variando de 60 a 4860 para a população suscetível e de 393.600 a

31.900.000 para a população resistente. Nos dois casos, foram utilizadas cinco doses crescentes em proporção geométrica de fator três e como testemunha dietas sem o vírus (concentração = 0).

A mortalidade total foi maior quando lagartas se alimentaram em dietas contendo extratos dos genótipos resistentes, comparadas à dieta sem a adição de extratos. Houve uma correlação positiva entre a mortalidade de lagartas e a concentração de AgMNPV em todas as dietas (Fig. 2.2). O peso de pupas (Tabela 2.7) também foi influenciado negativamente pelo adição de extratos nas dietas. Na população suscetível as pupas mais pesadas foram observadas quando as lagartas foram alimentadas em dieta testemunha (sem adição de extrato), seguido de pupas onde lagartas foram alimentadas em dieta contendo adição de extrato da PI 274454 e PI 227687, respectivamente, entretanto, não houve uma interação significativa entre os extratos e as diferentes concentrações de AgMNPV. Na colônia resistente ao AgMNPV, os maiores pesos de pupas foram observados em lagartas que se alimentaram em dieta testemunha, seguido de pupas, onde lagartas foram alimentadas em dietas contendo a adição dos extratos. Ao contrário do que se observou na população suscetível, a interação entre extratos e as diferentes concentrações de AgMNPV na população resistente foi estatisticamente significativa (Tabela 2.8). Um efeito sinérgico na mortalidade foi observado quando lagartas se alimentaram em dieta contendo extrato do genótipo PI 274454 e diferentes concentrações de AgMNPV, em colônias de lagartas suscetíveis e resistentes ao vírus, exceto na concen-

Tabela 2.7. Peso de pupa de populações de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV alimentadas em dietas contendo diversas combinações de *Baculovirus anticarsia* e extratos das PI 274454 e PI 227687

Doses de Baculovirus	Testemunha	População Suscetível	
		PI 274454	PI 227687
0	257,4	241,5	231,6
60	248,4	229,5	224,4
180	239,1	226,9	202,7
540	237,6	217,3	205,9
1600	223,3	231,2	203,4
4860	221,5	232,2	196,7
Médias ¹	242,7 A	231,3 B	216,11 C
Valor de F- Extrato	25,96 ***		
Valor de F- Baculovirus	10,02 ***		
Valor de F- Extrato x Baculovirus	1,08 ^{ns}		

Tabela 2.8. Peso de pupa de populações de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV alimentadas em dietas contendo diversas combinações de *Baculovirus anticarsia* e extratos das PI 274454 e PI 227687

Doses de Baculovirus	Testemunha	População Suscetível ²	
		PI 274454	PI 227687
0	243,9a	202,7 ab	209,8 a
393.600	220,7 b	210,1 ab	210,7 a
1.180.000	218,3 b	204,6 ab	209,1 a
3.543.000	219,3 b	212,5 a	216,9 a
10.600.000	215,0 b	200,8 ab	217,4 a
31.900.000	225,4 ab	173,1 b	228,5 a
Médias	225,0	205,2	212,5
Valor de F- Extrato	26,12 ***		
Valor de F- Baculovirus	4,27 ***		
Valor de F- Extrato x Baculovirus	4,09 ***		

¹ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%

² Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%

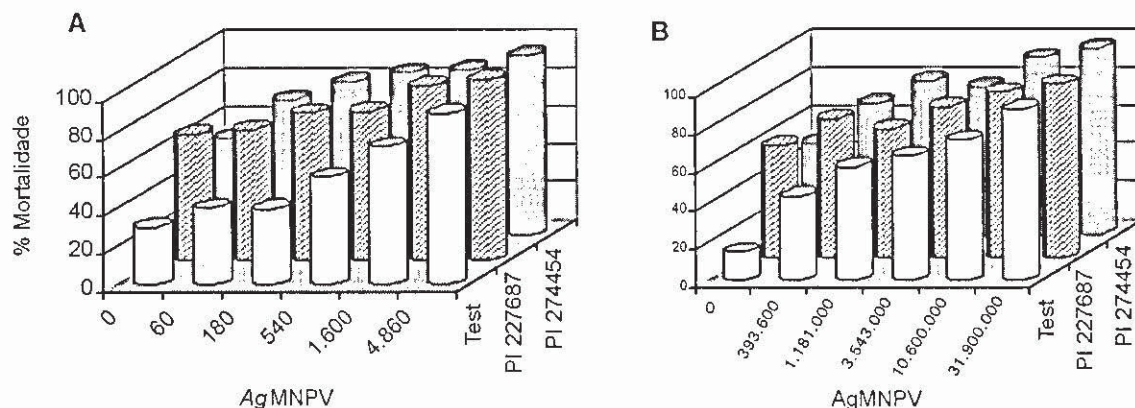


Fig. 2.2. Mortalidade total de populações de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis (A) e resistente (B) ao AgMNPV alimentadas em dietas contendo diversas combinações entre *Baculovirus anticarsia* e extratos da PI 274454 e PI 227687

tração intermediária do vírus (3.543.000 poliedros) na população resistente. Quando lagartas se alimentaram em dietas contendo extratos da PI 227687 e diferentes concentrações de AgMNPV, houve uma predominância de um efeito antagônico, para ambas colônias de lagartas, exceto na interação entre extrato e a concentração de 1.600 poliedros/ml de dieta, na população suscetível ao vírus. A interação entre extratos de genótipos de soja resistentes a pragas e AgMNPV está relacionado ao genótipo e ao seu perfil químico.

2.3.3. Testes de atividade biológica de diversos genótipos de soja sobre *Piezodorus guildinii*

Em 2001, foram realizados dois ensaios, um em situação de confinamento e outro em laboratório em situação de dupla chance de escolha, testando-se os genótipos de soja com características de resistência ('IAC 100',

'BRSMG 68', PI 227687) comparados com 'Embrapa 4' (suscetível). No primeiro teste, massas de ovos de *P. guildinii* obtidas em laboratório, foram colocadas em gaiolas sobre vagens dos genótipos de soja no estágio R5-R6. No primeiro dia do 4º instar, após serem pesadas, as ninfas foram individualizadas em placas de Petri e observadas diariamente. Os percevejos ao chegarem a fase adulta, foram pesados, sexados e congelados, para posterior extração de lipídio, através do método de Soxhlet e determinação de proteína pelo método de Kjeldhal. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 50 repetições, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). A análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para retirar do peso de adultos, o efeito do tempo de desenvolvimento ou do peso inicial (covariáveis), na avaliação do crescimento e do ganho de peso, respectivamente. Para testar a homogeneidade de sobrevivência das ninfas nos diferentes trata-

mentos, o teste χ^2 foi utilizado. Os testes com dupla chance de escolha foram conduzidos em arenas constituídas por placas de Petri, contendo uma vagem da testemunha suscetível ('Embrapa 4') e outra, de um dos genótipos em teste. Um percevejo em jejum por 24h foi mantido nas unidades experimentais. O comportamento do inseto foi observado pelo método de varredura, registrando-se o seu comportamento simultaneamente em planilha eletrônica coletora de dados, em intervalos de 2 min, durante 8h. As categorias de comportamento do inseto avaliadas foram: locomoção, quiescência, alimentação na vagem resistente ou na suscetível, e quiescência na vagem resistente ou suscetível.

Os resultados indicam que, em situação de confinamento, houve diferença significativa na porcentagem (%) de mortalidade durante o 4º instar e no desenvolvimento total, sendo maior entre os percevejos alimentados com vagens de 'IAC 100' (46,9%) e PI 227687 (44,0%) comparados com 'BRSMG 68' (28,0%) e 'Embrapa 4' (22,0%) (Tabela 2.9). O 4º instar das ninfas que se alimentaram da PI 227687 (4,75 dias) foi mais longo, estas também pesaram menos do que as alimentadas com 'Embrapa 4' (Tabela 2.10). O crescimento e o ganho de peso do inseto foram influenciados pela alimentação nos diferentes genótipos, mesmo após a remoção do efeito do tempo de desenvolvimento e peso inicial sobre o peso final. Fêmeas alimentadas com 'IAC 100' (60,51 mg) e 'BRSMG 68' (57,47 mg), apresentaram os maiores pesos de adultos (Tabela 2.10). A menor porcentagem de lipídios (17,68%) foi acumulada

da pelas fêmeas alimentadas com vagens de PI 227687, sugerindo que a sua capacidade reprodutiva pode ser negativamente afetada. Embora a cultivar BRSMG 68, em experimentos realizados em gaiolas, com até oito adultos de *P. guildinii*/m, tenha se mostrado mais tolerante ao ataque do percevejo do que a cultivar 'Embrapa 4' (Resultado de Pesquisas, Embrapa Soja, 2000), não foram observados efeitos adversos importantes de BRSMG 68 sobre *P. guildinii*, nos testes realizados em laboratório. Os resultados indicam que a PI 227687 pode causar efeitos adversos na biologia do inseto, confirmando sua característica de resistência sendo, provavelmente, a antibiose, o mecanismo utilizado pelo genótipo para se defender do ataque de *P. guildinii*.

Nos testes com dupla escolha, observou-se que o número de insetos se locomovendo foi menor em relação aos insetos em quiescência, provavelmente em decorrência da necessidade de adaptação do inseto ao ambiente e de um tempo maior para a tomada de decisão. Os percevejos permaneceram por mais tempo sugando as vagens da cultivar suscetível ('Embrapa 4') do que as vagens dos genótipos resistentes, sendo o genótipo PI 227687 o menos preferido (70,5 min) em relação a 'Embrapa 4' (138,8 min). Os percevejos permaneceram por mais tempo em quiescência nas vagens em unidades experimentais de 'Embrapa 4' versus 'BRSMG 68', em comparação com as demais. Os resultados indicaram que os genótipos com característica de resistência, PI 227687 e 'IAC 100', foram os menos preferidos por *P. guildinii*.

Tabela 2.9. Porcentagem de mortalidade e duração de diferentes instares de ninfas de *P. guildinii* alimentadas com vagens de diversos genótipos de soja.

Genótipo	% de mortalidade			Tempo de desenvolvimento (dias)		
	4º instar	5º instar	Total	4º instar	5º instar	Total (4º/adulto)
'Embrapa 4'	18,0	4,9	22,0	4,0 b ¹	6,6	10,6
'BRSMG 68'	10,0	16,7	28,0	4,4 ab	6,2	10,6
'IAC 100'	38,7	20,0	46,9	4,3 ab	6,3	10,6
PI 227687	28,0	22,2	44,0	4,7 a	6,4	11,1
Valor de χ^2 calculado	11,364**	5,42ns	9,62*	Valor de F	5,10*	0,76 ns
						1,07 ns

^{ns} não significativo, **significativo, a 1% de probabilidade; * significativo, a 5% de probabilidade

¹Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%

Tabela 2.10. Peso de ninfas e adultos, peso e teor de lipídio e proteína em fêmeas *P. guildinii* alimentadas com vagens de diversos genótipos de soja

Genótipo	Peso (mg)			% de lipídio	% de proteína
	Ninfa (início 4º instar)	Adulto	Lipídio mg		
'Embrapa 4'	6,8	52,2 b ¹	4,9 a	29,4 a	68,2 c
'BRSMG 68'	6,5	57,5 ab	2,7 a	21,8 ab	71,2 bc
'IAC 100'	6,0	60,5 a	4,7 a	20,0 b	80,3 ab
PI 227687	5,7	51,8 b	3,6 a	17,7 b	83,2 a
Valor de F	1,03 ns	3,63 *	3,03 *	6,50*	7,79**

¹ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

^{ns} não significativo *significativo, a 1% de probabilidade; ** significativo, a 5% de probabilidade

◆◆◆◆◆