



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA CLOSS SALVADOR

**DIÓXIDO DE CARBONO E TEMPERATURA AFETAM
ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* E
METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS EM SOJA**

MARIANA CLOSS SALVADOR

**DIÓXIDO DE CARBONO E TEMPERATURA AFETAM
ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* E
METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS EM SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Ursi Ventura
Coorientadora: Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S182d Salvador, Mariana Closs.
Dióxido de carbono e temperatura afetam aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* e metabólitos primários e secundários em soja / Mariana Closs Salvador. – Londrina, 2014.
118 f. : il.

Orientador: Maurício Ursi Ventura.
Coorientador: Clara Beatriz Hoffmann-Campo.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Lagarta da soja – Aspectos biológicos – Teses. 2. Dióxido de carbono – Teses. 3. Inseto – Efeito da temperatura – Teses. 4. Pragas agrícolas – Influência do clima – Teses. 5. Soja – Teses. I. Ventura, Maurício Ursi. II. Hoffmann-Campo, Clara Beatriz. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 595.78

MARIANA CLOSS SALVADOR

**DIÓXIDO DE CARBONO E TEMPERATURA AFETAM ASPECTOS
BIOLÓGICOS DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* E METABÓLITOS
PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS EM SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Clara Beatriz Hoffmann
Embrapa Soja – Londrina – PR

Dra. Rejane Cristina Roppa Kuss Roggia
ESALQ – Luiz de Queiroz – SP

Dra. Laila Herta Mihsfeldt
UNOPAR – Luiz Meneghel – PR

Prof. Dr. Marcelo Augusto de Aguiar e Silva
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves
UEL – Londrina – PR

Londrina, 10 de março de 2014.

Aos meus pais Maria Aparecida
e Jair, meus irmãos e sobrinhos,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos, por ter me concedido saúde e disposição para o desenvolvimento deste trabalho, pois sem Ele nada seria possível.

Ao Dr. Flávio Moscardi (*In Memoriam*), mesmo com o pouco tempo de convivência, pelo carinho, orientação e confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Mauricio Ursi Ventura por seu apoio, orientação, amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos, e por ter sido tão solícito comigo.

À Dra Clara Beatriz Hoffmann-Campo, pela imensa contribuição científica, orientação, ensinamentos prestados, paciência e acima de tudo, pelo carinho e confiança em mim depositados. Foi uma honra ser sua orientada durante todos esses anos. À você, todo meu carinho, respeito e admiração.

Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realização do curso, e a todo corpo docente.

À funcionária da secretaria do Programa de Pós Graduação em Agronomia da UEL, Weda por sempre estar disposta a colaborar.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

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

A Pesquisadora Maria Cristina N. de Oliveira pelo carinho, paciência e orientação das análises estatísticas, sua participação foi de extrema importância para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos Pesquisadores da Embrapa Soja, José Renato Bouças Farias e Júlio César Franchini pela colaboração.

Aos funcionários do setor de estatística da Embrapa Soja, Tânia e Gilson pela importante colaboração nas análises estatísticas.

Aos Funcionários do Laboratório de Ecologia Química: D. Neiva, Giovani, João Alves e Moisés pelo suporte técnico, auxílio na condução e avaliação dos experimentos.

Aos funcionários da Entomologia da Embrapa Soja Carneiro, Fábio, Ivanilda, Jovenil, Miguel e Sérgio, cujo auxílio foi fundamental no decorrer dos experimentos.

Aos funcionários da Embrapa Soja, Alvino, Oriverto, Rodrigo, Esmael e ao pessoal de apoio do setor de casa de vegetação cuja contribuição e prestatividade foi de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos estagiários do Laboratório de Ecologia Química: Adriano, José Perez, Pamela, Marcos, Mayara, Simone, Tatiana Ueda e da biotecnologia dos solos Anna Karolina Grunvald pela imensa colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos que conquistei na Embrapa, em especial, Bruno, Dona Neiva, Giovani, José Perez da Graça, João Alves, Luiz Gustavo Garbelini, Marcos Aurélio Souza, Rodrigo Santos Leite, Simone Vieira, Tatiana Ueda, Tássia Bueno, a vocês meu muito obrigada pelos dias de convívio, auxílio, paciência, os levarei sempre em meu coração.

Aos amigos José Perez da Graça por todo auxílio técnico e científico no desenvolvimento deste trabalho, Marcos Aurélio Souza por todo suporte na realização dos experimentos e Tatiana Ueda por estar presente em todos os momentos, desde a condução dos experimentos e pelo apoio na defesa da tese, além do carinho e confiança em mim depositados.

A Débora Mello da Silva por estar presente em todos os momentos de minha vida, sejam eles de bonança ou dificuldades. Pelo apoio nas horas de cansaço, estímulo nos momentos de indecisão, broncas nos momentos necessários, pelo respeito aos meus ideais e acima de tudo pela amizade e carinho oferecidos.

Aos Amigos Andréia Jardim Tavares, Carla Holanda, Cristiane Stecca, Daiane Torregiani, Juliana Maria da Silva e Norberto Cruz pelo apoio e carinho.

Aos meus irmãos, Janaina e Fabiano, meus cunhados e sobrinhos, pelo apoio e carinho.

Aos meus pais, Maria Aparecida e Jair, por estarem sempre ao meu lado. A vocês, meu eterno amor e gratidão.

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

“ É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota” (Theodore Roosevelt)

SALVADOR, Mariana Closs. **Dióxido de carbono e temperatura afetam aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* e metabólitos primários e secundários em soja.** 2011 - 2014. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, 2014.

RESUMO

Alterações na concentração de gases do efeito estufa poderão desencadear um aumento na temperatura média global. A temperatura é um dos fatores abióticos que mais afetam as interações fisiológicas e comportamentais de insetos e plantas. Mudanças neste fator podem influenciar no grau de infestação e a distribuição dos artrópodes pragas nos agrossistemas, além de modificar a constituição de metabólitos primários e secundários das plantas. Neste trabalho foram estudados o efeito isolado de quatro temperaturas (25 °C, 28 °C, 31 °C e 34 °C) na biologia de *Anticarsia gemmatalis* durante quatro gerações, e a associação destas ao aumento da concentração de dióxido de carbono (456 ppm) em uma geração, além da influência destes fatores (Temperatura e CO₂) na concentração dos flavonoides, açúcares totais e alterações no percentual de carbono (C), nitrogênio (N) e na relação C:N em folhas de soja. Em todas as temperaturas adotadas para os ensaios, exceto em câmaras com CO₂, estas foram reduzidas em 4°C a noite, para representar a oscilação diária da temperatura. Lagartas de final 2^o ínstar, criadas desde a eclosão na cultivar BRS 359RR em suas respectivas temperaturas, foram pesadas, individualizadas e avaliadas diariamente, observando-se a mortalidade, tempo de desenvolvimento, razão sexual, número de ovos e longevidade dos adultos. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado. Para a avaliação da longevidade de adultos e número de ovos foram utilizados de 10 a 15 casais. Para a identificação e quantificação de metabólitos secundários, açúcares, C, N e C:N as plantas foram cultivadas em câmaras de crescimento nas respectivas temperaturas até o estágio V3. As amostras para a identificação dos compostos fenólicos foram analisadas por cromatografia líquida. Os açúcares totais foram determinados pelo método espectrofotométrico do fenol sulfúrico, e o percentual de C, N e C:N foram avaliados por cromatografia gasosa. Temperaturas mais altas reduziram o ciclo de desenvolvimento dos insetos, no entanto, nesses tratamentos foi observada maior mortalidade. O peso de pupa sofreu influência das mudanças nas temperaturas, os maiores pesos foram observados nas temperaturas de 25 °C e 28 °C. O número de ovos e a longevidade dos adultos foram reduzidos com o aumento da temperatura. A razão sexual não foi influenciada pelas temperaturas. Ao avaliar apenas o efeito da temperatura, os isoflavonoides daidzina, malonil daidzina, acetil daidzina, glicitina, malonil glicitina e malonil genistina foram observadas em maior concentração nas plantas cultivadas a 25 °C. Em 34 °C, as plantas apresentaram alta concentração de ácido salicílico, substância que tem grande importância em processos fisiológicos relacionados à adaptação dos vegetais. Plantas de soja submetidas a diferentes temperaturas e elevada concentração de CO₂, apresentaram redução de substâncias do metabolismo secundário, no percentual de nitrogênio e aumento da concentração de açúcares totais o que possivelmente pode aumentar a suscetibilidade dessas plantas a insetos. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o aumento de temperatura influencia no ciclo de desenvolvimento de *A. gemmatalis* e na concentração de metabólitos primários e secundários presentes na soja.

Palavras-chave: Mudanças climáticas. Açúcares totais. Flavonoides. Relação carbono nitrogênio.

SALVADOR, Mariana Closs. **The carbon dioxide and temperature affects *Anticarsia gemmatalis* biological parameters and primary and secondary metabolites in soybean.** 2011-2013. 118 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Changes in concentration of greenhouse gases may trigger an increase on the average global temperature. Temperature is one of the abiotic factors that affect physiological and behavioral interactions of insects and plants. Changes in this factor can influence infestation degree as well as the distribution of arthropod pests in agricultural systems, in addition to modifying the constitution of primary and secondary plant metabolites. In this work the isolated effect of four temperatures (25°C, 28°C, 31°C and 34°C) in *Anticarsia gemmatalis*'s biology over four generations and their association with the increase of carbon dioxide concentration (456 ppm) for one generation were studied, besides the influence of these factors (temperature and CO₂) in flavonoids concentration, total sugars and changes in the percentage of carbon (C), nitrogen (N) and C:N ratio of soybean leaves. In all temperatures adopted for the tests, except in chambers with CO₂, they were reduced by 4°C to compensate the daily fluctuation of the temperature. Tracks at 2nd final instars', reared from hatching on BRS 359RR at their respective temperatures were weighed separately and evaluated daily, observing the mortality, development time, sex ratio, number of eggs and adult longevity. The experimental design was completely randomized. To evaluate the longevity of adults and the number of eggs 10 to 15 couples were used. For identification and quantification of secondary metabolites, sugars, C, N and C:N ratio, plants were grown in a growth chamber at respective temperatures until the V3 stage. The samples for phenolic compounds identification were analyzed by liquid chromatography. The total sugars amount were determined by the phenol sulfuric spectrophotometric method, and the percentage of C, N and C:N ratio were analyzed by gas chromatography. Higher temperatures reduced cycle development of insects; however increased mortality was observed in these treatments. Pupae weight was influenced by changes in temperature, larger weights were observed at 25°C and 28°C temperatures. The number of eggs and the adult longevity were reduced with temperature increasing. The sex ratio was not influenced by temperature. When evaluating only the effect of temperature, the isoflavones daidzin, malonyl-daidzin, acetyl-daidzin, glycitin, malonyl-genistin and malonyl-glycitin were found in higher concentrations in plants grown at 25°C. At 34°C, the plants showed high concentration of salicylic acid, a substance that has great importance in physiological processes related to adaptation of plants. Soybean plants subjected to different temperatures and high CO₂ concentration, showed secondary metabolism substances and nitrogen percentage reduction and concentration increasing of total sugars, which possibly may lead to a susceptibility increasing of these plants towards insects. The results so far obtained suggest that temperature increasing has influence on *A. gemmatalis* development cycle and on primary and secondary metabolites concentration found in soybean as well.

Keywords: Climate change. Total sugars. Flavonoids. Carbon: nitrogen ratio.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema sobre os principais fatores intrínsecos da planta e condições do ambiente que podem influenciar nos teores de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) 26
- Figura 3.1** – Tempo total de desenvolvimento (dias) de insetos criados em folhas de soja BRS 359RR e submetidos a diferentes temperaturas durante três gerações. Médias seguidas da mesma letra minúscula correspondem as gerações e maiúscula entre as gerações não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade 40
- Figura 3.2** – Média do número de ovos de *A. gemmatalis* mantidas em temperaturas de 25 °C e 28 °C, durante quatro gerações. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 43
- Figura 3.3** – Relação entre peso de pupa (mg) e peso inicial (mg) de *A. gemmatalis* criadas e alimentadas com plantas de soja BRS 359RR cultivadas em diferentes temperaturas (25° C, 28° C, 31° C e 34° C) nas gerações F₀ 47
- Figura 3.4** – Relação entre peso de pupa (mg) e tempo de desenvolvimento (dias) de *A. gemmatalis* criadas e alimentadas com plantas de soja BRS 359RR cultivadas em diferentes temperaturas (25° C, 28° C, 31° C e 34° C), na geração F₃ 47
- Figura 4.1** – Representação da oscilação diária da temperatura em fitotron com 25° C, 28° C, 31° C e 34° C 55
- Figura 4.2** – Imagem do equipamento do HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizado para identificação e quantificação de compostos secundários de extratos vegetais..... 57
- Figura 4.3** – Concentração de compostos secundários em folhas de soja BRS 359RR no estádio V3 cultivadas em diferentes temperaturas (25 °C; 28 °C; 31 °C; 34 °C). Médias seguidas da mesma letra entre as temperaturas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 65
- Figura 5.1** – Relação entre peso de pupa (mg) e tempo de desenvolvimento (dias) de *A. gemmatalis* criadas e alimentadas com plantas de soja BRS 359RR cultivadas em diferentes temperaturas (25° C, 28° C, 31° C e 34° C) e em elevada concentração de CO₂ (456ppm) 84

- Figura 5.2** – Concentração de compostos secundários em folhas de soja BRS 359RR no estádio V3 cultivadas em fitotron com a concentração natural de CO₂ (380 ppm) e com injeção de 456 ppm CO₂. Média geral das temperaturas. Médias seguidas da mesma letra por substância não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 85
- Figura 5.3** – Concentração de compostos secundários em folhas de soja BRS 359RR no estádio V3 cultivadas em diferentes temperaturas 25 °C, 28 °C, 31 °C e 34 °C. Média geral das concentrações 380 e 456 ppm de CO₂. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 86
- Figura 5.4** – Concentração de daidzina (A), malonil daidzina (B), genistina (C) e malonil genistina (D), em folhas de soja BRS 359RR no estádio V3 cultivadas em diferentes temperaturas (25 °C; 28 °C; 31 °C; 34 °C) em concentração natural de CO₂ (380ppm) e 456 ppm. Letra minúscula compara as concentrações de CO₂ dentro de cada temperatura e maiúscula compara cada concentração de CO₂ nas diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 87
- Figura 5.5** – Concentração de compostos secundários em folhas de soja BRS 359RR no estádio V3 cultivadas nas temperaturas 25 °C; 28 °C; 31 °C; 34 °C submetidas a concentração atual de CO₂ e 456 ppm. Médias seguidas da mesma letra dentro de cada substância não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade 89
- Figura 5.6** – Concentração de Nitrogênio, Carbono e Relação Carbono/Nitrogênio em tecido vegetal de plantas de soja BRS 359RR (Estádio V3) desenvolvidas em casa de vegetação e fitotron com diferentes temperaturas e condição natural de CO₂, aprox. 380 ppm 93
- Figura 5.7** – Média geral da concentração de açúcares totais em tecido vegetal de plantas de soja BRS 359RR (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em casa de vegetação e em diferentes temperaturas 94
- Figura 5.8** – Concentração de açúcares totais em tecido vegetal de plantas de soja BRS 359RR (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron e em casa de vegetação, em diferentes temperaturas com 380 ppm de CO₂ 95

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1 – Mortalidade (%) de <i>Anticarsia gemmatalis</i> submetidas a diferentes temperaturas, por quatro gerações em folhas de soja | 37 |
| Tabela 3.2 – Peso inicial (mg), peso de pupa (mg), tempo de desenvolvimento em cada ínstar, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média ± EP) de <i>A. gemmatalis</i> criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas, em uma geração (F ₀) | 38 |
| Tabela 3.3 – Peso inicial (mg), peso de pupa (mg), desenvolvimento da fase larval, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média ± EP) de <i>A. gemmatalis</i> criadas em folhas de soja e submetidas a diferentes temperaturas, por três gerações..... | 39 |
| Tabela 3.4 – Duração média da fase de pupa em dias (média ± EP) de <i>A. gemmatalis</i> criadas em folhas de soja e submetidas a diferentes temperaturas, média de três gerações | 39 |
| Tabela 3.5 – Peso médio inicial (mg), peso de pupa (mg), desenvolvimento da fase larval, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média ± EP) de <i>A. gemmatalis</i> criadas em folhas de soja e submetidas a diferentes temperaturas, por quatro gerações | 41 |
| Tabela 3.6 – Razão sexual de <i>A. gemmatalis</i> em (25°C, 28°C, 31°C e 34°C) durante quatro gerações..... | 42 |
| Tabela 3.7 – Número de ovos, de <i>A. gemmatalis</i> em quatro temperaturas (25°C, 28°C, 31°C e 34°C) na primeira geração | 42 |
| Tabela 3.8 – Número médio de ovos, de <i>A. gemmatalis</i> em três temperaturas durante três gerações | 42 |
| Tabela 3.9 – Longevidade de machos de <i>A. gemmatalis</i> em quatro temperaturas durante a primeira geração | 43 |
| Tabela 3.10 – Longevidade de fêmeas de <i>A. gemmatalis</i> em (25° C, 28° C e 31° C) durante três gerações | 44 |
| Tabela 3.11 – Análise de covariância (ANCOVA) para verificar o efeito dos diferentes tratamentos no ajuste de peso de pupa pela covariável peso inicial na geração F ₀ : 25°C, 28°C, 31°C e 34° (a, b), geração F ₁ e F ₂ : 25°C, 28°C (c) e 31°C e na geração F ₃ : 25°C e 28°C (d) em <i>A. gemmatalis</i> | 45 |

| | |
|--|----|
| Tabela 3.12 – Análise de covariância (ANCOVA) para verificar o efeito dos diferentes tratamentos no ajuste de peso de pupa pela covariável tempo de desenvolvimento larval na geração F ₀ : 25°C, 28°C, 31°C e 34° (a, b), geração F ₁ e F ₂ : 25°C, 28°C e 31°C (c) e na geração F ₃ : 25°C e 28°C (d) em <i>A. gemmatalis</i> | 46 |
| Tabela 4.1 – Mortalidade (%) de <i>A. gemmatalis</i> criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas, por quatro gerações | 59 |
| Tabela 4.2 – Peso médio inicial (mg), peso de pupa (mg), fase larval, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média ± EP) de <i>A. gemmatalis</i> criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas, na primeira geração..... | 59 |
| Tabela 4.3 – Peso médio inicial (mg), peso de pupa (mg), desenvolvimento da fase larval, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média ± EP) de <i>A. gemmatalis</i> criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas, por duas gerações (F ₀ e F ₁)..... | 60 |
| Tabela 4.4 – Peso médio inicial (mg), peso de pupa (mg), fase larval, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média ± EP) de <i>A. gemmatalis</i> criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas, por quatro gerações (F ₀ , F ₁ , F ₂ e F ₃) | 61 |
| Tabela 4.5 – Razão sexual de <i>A. gemmatalis</i> em quatro temperaturas e quatro gerações..... | 62 |
| Tabela 4.6 – Número médio de ovos, de <i>A. gemmatalis</i> em quatro temperaturas e quatro gerações..... | 62 |
| Tabela 4.7 – Longevidade de machos e fêmeas de <i>A. gemmatalis</i> em quatro temperaturas, na primeira geração..... | 63 |
| Tabela 4.8 – Longevidade média de fêmeas e machos de <i>A. gemmatalis</i> . Média geral das temperaturas (25° C, 28° C e 31° C) em duas gerações..... | 63 |
| Tabela 4.9 – Longevidade de machos de <i>A. gemmatalis</i> , mantidos em 25° C, 28° C e 31° C. Média geral de duas gerações..... | 63 |
| Tabela 4.10 – Longevidade de fêmeas e machos (dias) de <i>A. gemmatalis</i> . Mantidas em 25° C e 28° C, média geral das duas temperaturas durante quatro gerações | 64 |

| | |
|--|----|
| Tabela 4.11 – Ocorrência de gliceolina em extratos de tecido foliar da cultivar BRS 359RR cultivadas em diferentes temperaturas, avaliada em dez repetições..... | 66 |
| Tabela 5.1 – Mortalidade (%) e razão sexual de <i>A. gemmatalis</i> criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas (25°C, 28°C, 31° C e 34° C) e a 456ppm de CO ₂ | 81 |
| Tabela 5.2 – Peso inicial (mg), peso de pupa (mg), tempo de desenvolvimento em cada ínstar, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média ± EP) de <i>A. gemmatalis</i> criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas e a 456 ppm de CO ₂ em uma geração | 81 |
| Tabela 5.3 – Número de ovos, de <i>A. gemmatalis</i> submetidas a diferentes temperaturas e a 456 ppm de CO ₂ | 82 |
| Tabela 5.4 – Análise de covariância (ANCOVA) para verificar o efeito dos diferentes tratamentos no ajuste de peso de pupa pelas covariáveis peso inicial (a, b), e tempo de desenvolvimento larval (c, d) 25°C, 28°C, 31°C e 34° em uma geração: de <i>A. gemmatalis</i> | 83 |
| Tabela 5.5 – Ocorrência de gliceolina em extratos de tecido foliar da cultivar BRS 359RR cultivadas em diferentes temperaturas e concentrações de CO ₂ | 90 |
| Tabela 5.6 – Concentração de Carbono (%), em tecido vegetal de plantas de soja (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em diferentes temperaturas e concentrações de CO ₂ | 91 |
| Tabela 5.7 – Concentração de Nitrogênio (%), em tecido vegetal de plantas de soja (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em diferentes temperaturas e concentrações de CO ₂ | 91 |
| Tabela 5.8 – Média geral da relação Carbono:Nitrogênio em tecido vegetal de plantas de soja (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em diferentes temperaturas e concentrações de CO ₂ | 92 |
| Tabela 5.9 – Média geral da concentração (%) de Nitrogênio, Carbono e Relação Carbono:Nitrogênio em tecido vegetal de plantas de soja (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em diferentes temperaturas e concentrações de CO ₂ | 92 |
| Tabela 5.10 – Concentração de açúcar total (mg/100g) em tecido vegetal de plantas de soja (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em diferentes temperaturas e concentrações de CO ₂ | 94 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1 | MUDANÇAS CLIMÁTICAS E A AGRICULTURA..... | 20 |
| 2.2 | RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DAS PLANTAS A TEMPERATURA ATMOSFÉRICA E AO CO ₂ | 22 |
| 2.3 | RESISTÊNCIA DE SOJA A INSETOS E A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA ATMOSFÉRICA E CO ₂ NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS | 24 |
| 2.4 | A LAGARTA -DA- SOJA: <i>ANTICARSIA GEMMATALIS</i> | 28 |
| 2.5 | INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO INSETO E IMPACTOS DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS SOBRE O CONTROLE DE PRAGAS | 29 |
| 3 | ARTIGO A: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NOS ASPECTOS BIOLÓGICOS E SOBREVIVÊNCIA DE <i>ANTICARSIA GEMMATALIS</i> HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NA CULTURA DA SOJA DURANTE QUATRO GERAÇÕES | 32 |
| 3.1 | RESUMO | 32 |
| 3.2 | ABSTRACT | 32 |
| 3.3 | INTRODUÇÃO..... | 33 |
| 3.4 | MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 3.4.1 | Cultivo das Plantas e Condições da Câmara onde Foram Mantidos os Insetos | 34 |
| 3.4.2 | Biologia de <i>Anticarsia gemmatalis</i> | 35 |
| 3.4.3 | Análise Estatística | 36 |
| 3.5 | RESULTADOS..... | 36 |
| 3.5.1 | Efeito de Diferentes Temperaturas sobre a Biologia de <i>Anticarsia gemmatalis</i> | 36 |
| 3.5.2 | Ganho de Peso e Crescimento | 44 |
| 3.6 | DISCUSSÃO | 47 |
| 3.7 | CONCLUSÃO | 50 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | ARTIGO B: EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE ASPECTOS BIOLÓGICOS E SOBREVIVÊNCIA DE <i>ANTICARSIA GEMMATALIS</i> HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DURANTE QUATRO GERAÇÕES E NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM SOJA | 51 |
| 4.1 | RESUMO | 51 |
| 4.2 | ABSTRACT | 51 |
| 4.3 | INTRODUÇÃO | 52 |
| 4.4 | MATERIAL E MÉTODOS | 54 |
| 4.4.1 | Cultivo das Plantas e Condições das Câmaras de Crescimento | 54 |
| 4.4.2 | Condução dos Bioensaios | 55 |
| 4.4.3 | Identificação e Quantificação de Metabólitos Secundários em Plantas Cultivadas em Diferentes Temperaturas..... | 56 |
| 4.4.3.1 | Preparo das amostras para extração dos compostos | 56 |
| 4.4.3.2 | Análises cromatográficas..... | 56 |
| 4.4.4 | Análise Estatística | 57 |
| 4.5 | RESULTADOS | 58 |
| 4.5.1 | Influência da Temperatura nos Aspectos Biológicos de <i>A. gemmatalis</i> | 58 |
| 4.5.2 | Influência da Temperatura no Metabolismo Secundário de Plantas de Soja | 64 |
| 4.6 | DISCUSSÃO | 66 |
| 4.7 | CONCLUSÃO | 72 |
| 5 | ARTIGO C: EFEITO DA TEMPERATURA E ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE CO₂ SOBRE ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>ANTICARSIA GEMMATALIS</i> E NO METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO DE PLANTAS DE SOJA | 73 |
| 5.1 | RESUMO | 73 |
| 5.2 | ABSTRACT | 73 |
| 5.3 | INTRODUÇÃO | 74 |
| 5.4 | MATERIAL E MÉTODOS | 76 |
| 5.4.1 | Aspectos Biológicos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em Fitotron com Elevadas Concentrações de CO ₂ | 76 |

| | | |
|---------|---|------------|
| 5.4.2 | Identificação e Quantificação de Metabólitos Secundários em Plantas Cultivadas em Diferentes Temperaturas e em Elevadas Concentrações de CO ₂ | 77 |
| 5.4.2.1 | Cultivo das plantas e preparo das amostras para extração de compostos..... | 77 |
| 5.4.2.2 | Análises cromatográficas..... | 78 |
| 5.4.3 | Quantificação de Metabólitos Primários (Carbono, Nitrogênio e Açúcares) em Plantas Cultivadas em Diferentes Temperaturas e em Elevadas Concentrações de CO ₂ | 79 |
| 5.4.3.1 | Cultivo da plantas e preparo das amostras para a análise da relação C:N e extração de açúcares..... | 79 |
| 5.4.4 | Análise Estatística..... | 80 |
| 5.5 | RESULTADOS..... | 80 |
| 5.5.1 | Aspéctos Biológicos de <i>A. gemmatalis</i> em Diferentes Temperaturas e Alta Concentração de CO ₂ | 80 |
| 5.5.2 | Influência de Diferentes Temperaturas e Alta Concentração de CO ₂ no Metabolismo Secundário de Plantas de Soja..... | 84 |
| 5.5.3 | Influência de Diferentes Temperaturas e Alta Concentração de CO ₂ no Metabolismo Primário: Concentração de Carbono, Nitrogênio, Relação C/N e a Concentração de Açúcares em Plantas de Soja..... | 90 |
| 5.6 | DISCUSSÃO..... | 95 |
| 5.7 | CONCLUSÃO..... | 101 |
| | CONCLUSÕES FINAIS..... | 102 |
| | REFERÊNCIAS..... | 103 |

1 INTRODUÇÃO

As atividades humanas têm provocado alterações na biosfera, resultando no aumento da concentração de Gases de Efeito Estufa (GEE). Um dos principais GEEs é o dióxido de carbono (CO_2), que a partir do início da Revolução Industrial aumentou a concentração global de 280 ppm (CHESNEY et al., 2013) para 395,97 ppm como constatado em 2013 (CONWAY; TANS, 2013). Ao longo da última década tem se observado um acréscimo de 2 ppm de CO_2 ao ano (FRANKS et al., 2013). A alteração na concentração de GEEs, segundo o quarto relatório do IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) poderá desencadear um aumento na temperatura média global entre 1,4 °C a 5,8 °C nos próximos cem anos (MEEHL et al., 2007). As mudanças climáticas podem: afetar o zoneamento agrícola, as técnicas de manejo e a produtividade das culturas. Além disso, o aumento de CO_2 atmosférico e as alterações no clima também podem impactar indiretamente as culturas e, os efeitos sobre pragas e doenças podem gerar múltiplas respostas em diferentes níveis tróficos (GORNALL et al., 2010).

Vários estudos têm documentado a influência das alterações da temperatura e CO_2 sobre invertebrados e plantas, demonstrando principalmente mudanças nas interações ecológicas (HUNTER, 2001; STIREMAN et al., 2005; NIZIOLEK et al., 2012). A distribuição geográfica e características biológicas das populações de insetos podem ser afetadas pelo aumento da temperatura, o que pode modificar a sincronia planta-praga, aumentando assim, o risco de invasões de pragas migrantes e alteração em suas interações interespecíficas (ROBINET; ROQUES, 2010). O aumento da temperatura deverá estender a amplitude ou reformular a distribuição geográfica de alguns insetos pragas que são limitados pela temperatura, como constatado para algumas espécies de lepidópteros (THOMAS et al., 2001). Este efeito poderá ser maior nas altas latitudes, onde as temperaturas mais baixas são limitadoras do desenvolvimento de algumas espécies de insetos-pragas (ANDREW; HUGHES, 2005) e em herbívoros que se alimentam acima do solo, expostos a uma grande variabilidade de micro e macroclimas, enquanto que os insetos de hábitos subterrâneos, estes têm uma menor variação termal devido ao efeito tampão do solo (BALE et al., 2002).

O aumento das concentrações de CO_2 pode incrementar a produção de algumas culturas, devido a maior eficiência fotossintética das plantas, como a soja, trigo e aveia (LONG; ORT, 2002). Esta estimulação da taxa de fotossintética, afeta a qualidade nutricional e metabolismo secundário das plantas e, conseqüentemente, a adequação do material vegetal a insetos herbívoros (ZAVALA et al., 2013).

Elevada concentração de CO₂ e, conseqüentemente, a alteração da temperatura do planeta, pode promover uma modificação da relação carbono/nitrogênio (C:N) nos tecidos de plantas (AINSWORTH et al., 2002). Concentrações elevadas de CO₂ aumentam os carboidratos das folhas, e em combinação com altas temperaturas diminui o conteúdo de N. Assim, os carboidratos podem atuar como fagoestimulantes para os insetos, enquanto a redução de N pode influenciar negativamente o valor nutricional das plantas. Juntas, estas mudanças podem promover um maior consumo em herbívoros para que estes possam suprir as suas necessidades nutricionais (DELUCIA et al., 2012), reduzindo a produtividade das culturas.

No contexto agrícola, a soja (*Glycine max* L. Merrill) é considerada a principal cultura de exportação brasileira, e na safra de 2012/2013, o país atingiu a produção de 81 mil toneladas, um incremento de 22,4% em relação à safra anterior (CONAB, 2013) sendo um importante fator de redução de sua produtividade os insetos-praga. *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das principais pragas desfolhadoras, de ocorrência tropical e subtropical e restrita aos continentes americanos, sendo importante em várias culturas, principalmente na soja, ocorrendo desde as regiões Norte e Central da Argentina até o Sudeste e Estados do Golfo do México nos Estados Unidos (PRAÇA et al., 2006) e podem causar desfolha de 100 %. Entretanto, as plantas apresentam mecanismos de defesa que podem torná-las inadequadas para os insetos-praga, e no caso da soja, as substâncias de defesa mais prováveis são os flavonoides e os isoflavonoides (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; PIUBELLI et al., 2005; TOLEDO, 2005).

Em geral, o crescimento das plantas sob condições elevadas de CO₂ estimula a produção de compostos fenólicos, taninos e flavonoides (STILING; CORNELISSEN, 2007; ROBINSON et al., 2012). A escassez de informações sobre como altas temperaturas, isoladamente ou em combinação com altas concentrações de CO₂ podem afetar os aleloquímicos (DELUCIA et al., 2012), dificultam a compreensão das respostas das plantas mediante a esses fatores. Desta forma, a resposta do metabolismo primário da planta em condições de CO₂ elevados é relativamente previsível, no entanto a resposta dos aleloquímicos é altamente variável (ZAVALA et al., 2013).

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal e este grupo é constituído por uma variedade de substâncias com diferentes funções biológicas. Estudos recentes verificaram que as plantas cultivadas em ambientes com elevação de CO₂ também aumentaram a concentração de fenólicos totais em 19 %, taninos condensados em 22 % e flavonoides em 27 % (ROBINSON et al., 2012). Em soja, altas concentrações de CO₂

promoveram um aumento de quercetina e canferol, no entanto reduziu os níveis de concentração do isoflavonoide genisteína (O NEILL et al., 2010). Considerando que a genisteína e seus conjugados são importantes compostos de defesa da soja a insetos (HOFFMANN-CAMPO, 1995; PIUBELLI, 2005) a redução de alguns compostos de defesa pode acarretar em alterações na suscetibilidade das plantas cultivadas a insetos.

Como as mudanças climáticas são uma realidade, a crescente emissão de CO₂, e conseqüente elevação da temperatura, juntamente com a necessidade do controle de pragas para a manutenção da produtividade agrícola, reforçam a necessidade de estudos para compreender as respostas às alterações da temperatura e maior concentração de CO₂ no metabolismo da planta e o seu efeito na comunidade de artrópodes herbívoros da soja.

Dessa forma este trabalho teve por objetivos:

- Avaliar aspectos biológicos e nutricionais de *A. gemmatalis* (em diferentes temperaturas, por quatro gerações sucessivas (as lagartas foram alimentadas com folhas de soja cultivadas em casa de vegetação, sem oscilação da temperatura));
- Avaliar aspectos biológicos e nutricionais de *A. gemmatalis* mantidas em plantas cultivadas sobre diferentes temperaturas e elevada concentração de CO₂;
- Identificar e quantificar as concentrações de compostos fenólicos em plantas de soja submetidas a diferentes temperaturas;
- Identificar e quantificar as concentrações de compostos fenólicos em plantas de soja submetidas a diferentes temperaturas e ao aumento da concentração de CO₂;
- Avaliar alterações na relação C:N e na concentração de açúcares totais em plantas de soja submetidas a diferentes temperaturas e ao aumento da concentração de de CO₂.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MUDANÇAS CLIMÁTICAS E A AGRICULTURA

A agricultura é extremamente vulnerável às alterações climáticas (EITZINGER et al., 2010; GORNALL et al., 2010). Os extremos climáticos ameaçam as plantas de diversas maneiras, as geadas, queimam os tecidos foliares causando a morte da planta (DECONTO, 2008) e o calor excessivo faz com que os estômatos se fechem impossibilitando a realização da fotossíntese (CHAVES et al., 2003). Em geral níveis elevados de CO₂ podem aumentar a produtividade das plantas (LONG et al., 2004). Estimativas sugerem que o aumento da concentração de CO₂ atmosférico do nível atual de 395,97 ppm (CONWAY; TANS, 2013) para 550 ppm, poderia aumentar em 40 % a fotossíntese nas culturas C3 (LONG et al., 2004.) Em plantas C4, devido a respostas fisiológicas diferenciadas das plantas C3, existe uma limitação à assimilação de carbono, em relação à saturação de CO₂ em torno da enzima Rubisco que pode inibir a fotorrespiração (FURBANK; HATCH, 1987), sugerindo que o aumento da concentração de CO₂ não confere a essas plantas benefícios em sua produção. No entanto, estudos indicam que apesar da aparente saturação da Rubisco, o enriquecimento de CO₂ atmosférico pode influenciar positivamente na fotossíntese de espécies C4, contribuindo para aumentos significativos da biomassa (GHANNOUM, 2009), além de conferir um melhor aproveitamento da água em situações de estresse hídrico (LEAKEY, 2009), o que pode ser um fator importante, uma vez que o CO₂ pode elevar a temperatura ambiental e comprometer a disponibilidade hídrica em algumas regiões produtoras.

O ganho da produtividade obtido através do aumento na concentração de CO₂ pode ser reduzido devido a outros fatores de ordem abiótica e biótica. Temperaturas mais elevadas, esperadas em consequência de alterações do CO₂ atmosférico, podem reduzir a produtividade das culturas por oferecer ambiente mais propício ao desenvolvimento de algumas espécies de plantas daninhas e pragas (NELSON, 2009). A frequência e a magnitude de secas podem ser intensificadas nas próximas décadas (CHRISTENSEN et al., 2007), o que pode desencadear o déficit hídrico nas plantas provocando alterações morfológicas, fisiológicas e químicas, influenciando na atratividade e suscetibilidade a insetos fitófagos e herbívoros (HUBERTY; DENNO, 2004; GUTBRODT et al., 2012). O aumento do CO₂ atmosférico e alterações da temperatura global podem impactar indiretamente as culturas através dos efeitos sobre pragas e doenças (GORNALL et al., 2010). Estudos sugerem que

algumas pragas respondem positivamente às concentrações de CO₂ elevadas (NEWMAN, 2004; SUDDERTH et al., 2005; STALEY; JOHNSON, 2008). Mudanças nos níveis de CO₂ atmosférico também podem causar impactos nas respostas de defesa da planta a patógenos. Em soja, maior severidade na infecção por oídio (*Microsphaera diffusa*), míldio (*Peronospora manshurica*) e mancha marrom (*Septoria glycines Hemmi*) foi observada em plantas cultivadas em condições de CO₂ elevadas (LESSIN; GHINI, 2009; EASTBURN et al., 2010).

De acordo com Ghini (2005), mudanças fitossanitárias poderão alterar a configuração agrícola mundial, acarretando grandes impactos econômicos positivos, negativos ou indiferentes de acordo com a variação do clima em cada região. A produção de alimentos em todo o mundo pode ser negativamente impactada nas próximas décadas devido às mudanças climáticas provocadas pelo aquecimento global (IPCC, 2012; SMITH; GREGORY, 2013).

A resposta do rendimento global do milho, trigo, arroz e soja diante das tendências climáticas, foi obtida por Lobell et al. (2011), através de um banco de dados referente ao período 1980-2008. Neste estudo, observou-se que as culturas de milho e trigo foram negativamente afetadas, resultando na perda de produtividade de 3,8 % e 5,5 %, respectivamente. O impacto líquido sobre a produção de arroz e soja foi insignificante, equilibrado entre ganhos em alguns países e perdas em outros.

No Brasil, foram simulados cenários agrícolas para os anos de 2020, 2050 e 2070, com base nos modelos climáticos do IPCC e no Zoneamento agrícola de 2007, para as nove culturas economicamente importantes (algodão, arroz, café, cana-de-açúcar, feijão, girassol, mandioca, milho e soja). Essas projeções indicaram que com exceção da cana-de-açúcar e da mandioca, todas as culturas sofreriam queda na área de baixo risco e, por consequência, no valor da produção (DECONTO, 2008).

A soja é uma das principais culturas de exportação brasileira (CONAB, 2013), e será uma das culturas mais atingidas pelo aquecimento global. Simulações realizadas para a região de Santa Maria-RS demonstraram que o aumento da temperatura do ar de 2 °C, 3 °C e 6 °C pode anular os efeitos benéficos do aumento de CO₂ no rendimento da cultura da soja (STRECK; ALBERTO, 2006). No pior cenário, apresentado pelo IPCC, as perdas na produção da soja podem chegar a 40 % em 2070, e a área de cultivo existente atualmente poderá ser reduzida a 60% da existente atualmente em decorrência do aumento da deficiência hídrica e de possíveis veranicos mais intensos. (DECONTO, 2008)

A economia mundial é fortemente relacionada a fatores que dependem do clima. As fontes de energia renováveis, a agricultura e a biodiversidade são potencialmente

muito vulneráveis a essas alterações e o aquecimento global pode comprometer a produção de alimentos. Embora a produção de algumas culturas em determinadas regiões do mundo possam ser otimizadas os impactos gerais das mudanças climáticas na agricultura devem ser negativos, ameaçando a segurança alimentar global (NELSON, 2009).

2.2 RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DAS PLANTAS A TEMPERATURA DO AR E AO CO₂ ATMOSFÉRICO

A expressão máxima do potencial produtivo das plantas cultivadas é dependente das condições ambientais (solo, temperatura, luminosidade, umidade do ar e gases atmosféricos) e, alterações nestes fatores, podem influenciar as respostas fisiológicas das culturas, proporcionando ganhos ou perdas na produção.

O regime térmico tem grande efeito sobre a atividade enzimática das células vivas, sendo assim, variações na temperatura levam à escassez ou acúmulo de certos compostos no interior das plantas (BENEDICT; HATFIELD, 1988). Em condições de baixas temperaturas, a taxa fotossintética de plantas C3 e C4 são similares, no entanto à medida que a temperatura aumenta, plantas C4 respondem de forma mais acelerada e eficiente. Registros demonstram que existem plantas de metabolismo C4 adaptadas a condições de 50 °C, onde plantas do tipo C3, não conseguiriam sobreviver (AWAD; CASTRO 1983). Nas concentrações atuais de CO₂ existentes no ambiente, a temperatura influencia na taxa fotossintética em plantas de metabolismo C3, como a soja. A taxa fotossintética obedece a uma curva com característica de sino, na qual o braço ascendente da curva representa uma estimulação de atividades enzimáticas dependente da temperatura, a porção do topo da curva representa uma faixa em que se encontra a temperatura ótima para a fotossíntese, o braço descendente está associado a efeitos deletérios, sensíveis à temperatura, alguns dos quais são reversíveis e outros não (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Em soja, temperaturas do ar elevadas (> 30 °C) afetam o desenvolvimento normal, determinando plantas de pequena estatura, raquíticas, com folhas pequenas e entrenós curtos. A ocorrência dessas temperaturas, durante os estádios vegetativos, diminui o crescimento e acelera o desenvolvimento, tornando menor o número de dias entre os estádios vegetativos e provocando o chamado florescimento precoce. Na fase reprodutiva altas temperaturas associadas a déficits hídricos provocam distúrbios no desenvolvimento dos grãos, causando seu enrugamento e a conseqüente diminuição dos rendimentos e qualidade dos grãos (BONATO, 2000).

Em condições adequadas de luz, concentrações mais elevadas de CO₂ sustentam taxas fotossintéticas maiores. A expressão da taxa fotossintética em função da pressão parcial de CO₂ nos espaços intercelulares dentro da folha possibilita avaliar as limitações da fotossíntese impostas pelo suprimento de CO₂, que em baixas concentrações, a fotossíntese é fortemente limitada. Em plantas C4 as taxas fotossintéticas são saturadas rapidamente devido aos mecanismos concentradores de CO₂ que operam nessas plantas, no entanto, em plantas C3 o aumento dos níveis de CO₂ nos espaços intercelulares continua a estimular a fotossíntese em uma faixa de CO₂ muito mais ampla, estas respostas indicam que em termos de produtividade as plantas C3 terão um maior benefício diante do aumento das concentrações atuais do CO₂ atmosférico (TAIZ; ZEIGER, 2009). No entanto, o ganho obtido na produtividade pode ser suprimido devido a alterações no metabolismo primário e secundário das plantas, modificando a sua interação com as pragas. Plantas que crescem sob condições de CO₂ elevados variam na sua suscetibilidade a insetos, e algumas destas variações podem ser uma resposta indireta ao aumento da temperatura (ZAVALA et al., 2013).

O crescimento e o desenvolvimento das plantas depende de um fluxo contínuo de sais minerais para a realização de importantes funções metabólicas da célula. Alterações no clima podem afetar o metabolismo primário das plantas, modificando a relação de elementos que são essenciais, como o carbono (C) e o nitrogênio (N). Elemento essencial pode ser definido como um componente intrínseco na estrutura ou metabolismo de uma planta, cuja ausência causa anormalidades severas no crescimento, desenvolvimento e reprodução vegetal (EPSTEIN; BLOOM, 2005).

O carbono é um importante constituinte das plantas, junto ao hidrogênio e oxigênio representa aproximadamente 90 % de sua matéria seca (TANAKA, 1992). O nitrogênio está presente na composição das mais importantes biomoléculas presentes nas plantas, tais como: ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas (MIFLIN; LEA, 1976; HARPER, 1994; TAIZ; ZEIGER, 2009). Em muitos sistemas de produção, a disponibilidade de nitrogênio é quase sempre um fator limitante, influenciando o crescimento da planta mais do que qualquer outro nutriente (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

A qualidade da folha como uma fonte de alimento para os insetos depende da concentração de metabólitos primários, especialmente N, o que muitas vezes limita o crescimento de insetos imaturos (DELUCIA et al., 2012). Plantas C3 cultivadas em condições elevadas de CO₂ podem apresentar uma redução na eficiência da fixação do N e na concentração de proteínas, uma vez que o metabolismo do nitrogênio nas plantas fornece

aminoácidos para todas as proteínas, incluindo as enzimas que catalisam as reações bioquímicas, diminuindo assim a sua qualidade nutricional (BLOOM, 2012).

Taxas elevadas de assimilação de C em altas concentrações de CO₂ tem um efeito de diluição do N, promovendo o aumento da relação C:N no tecido das plantas (RIIKONEN et al., 2005; ZAVALA et al., 2013). A redução da concentração de N pode ser explicada devido ao fato de uma proporção substancial de N foliar ser investida na atividade da Rubisco (EVANS, 1989), e também ao estímulo da reação de carboxilação em elevadas concentrações de CO₂ (SENEWEERA et al., 2011)

Condições elevadas de CO₂ como mencionado anteriormente estimulam a fotossíntese, principalmente em plantas C3, uma maior eficiência deste processo resulta em um aumento a concentração do total de carboidratos e açúcares nas plantas cultivadas (AINSWORTH et al., 2002). As alterações da relação C:N e o aumento no teor de C, carboidratos e açúcares nas plantas podem modificar os padrões de herbivoria em insetos (ZAVALA et al., 2013). Os insetos quando confrontados com desequilíbrios nutricionais, podem alterar o comportamento alimentar, o que pode promover uma alimentação compensatória (SCHADLER et al., 2007)

As respostas fisiológicas das plantas perante as mudanças climáticas indicam o aumento de carboidratos e o aumento da relação C:N em plantas cultivadas sob condições de CO₂ elevados. No entanto, alterações no conteúdo das substâncias químicas (metabolismo secundário) que afetam a adequação das plantas aos insetos são controversos, apresentando respostas diferenciadas nas plantas cultivadas, desta forma a compreensão dos mecanismos que atuam na produção destes metabólitos e seu comportamento diante das alterações no clima são de grande importância para subsidiar conhecimento sobre a interação inseto-plantas, auxiliando assim no controle das pragas.

2.3 RESISTÊNCIA DE SOJA A INSETOS E A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO CO₂ NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Resistência de plantas à insetos pode ser definida como a capacidade da planta de evitar ou reduzir os danos causados por fitófagos (LARA, 1991). Dentre os mecanismos de defesa apresentados pelas plantas, as substâncias químicas (aleloquímicos), desempenham importante função não somente na escolha inicial, como na determinação da quantidade de alimento que o inseto vai ingerir (BECK, 1965; FRAENKEL, 1969; JERMY, 1966).

Os aleloquímicos são definidos como metabólitos secundários, ou seja, substâncias não nutritivas, produzidas por uma espécie, e que afetam a sobrevivência, crescimento, comportamento, fecundidade ou fertilidade de indivíduos de outra espécie (KOGAN, 1986). Dentro deste grupo encontram-se os flavonoides, que tem sido relacionados a resistência de plantas a insetos (KUBO; HANKE, 1986). Os flavonoides e seus derivados: flavonas, flavonóis, antocianina, isoflavona, flavanonas, diidroflavonóis, biflavonoides (MARKHAM, 1982) são substâncias químicas fenólicas que ocorrem amplamente nas plantas (HARBONE, 1993), responsáveis pela proteção em relação à radiação ultravioleta, a insetos, a doenças causadas por fungos, bactérias e vírus; atraentes para polinização (pétalas coloridas); dispersantes de sementes (frutas vermelhas); controladores de hormônios; estimulantes à produção de nódulos pelos rizóbios; inibidores enzimáticos e agentes aleopáticos (MARKHAM, 1989). Os flavonoides e isoflavonóides também estão relacionados à defesa das plantas contra o desequilíbrio da produção de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) que pode causar a morte celular (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

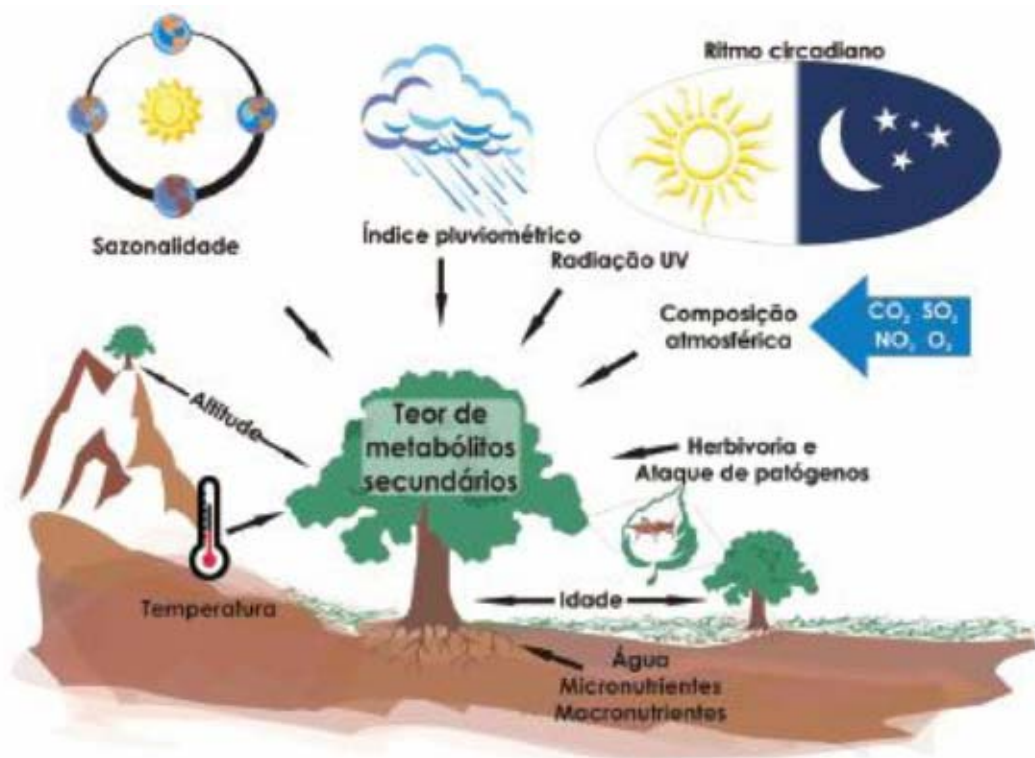
Os mecanismos bioquímicos da resistência de soja a insetos são diversos e, provavelmente, envolvem substâncias voláteis das folhas (LIU et al., 1988), variação na concentração de nutrientes, excitantes alimentares ou deterrentes, e antibióticos (FISHER et al., 1990). As substâncias voláteis das folhas podem estar envolvidas na fase inicial do processo de seleção do hospedeiro como atraentes em genótipos suscetíveis, ou repelentes em genótipos resistentes (LIU et al., 1988). Os voláteis das plantas também podem ser usados como sinalizadores para os inimigos naturais dos herbívoros para encontrar suas presas ou fornecer-lhes abrigo ou alimento alternativo (ROWELL-RAHIER; PASTEELS, 1992).

Compostos fenólicos, em geral, desempenham importante função na defesa da planta contra microrganismos e insetos pragas (DIXON; STEELE, 1999) e alguns deles como os flavonoides, dependendo da concentração podem ser atraentes, deterrentes, repelentes, ou tóxicos às pragas que atacam a cultura da soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001). A maioria das plantas possui algum grau de resistência a insetos (KOGAN, 1986). Ainda que a soja e outras leguminosas não apresentem metabólitos secundários com potencial aleloquímico evidente (KOGAN, 1986), muitos flavonoides, constitutivos ou induzidos, foram identificados em diferentes partes da planta (HOFFMANN-CAMPO, 1995). E alguns

deles tem mostrado efeito antibiótico e/ou antinutricional em diversos insetos sugadores (PIUBELLI et al., 2003) e mastigadores (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001, 2006; PIUBELLI et al., 2005; SALVADOR et al. 2010).

A biossíntese de metabólitos secundários é um processo complexo e está sujeito a influência de diferentes fatores que podem ser de ordem biótica e abiótica (Figura 1).

Figura 1 –Esquema sobre os principais fatores intrínsecos da planta e condições do ambiente que podem influenciar nos teores de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).



Dentre os fatores abióticos destaca-se a temperatura, que exerce grande influência no desenvolvimento da planta, afetando, portanto, a produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Alterações no clima como o aumento da temperatura e da emissão de gases de efeito estufa como CO_2 , podem influenciar diretamente nos processos fisiológicos da planta, promovendo alterações em sua composição química e consequentemente modificando seus níveis de resistência a insetos. Variações extremas da temperatura são desfavoráveis ao metabolismo das plantas. De maneira geral, temperaturas amenas são mais produtivas enquanto as temperaturas altas incidem negativamente sobre as vias metabólicas das plantas (SANGWAN, 2001). Em estudo avaliando a influência da

temperatura no metabolismo secundário da orelha-de-gato (*Hypericum brasiliense* Choisy), em dois grupos: o primeiro grupo submetido a temperaturas variáveis, e o segundo mantido em temperaturas constantes. Foi reportado que temperaturas elevadas (30°C) ou baixas (10°C) influenciaram no acúmulo de biomassa dos cultivares e no conteúdo total de compostos fenólicos. Quando expostas durante a noite a 10°C, as plantas produziram mais isouiginosina B, 1,5-dihidroixantona, rutina e quercetina que aquelas expostas a 30°C e à temperatura ambiente (25°C), entretanto, os níveis de ácido betulínico mensurados foram maiores a 25°C (ABREU; MAZZAFERA, 2005).

A identificação e quantificação de compostos fenólicos (naringenina, luteolina, canferol, quercetina, daidzeína e genisteína) em plantas de soja cultivadas sob altas concentrações de CO₂ (550 µmol mol⁻¹) demonstrou aumento apenas na concentração de quercitina, e redução de genisteína (O' NEILL et al., 2010), tais mudanças podem estar relacionadas a alterações no consumo, longevidade, fecundidade e densidade populacional de herbívoros. Em plantas de soja cultivadas em altas concentrações de CO₂ foi observado um maior consumo (HAMILTON et al., 2005), longevidade e fecundidade em *Popillia japonica* (O'NEILL et al., 2008). Em condições de campo uma maior população de afídeos foi observada em plantas de soja cultivadas em condições de CO₂ elevado (DERMODY et al., 2008). Níveis constitutivos e a indução por herbivoria de transcritos chave associados com a defesa e sinalização hormonal foram reprimidos sob CO₂ elevado (CASTEEL et al., 2008). Concentrações elevadas de CO₂ suprimem a produção de etileno e jasmonatos e aumenta à produção de ácido salicílico, este diferencial na resposta dos hormônios vegetais pode afetar rotas específicas do metabolismo secundário das plantas (ZAVALA et. al., 2013). Na soja, elevadas concentrações de CO₂, reduzem a expressão de genes relacionados com a sinalização de defesa. A expressão de genes que codificam a defesa do hormônio ácido jasmônico (JA; lipoxigenase 7, lox7, lipoxigenase 8, lox8) foi reduzida em CO₂ elevado (CASTEEL et al., 2008; ZAVALA et al., 2008).

Muitos compostos e substâncias foram extraídos, isolados e algumas vezes identificados na soja. Porém, o papel que representam na interação da soja com pragas da cultura não está totalmente esclarecido. Com o panorama atual de mudanças climáticas, cabe ainda, além de identificar os compostos responsáveis pela resistência, estudar os possíveis efeitos das alterações climáticas e emissão de CO₂ sobre eles.

2.4 A LAGARTA-DA-SOJA: *ANTICARSIA GEMMATALIS*

Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) também conhecida como lagarta da soja destaca-se por sua abundância e ocorrência frequente em todas as regiões do país onde a soja é cultivada (MOSCARDI et al., 2012). Na maior parte das infestações o controle desta praga tem sido realizado com agrotóxicos (ANDREI, 2003), sendo desta forma a responsável pelo grande percentual das aplicações de inseticidas. Esta praga juntamente com o complexo de percevejos são responsáveis por praticamente 90% do total de aplicações de inseticidas na cultura da soja (MOSCARDI; SOSA-GOMEZ, 1992).

Na fase inicial de seu desenvolvimento (até 1cm), *A. gemmatalis*, geralmente apresenta coloração verde e possui quatro pares de pernas abdominais (MOSCARDI et al., 2012). Nesta fase, as lagartas dependuram-se por um fio de seda, tanto para mudar de lugar na planta, quanto para não caírem no solo (denominado estágio de “fio”) e se comportam como mede-palms (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Em geral, as lagartas maiores que 1,5 cm, podem apresentar coloração totalmente verde, pardo-avermelhada ou preta com estrias brancas sobre o dorso, e é caracterizada pela presença de quatro pares de propernas abdominais, além de um par anal (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000, SOZA-GÓMEZ et al., 2006).

As lagartas desta espécie podem ter de cinco a sete ínstares, sendo seis o mais comum (MOSCARDI et al., 2012), chegando a atingir até 40 mm de comprimento (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Após o último ínstar larval, o inseto entra na fase de pré-pupa, onde constrói uma câmara pupal sob as folhas secas ou na superfície do solo (LEE; JOHNSON, 1990). Este período caracteriza-se pelo encolhimento e coloração rosada do dorso, nesta fase o inseto permanece sem se alimentar e preparando-se para a transformação em pupa (PRAÇA et al., 2006). Das pupas emergem as mariposas que apresentam coloração variando entre, cinza, marrom e bege, tendo sempre presente uma linha transversal unindo as pontas do primeiro par de asas, o que auxilia na sua identificação (SOZA-GÓMEZ et al., 2010). Durante o dia, as mariposas podem ser encontradas sob a vegetação natural ao redor das áreas de soja, ou protegidas nas partes baixas e sombreadas das plantas, após o pôr do sol, iniciam voos curtos e orientados, localizando os parceiros para o acasalamento e as plantas para a oviposição (MOSCARDI et al., 2012). Os ovos são depositados isoladamente no caule, nos ramos, nos pecíolos e na face inferior das folhas. O ciclo ovo - adulto de *A. gemmatalis* dura em média 27 dias, sendo a longevidade dos adultos cerca de 20 dias (HOFFMANN-CAMPO et al., 2005), a duração de cada estágio larval ou do ciclo pode variar em decorrência

de vários fatores, como temperatura, planta hospedeira e qualidade nutricional do alimento (FUGI et al., 2005; MILANO, 2008). Cada fêmea ovípara cerca de 1000 ovos (HOFFMANN-CAMPO et al., 2005).

Os insetos podem danificar as plantas de formas diferentes durante o seu desenvolvimento larval. Na fase de “fio”, as lagartas inicialmente raspam o tecido foliar, a partir do terceiro estágio consomem o limbo foliar e as nervuras, deixando pequenos buracos nas folhas, a maior capacidade de desfolha ocorre do quarto ao sexto instar, quando as lagartas atingem grande capacidade de injúria na soja (BUENO et al., 2011), provocando assim reduções da área foliar e, conseqüentemente, da taxa fotossintética. Nos casos mais severos, há perda total da folha, inclusive das nervuras e do pecíolo. Em função da época do ataque, do nível da infestação e das condições ambientais, e a redução da área foliar pode ocasionar perdas de produtividade (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

2.5 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO INSETO E IMPACTOS DA VARIABILIDADE CLIMÁTICA SOBRE O CONTROLE DE PRAGAS

A temperatura é um dos fatores abióticos que exercem grande influência sobre a biologia de artrópodes, sendo estes ectotérmicos. Em insetos esse fator pode afetar a duração do ciclo de vida, o voltinismo, a densidade populacional, o tamanho e a composição genética, a extensão da exploração da planta hospedeira, bem como a distribuição local e geográfica ligada à colonização e extinção (BALE et al., 2002). Em geral, o crescimento dos insetos obedece a uma curva sigmóide, onde temperaturas limítrofes influenciam negativamente sua sobrevivência e a fecundidade, entre estes limites há uma relação linear positiva entre o desenvolvimento do inseto e a temperatura (BOWLER; TERBLANCHE, 2008). Existe uma gama de temperaturas sobre a qual cada espécie pode crescer e se reproduzir (ANGILLETTA et al., 2004). Contudo, desconhece-se a extensão desse limiar e a sua relação com a história de vida das espécies ou com as variáveis ambientais (PAAIJMANS et al., 2013).

Alterações na temperatura média, no valor e na frequência dos extremos podem afetar a população de pragas e seus inimigos naturais. O efeito combinado de rápidas alterações climáticas e substantiva diminuição e/ou fragmentação de hábitat gerado por essas mudanças, poderá exercer impacto futuro sobre a distribuição e a persistência de espécies e populações (GRAHAM et al., 1996; WILLIAMS et al., 2004; MORITZ et al., 2008). Estes efeitos são maiores nos herbívoros que se alimentam acima do solo, expostos a uma grande

variabilidade de micro e macroclimas, enquanto que os insetos subterrâneos, estes têm uma menor variação termal devido ao efeito tampão do solo (BALE et al., 2002).

O aumento da temperatura deverá estender a amplitude ou reformular a distribuição geográfica de alguns insetos pragas que são limitados pela temperatura, fato constatado com duas espécies de borboletas na Inglaterra *Hesperia comma* (Lepidoptera: Hesperiiidae) Carolus Linnaeus 1758 e *Aricia agestis* Denis Schiffermüller, 1775 (Lepidoptera: Lycaenidae) que estão ampliando sua área de distribuição devido ao aumento da temperatura (THOMAS et al., 2001). Este efeito poderá ser maior nas altas latitudes, onde as temperaturas mais baixas são limitadoras do desenvolvimento de algumas espécies de insetos pragas (ANDREW; HUGHES, 2005).

As possíveis respostas dos insetos às mudanças do clima estão baseadas nos parâmetros atuais de distribuição das espécies. No entanto, a distribuição das espécies também é um reflexo da influência das interações entre outras espécies (DAVIS et al., 1998). Desta forma, inferências baseadas apenas nas mudanças climáticas podem ser equivocadas caso não considere estas interações. Ainda nesse contexto, deve-se considerar que a distribuição atual das populações de insetos pode ser resultado da disponibilidade de alimento, desta forma alterações no clima podem atuar em vários aspectos das áreas cultiváveis tais como: época de plantio e colheita, cultivares e sistemas de cultivo (PARMESAN et al., 2005).

Devido aos diversos fatores incutidos nas alterações climáticas, prever a dinâmica da população dos insetos no futuro e sua distribuição é complexo. O ciclo de vida dos insetos depende de uma série de fatores bióticos e abióticos, sendo a temperatura um dos principais fatores de influência (PORTER et al., 1991; BOWLER; TERBLANCHE, 2008). O aumento da temperatura pode resultar em uma maior taxa de crescimento, porém, pode afetar negativamente o desenvolvimento de algumas pragas, a determinação destas variações nas diferentes espécies de insetos pragas é extremamente complexa, principalmente quando se avalia as interações dos efeitos das mudanças climáticas sobre os hospedeiros e seus inimigos naturais.

A eficiência dos inseticidas pode ser influenciada pelas mudanças climáticas. As altas temperaturas podem causar uma rápida inativação dos inseticidas, reduzindo sua ação residual (AMARASEKARE; EDELSON, 2004). Além da elevação da temperatura, as mudanças climáticas podem promover alterações do regime de chuvas, e uma maior frequência de eventos extremos (HULME; VINER, 1998), impactando indiretamente as interações entre comunidades. O aquecimento global pode afetar a sobrevivência das pragas através das alterações de suas relações com seus inimigos naturais. Em uma interação

predador-presa e/ou parasitoide-hospedeiro, é necessário que se tenha uma sincronia entre os agentes para um controle mais eficiente (BALE et al., 2010). Stireman et al. (2005) ao estudar a variabilidade climática e interações lagartas-parasitoides, concluíram que há um decréscimo no parasitismo quando a variabilidade climática aumenta. Desta forma, o aumento na frequência de eventos extremos no clima poderia favorecer o crescimento e ataque de pragas devido a desequilíbrios nas interações tróficas.

As relações patogênicas entre insetos e microrganismos também podem ser alteradas por mudanças climáticas devido à baixa umidade, alta incidência de luz solar e altas temperaturas por reduzirem a virulência dos patógenos (IGNOFFO; GARCIA, 1996; SUN et al., 2003; AMARASEKARE; EDELSON, 2004). O aumento de concentração de CO₂ na atmosfera, também terão implicações sobre as plantas transgênicas resistentes a insetos (TRUMBLE; BUTLER, 2009).

O aumento da concentração de CO₂ na atmosfera poderá aumentar a suscetibilidade da soja aos insetos pragas, mas, muitos são os fatores do metabolismo da planta que pode potencialmente alterar o comportamento alimentar dos insetos (DELUCIA et al., 2012; ZAVALA et al., 2013). Altas concentrações de CO₂ também podem reduzir a capacidade de defesa da planta, devido uma menor expressão de inibidores de proteinases (ZAVALA et al., 2008), cujo gene é ativado pelo ácido jasmônico durante a herbivoria. As várias alterações no clima podem influenciar diretamente a dinâmica das populações de pragas, favorecendo a expansão populacional devido às mudanças relacionadas ao metabolismo da planta, eficiência de inseticidas e a redução de fatores de estresse bióticos como: patógenos e parasitoides.

3 ARTIGO A: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NOS ASPECTOS BIOLÓGICOS E SOBREVIVÊNCIA DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NA CULTURA DA SOJA DURANTE QUATRO GERAÇÕES

3.1 RESUMO

Alterações na temperatura média podem modificar o grau de infestação e a distribuição dos artrópodes pragas nos agrossistemas e os efeitos podem ser diretos sobre seus ciclos de vida. Neste estudo, avaliou-se o efeito de quatro temperaturas (25°C, 28°C, 31°C e 34°C) sobre a biologia de *Anticarsia gemmatalis* durante quatro gerações consecutivas. Lagartas de final de 2^o ínstar, criadas desde a eclosão na cultivar BRS 359RR em câmaras climatizadas, foram pesadas, individualizadas e avaliadas diariamente, observando-se a mortalidade, tempo de desenvolvimento, razão sexual, número de ovos e longevidade dos adultos. O ciclo de desenvolvimento dos insetos foi inversamente proporcional ao aumento da temperatura. Insetos mantidos em temperaturas elevadas foram negativamente afetados, apresentando, maiores mortalidades, menores pesos iniciais e de pupa, redução da longevidade e número de ovos. Não houve diferença entre as temperaturas para a razão sexual. Os resultados obtidos até o momento indicam que o aumento de temperatura reduz o tempo de desenvolvimento, a fecundidade e a longevidade de *A. gemmatalis*, o que permite sugerir que o aquecimento global pode influenciar negativamente as populações de *A. gemmatalis*. Contudo, estudos adicionais abordando a interação da temperatura-inseto/planta, são fundamentais para elucidar questões das relações de qualidade da planta hospedeira, resistência constitutiva e/ou induzida e da temperatura, sobre a biologia do inseto.

Palavras-chave: Aquecimento global. Mudanças climáticas. *Anticarsia gemmatalis*.

TEMPERATURE INFLUENCE ON BIOLOGICAL ASPECTS AND SURVIVAL OF *ANTICARSIA GEMMATALIS* HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA : NOCTUIDAE) IN SOYBEAN DURING FOUR GENERATIONS

3.2 ABSTRACT

Changes on the average atmospheric temperature can modify the infestation degree and the distribution of arthropod pests in agricultural systems, and the effects can be directly on their life cycles. In this study we evaluated the effect of four temperatures (25°C, 28°C, 31°C and 34°C) on *Anticarsia gemmatalis*'s biology during four consecutive generations. Caterpillars at final 2nd instars' reared from hatching on BRS 359RR in climatic chambers were weighed separately and evaluated daily, observing the mortality, development time, sex ratio, number of eggs and adult longevity. The development cycle of the insects was inversely proportional to the temperature increase. Insects kept at elevated temperatures were negatively affected, presenting higher mortality, lower initial and pupae weights, reduction on longevity and on the number of eggs. There was no difference among temperatures affecting sex ratio. The

results so far obtained indicate that temperature increasing reduces development time, fecundity and longevity of *A. gemmatalis*, which allow us suggest that global warming may affect populations of *A. gemmatalis* negatively. However, further studies on the interaction of temperature-inset/plant are key issues to elucidate the relationships of quality of the host plant, constitutive and/or induced resistance and temperature on insect biology.

Keywords: Global Warming. Climate change. *Anticarsia gemmatalis*.

3.3 INTRODUÇÃO

A temperatura média global aumentou 0,6°C nos últimos cem anos (WALTHER et al., 2002). Estudos indicam um aumento de 0,16 ° C por década, desde 1970 (LEVINSON, D. H.; FETTIG, C. J., 2014). Períodos sem congelamento em regiões de alta latitude estão aumentando, dados de satélite revelam uma diminuição de 10% na cobertura de neve e na extensão de gelo desde o final de 1960 (WALTHER et al., 2002), acelerando o aumento do nível do mar e mudanças abruptas nos ecossistemas, incluindo sistemas agrícolas (ROCKSTROM et al., 2009).

Alterações no clima estão atuando de forma a reconfigurar as interações bióticas nos ecossistemas, afetando diversas espécies animais (MONTROYA et al., 2010). A temperatura é um dos fatores ambientais que interferem diretamente na biologia e desenvolvimento dos insetos (PORTER et al., 1991; BOWLER; TERBLANCHE, 2008), que são ectotérmicos e apresentam elevado grau de sensibilidade à temperatura ambiente (BECK, 1983; AMARASEKARE et al., 2012). Alterações nos regimes térmicos, no valor e na frequência dos extremos climáticos podem acarretar em um impacto negativo sobre a população de pragas (PORTER et al., 1991), mesmo ondas de calor prolongado podem ter impacto significativo, devido ao ciclo de vida curto dos insetos (ADAMO; LOVETT, 2011).

A oscilação térmica do ambiente e, conseqüente alteração da temperatura corpórea, podem promover um aumento das reações bioquímicas e dos processos biológicos de ectotérmicos, alterando assim o seu desenvolvimento, sobrevivência e fecundidade (NARDONI LAWS et al., 2010; ZUO et al., 2012). Estudos realizados em laboratório indicaram que algumas espécies de insetos podem ter seu desenvolvimento favorecido por temperaturas elevadas, aumentando a postura de ovos, acelerando o estágio de ovo, ganhando mais massa corpórea, propiciando assim maior taxa de crescimento (ANGELITTA et al., 2010; ADAMO; LOVETT, 2011). Tais efeitos foram demonstrados por um grande número de espécies de insetos de clima temperado, onde a temperatura ótima (temperatura que gera maior número de descendentes) é mais elevada que a do ambiente (FRAZIER et al., 2006).

Contudo, a determinação destas variações nas diferentes espécies de insetos pragas é extremamente complexa. Estes efeitos são maiores nos herbívoros que se alimentam acima do solo, expostos a uma grande variabilidade de micro e macroclimas, enquanto que os insetos subterrâneos, estes têm uma menor variação termal devido ao efeito termorregulador do solo (BALE et al., 2002).

Na soja, uma das principais pragas das estruturas aéreas é *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), também conhecida como lagarta da soja. Esta praga encontra-se restrita ao hemisfério ocidental, desenvolve-se melhor em clima tropical e subtropical, e sua distribuição geográfica atinge desde o Norte dos Estados Unidos, até a América do Sul (HERZOG, TODD, 1980). No Brasil destaca-se por sua abundância e ocorrência frequente em todas as regiões de cultivo (MOSCARDI et al., 2012). Podem danificar as plantas de diferentes formas durante o seu desenvolvimento larval (BUENO et al., 2011), o que provoca reduções da taxa fotossintética e ocasiona perdas de produtividade (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Apesar de existirem produtos químicos e/ou biológicos que controlam de forma eficiente essa praga, em alguns casos se observam falhas nesse controle, devido a localização das lagartas que habitam, preferencialmente, os terços médio e inferior das plantas (FERREIRA; PANIZZI, 1978), sendo ainda este inseto um dos grandes causadores de problemas fitossanitários na cultura da soja.

Pesquisas sobre a adaptação a condições térmicas são relevantes para se obter informações sobre o efeito do aquecimento global na distribuição e abundância de animais ectotérmicos (DIXON et al., 2009). Por conseguinte, considerando-se a importância da temperatura para o desenvolvimento dos insetos, este trabalho foi realizado para avaliar a influência de diferentes temperaturas nos aspectos biológicos de *A. gemmatalis*, ao longo de quatro gerações.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Cultivo das Plantas e Condições da Câmara em que Foram Mantidos os Insetos

Os experimentos foram realizados no laboratório de Ecologia Química da Embrapa-Soja, em Londrina-PR. As plantas oferecidas aos insetos nos bioensaios foram a cultivar BRS 359RR (AL-83-RS x BRS 262) semeadas em casa de vegetação (fotofase 14 horas; T 28°C e UR 65 %), em vasos com capacidade de cinco litros, com 10 sementes por vaso. Após o desbaste, foram mantidas cinco plantas por vaso. Para garantir alimento, em

todo o desenvolvimento da lagarta, realizou-se seis plantios de forma escalonada, com total de 30 vasos em cada plantio. Como alimento, foram utilizadas folhas em estágio V5 (FEHR; CAVINESS, 1977). Previamente as folhas foram coletadas, lavadas em hipoclorito de sódio a 5 %, enxaguadas em água destilada, secas em papel toalha e pecíolo foi enrolado em algodão umedecido com água destilada para evitar a dessecação da folha.

Os parâmetros biológicos foram estudados em câmara de criação tipo BOD, sob diferentes temperaturas (25 °C, 28 °C, 31 °C e 34 °C), sendo estas reduzidas em 4 °C no período noturno (baseado nas cartas climáticas do Paraná e na oscilação diária obtida no setor de agrometeorologia da EMBRAPA-Soja), durante toda a biologia do inseto, com umidade de 70 % ± 10 % e fotofase de 14 h . Durante o período dos ensaios, a temperatura e a umidade dentro de cada câmara foram registradas em *datalogger* que armazenava os dados (temperatura e umidade) a cada minuto, até o limite de 16.000 leituras.

3.4.2 Biologia de *A. gemmatalis*

Lagartas de *A. gemmatalis* no final de 2º instar provenientes do laboratório de criação massal da Embrapa Soja, criadas desde a eclosão em folhas de soja, foram individualizadas, em copos parafinados com tampas plásticas em suas respectivas temperaturas. As lagartas foram avaliadas diariamente, observando-se a mortalidade e o tempo de desenvolvimento de cada estágio. O alimento foi substituído diariamente e o peso de pupa foi avaliado 48 h após a transformação.

Após atingirem estágio de pupa, estas foram sexadas, mantidas em copos plásticos com tampa contendo algodão umedecido para garantir a umidade necessária para sua sobrevivência. Após a emergência, os adultos foram colocados em gaiolas de acrílico nas dimensões 34 cm x 34 cm x 47 cm (MAGRINI et al., 1996) para abertura das asas e realização do voo nupcial. As gaiolas foram forradas com papel toalha, contendo recipiente com alimento 10 g de mel, 60 g de açúcar, 1 g de ácido sórbico, 1 g de metil parabeno dissolvidos em um litro de água destilada (solução estoque) e cerveja. Para o preparo da dieta do adulto, foi retirada uma alíquota da solução estoque 300 mL e realizada a sua diluição em 200 mL de cerveja. Para manter a luminosidade mínima necessária para o acasalamento, durante o período de escotofase, lâmpadas de 15 watts foram mantidas acesas (HOFFMANN-CAMPO et al., 1985; MAGRINI, 1993). Após 72 h, os casais foram retirados aleatoriamente das gaiolas de acrílico e individualizados em gaiolas confeccionadas com tubos de PVC com 20 cm de altura por 10 cm de diâmetro (MILANO, 2008), totalizando 10 casais por

temperatura. A extremidade superior dessas gaiolas foi vedada com filme plástico e na inferior com tampa de gerbox, na qual foi colocado algodão embebido em alimento. Para a oviposição e coleta dos ovos, a gaiola foi revestida internamente com papel tipo sulfite, retirado sempre em que foi observada a postura. Os ovos foram levados ao laboratório e contados com o auxílio de um microscópio estereoscópico, mantidos em copos parafinados com algodão umedecido e folhas de soja até a eclosão. As lagartas ao atingirem 2º ínstar, nas respectivas temperaturas, foram utilizadas para a sequência das gerações e bioensaios. Os casais individualizados foram mantidos na mesma temperatura durante as quatro gerações, para a análise da longevidade dos adultos, número de ovos e continuidade das gerações. As gaiolas com os casais de adultos foram observadas diariamente, substituindo-se o alimento e anotando-se a mortalidade em cada repetição.

3.4.3 Análise Estatística

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 60 repetições. As variáveis analisadas foram: mortalidade de lagartas (%), peso inicial de lagartas (mg), peso de pupa (mg), tempo de desenvolvimento (dias), longevidade dos adultos (dias), número de ovos, razão sexual, ganho de peso e crescimento. A mortalidade e a razão sexual foram comparadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2) ao nível de 5 % de probabilidade. A razão sexual foi calculada dividindo-se o número de fêmeas pelo total de indivíduos. Os resultados dos bioensaios foram submetidos às análises exploratórias para avaliar as pressuposições de normalidade dos resíduos (SHAPIRO; WILK, 1965), a homogeneidade de variância dos tratamentos e a aditividade do modelo (BURR; FOSTER, 1972) para permitir a aplicação da ANOVA. As médias foram então comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2009). A análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para estimar o crescimento e ganho de peso, conforme proposto por Raubenheimer; Simpson (1992).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Efeito de Diferentes Temperaturas sobre a Biologia de *A. gemmatalis*

Vários aspectos biológicos de *A. gemmatalis* foram afetados pela temperatura. Diferenças na porcentagem de mortalidade em função dos tratamentos foram detectadas em F_2 , através do teste de χ^2 (3; 0,05) (Tabela 3.1).

Maior porcentagem de mortalidade ocorreu a 28 °C e a 31 °C em F₂. A 31°C observou-se alta mortalidade dos adultos, somada a falta de sincronia na emergência de machos/fêmeas e uma menor quantidade de ovos, o que impossibilitou continuidade por mais uma geração. Alterações na mortalidade ao longo das gerações foram observadas somente em F₂ a 28 °C. Apesar de não ter sido observado alta mortalidade, nos insetos mantidos a 34°C, estes apresentaram deformidades e ovos inviáveis, o que não permitiu a continuidade das gerações.

Tabela 3.1 – Mortalidade (%) de *Anticarsia gemmatalis* submetidas a diferentes temperaturas, por quatro gerações em folhas de soja.

| Geração | Temperatura | | | |
|----------------|-------------|-----------|-----------|---------|
| | 25 °C | 28 °C | 31 °C | 34 °C |
| F ₀ | 15,00 a A* | 11,66 b A | 25,00 a A | 13,33 A |
| F ₁ | 23,33 a A | 23,33 b A | 18,33 a A | – |
| F ₂ | 15,00 a B | 28,33 a A | 30,00 a A | – |
| F ₃ | 18,33 a A | 11,66 b A | – | – |

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem pelo teste χ^2 a 5% de significância.

– não houve sobreviventes.

O peso inicial, duração das fases larvais, pré-pupal e de pupa, assim como o tempo de desenvolvimento total dos insetos foram afetados pelo aumento da temperatura. Em F₀ as lagartas não apresentaram diferença nos pesos iniciais, nas temperaturas 25 °C e 31 °C (Tabela 3.2). O maior peso inicial foi observado em insetos mantidos a 28 °C e o menor em 34 °C. Apesar de terem sido observadas diferenças nos pesos iniciais, isto não influenciou no peso de pupa, que foram similares.

De modo geral, a duração em dias em todos os instares foi maior em insetos da temperatura 25 °C, assim como nas fases de pré-pupa, pupa e desenvolvimento total. Por outro lado encurtamento no ciclo do inseto foi observado em insetos mantidos a 34 °C (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Peso inicial (mg), peso de pupa (mg), tempo de desenvolvimento em cada ínstar, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média \pm EP) de *A. gemmatalis* criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas, em uma geração (F₀).

| | Peso inicial (mg) | Peso de Pupa (mg) | Pré- pupa (dias) | Pupa (dias) | Total de desenvolvimento (dias) |
|------|----------------------|----------------------|---------------------|-------------------|---------------------------------------|
| 25°C | 3,32 \pm 0,07 b | 199,19 \pm 3,98 a | 1,58 \pm 0,08 a | 9,32 \pm 0,07 a | 26,70 \pm 0,13 a |
| 28°C | 4,10 \pm 0,09 a | 197,73 \pm 4,42 a | 1,27 \pm 0,07 b | 8,16 \pm 0,06 b | 22,90 \pm 0,11 b |
| 31°C | 2,90 \pm 0,11 b | 194,30 \pm 4,89 a | 1,00 \pm 0,00 c | 7,58 \pm 0,08 c | 22,41 \pm 0,19 b |
| 34°C | 2,13 \pm 0,05 c | 200,77 \pm 6,68 a | 1,02 \pm 0,02 c | 7,12 \pm 0,10 d | 19,54 \pm 0,13 c |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Ao avaliar os insetos mantidos em 25° C, 28° C e 31° C, durante três gerações, observou-se maior peso inicial em insetos mantidos a 31°C em F₁, no entanto, em F₂ este tratamento apresentou o menor peso inicial. Influência da temperatura nos pesos de pupa pode ser detectada em insetos mantidos a 28° C (F₂) e em 31° C (F₂) esses tratamentos apresentaram os menores pesos de pupa, nas respectivas gerações (Tabela 3.3). Lagartas criadas a 25°C em F₂ apresentaram os maiores pesos iniciais (Tabela 3.3). Maior duração da fase larval foi observada em insetos mantidos a 25° C, seguidos de 28°C. A menor duração da fase larval (F₁ e F₂), pré pupa e pupa foram observados em 31°.

Tabela 3.3 – Peso inicial (mg), peso de pupa (mg), desenvolvimento da fase larval, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média ± EP) de *A. gemmatalis* criadas em folhas de soja e submetidas a diferentes temperaturas, por três gerações.

| | 25° C | 28° C | 31° C |
|--|--------------------|-------------------|-------------------|
| Peso inicial (mg) | | | |
| F0 | 3,26 ± 0,06 b B | 4,06 ± 0,09 a A | 3,00 ± 0,11 b B |
| F1 | 3,27 ± 0,08 b B | 3,13 ± 0,08 c B | 4,25 ± 0,10 a A |
| F2 | 3,81 ± 0,06 a A | 3,65 ± 0,09 b A | 3,03 ± 0,09 b B |
| Peso de pupa (mg) | | | |
| F0 | 199,12 ± 4,13 a A | 198,59 ± 4,16 a A | 193,66 ± 4,75 a A |
| F1 | 215,42 ± 4,40 ab A | 188,04 ± 3,57 a B | 204,59 ± 5,89 a A |
| F2 | 207,02 ± 3,48 b A | 168,21 ± 4,12 b B | 127,26 ± 3,78 b C |
| Tempo de desenvolvimento da fase larval (dias) | | | |
| F0 | 15,79 ± 0,07 a A | 13,57 ± 0,10 a B | 13,88 ± 0,13 a B |
| F1 | 15,32 ± 0,12 b A | 13,84 ± 0,12 a B | 11,74 ± 0,09 c C |
| F2 | 15,33 ± 0,08 b A | 13,69 ± 0,11 a B | 12,62 ± 0,17 b C |
| Pré-pupa (dias) | | | |
| F0 | 1,52 ± 0,07 a A | 1,28 ± 0,06 b B | 1,02 ± 0,02 a C |
| F1 | 1,21 ± 0,06 b A | 1,15 ± 0,04 b AB | 1,00 ± 0,05 a B |
| F2 | 1,11 ± 0,04 b B | 1,72 ± 0,07 a A | 1,04 ± 0,04 a B |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O tempo de desenvolvimento da fase de pupa não foi influenciado durante as três gerações, observando-se apenas o efeito das temperaturas (Tabela 3.4), onde a duração desse período foi inversamente proporcional ao aumento da temperatura.

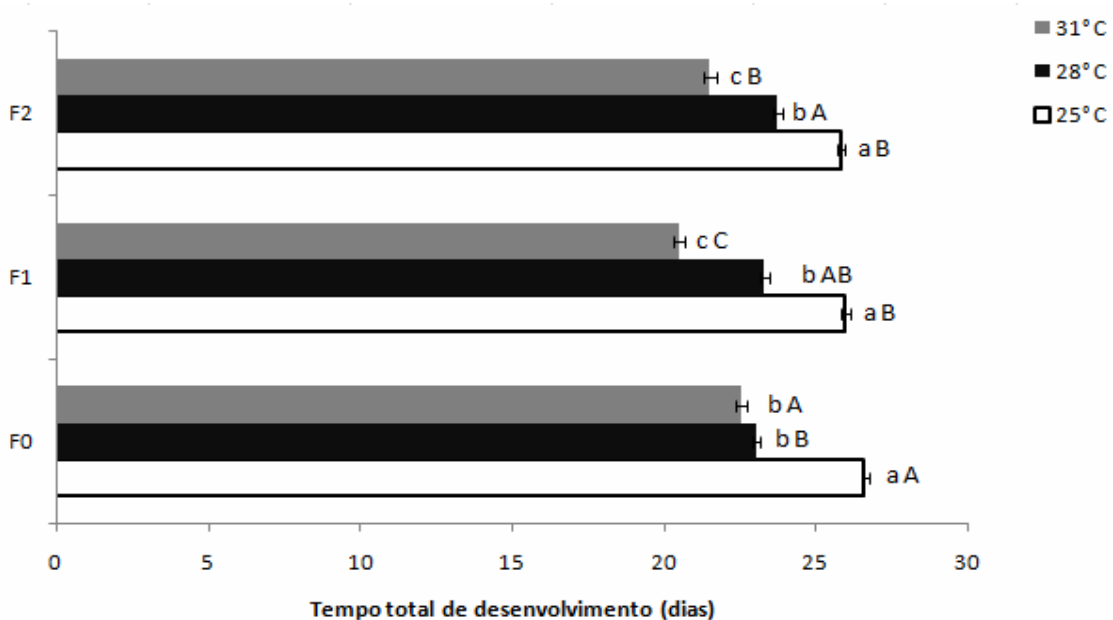
Tabela 3.4 – Duração média da fase de pupa em dias (média ± EP) de *A. gemmatalis* criadas em folhas de soja e submetidas a diferentes temperaturas, média de três gerações.

| Duração da fase de pupa (dias) | | |
|--------------------------------|---------------|---------------|
| 25 °C | 28 °C | 31 °C |
| 9,38 ± 0,04 a | 8,27 ± 0,04 b | 7,74 ± 0,05 c |
| Duração da fase de pupa (dias) | | |
| 25 °C | 28 °C | 31 °C |
| 9,38 ± 0,04 a | 8,27 ± 0,04 b | 7,74 ± 0,05 c |

Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Temperaturas mais baixas proporcionaram maior duração do ciclo do inseto, sendo o inverso observado em insetos mantidos em altas temperaturas. Insetos mantidos a 25° C apresentaram maior tempo de desenvolvimento total (soma do período de incubação dos ovos, fase larval e duração da fase de pupa), fato este que se manteve constante ao longo das gerações (Figura 3.1). Em F₀ os tratamentos 28° C e 31° C não diferiram com relação a essa variável, no entanto diferença significativa pode ser observada em F₁ e F₂.

Figura 3.1 – Tempo total de desenvolvimento (dias) de insetos criados em folhas de soja BRS 359RR e submetidos a diferentes temperaturas durante três gerações. Médias seguidas da mesma letra minúscula correspondem as gerações e maiúscula entre as gerações não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



A avaliação dos parâmetros biológicos de *A. gemmatalis* durante quatro gerações foi possível somente nas temperaturas de 25° C e 28° C. Nestes tratamentos, a resposta dos insetos manteve-se relativamente constante durante as gerações com relação as variáveis peso inicial, peso de pupa (28° C; F₁ a F₃) e tempo de desenvolvimento (Tabela 3.5). A 25° C, o peso de pupa foi influenciado pelo tratamento ao longo das gerações, havendo um aumento nas gerações F₁ e F₃. Redução da fase de pupa e tempo de desenvolvimento dos insetos foi observada em ambos os tratamentos em F₃.

Tabela 3.5 – Peso médio inicial (mg), peso de pupa (mg), desenvolvimento da fase larval, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média ± EP) de *A. gemmatalis* criadas em folhas de soja e submetidas a diferentes temperaturas, por quatro gerações

| | 25° C | 28° C |
|--|--------------------|-------------------|
| Peso inicial (mg) | | |
| F0 | 3,26 ± 0,06 b B | 4,02 ± 0,09 a A |
| F1 | 3,28 ± 0,08 b A | 3,13 ± 0,08 c A |
| F2 | 3,81 ± 0,06 a A | 3,67 ± 0,08 b A |
| F3 | 3,58 ± 0,09 ab A | 3,49 ± 0,08 b A |
| Peso de pupa (mg) | | |
| F0 | 199,19 ± 4,13 c A | 198,07 ± 4,11 a A |
| F1 | 216,35 ± 4,40 ab A | 188,04 ± 3,57 a B |
| F2 | 207,02 ± 3,48 bc A | 168,54 ± 3,77 b B |
| F3 | 229,09 ± 6,80 a A | 193,33 ± 4,39 a B |
| Tempo de desenvolvimento da fase larval (dias) | | |
| F0 | 15,79 ± 0,07 a A | 13,58 ± 0,09 a B |
| F1 | 15,26 ± 0,11 b A | 13,84 ± 0,12 a B |
| F2 | 15,33 ± 0,08 b A | 13,65 ± 0,10 a B |
| F3 | 15,54 ± 0,20 ab A | 13,64 ± 0,08 a B |
| Pré-pupa (dias) | | |
| F0 | 1,52 ± 0,07 a A | 1,28 ± 0,06 b B |
| F1 | 1,22 ± 0,06 b A | 1,15 ± 0,04 b A |
| F2 | 1,11 ± 0,04 b A | 1,87 ± 0,09 a B |
| F3 | 1,31 ± 0,07 ab A | 1,07 ± 0,03 b B |
| Pupa (dias) | | |
| F0 | 9,31 ± 0,07 a A | 8,18 ± 0,06 a B |
| F1 | 9,44 ± 0,08 a A | 8,32 ± 0,07 a B |
| F2 | 9,41 ± 0,08 a A | 8,39 ± 0,08 a B |
| F3 | 8,37 ± 0,09 b A | 7,83 ± 0,09 b B |
| Tempo total de desenvolvimento (dias) | | |
| F0 | 26,62 ± 0,12 a A | 23,04 ± 0,12 bc B |
| F1 | 25,93 ± 0,14 b A | 23,32 ± 0,16 b B |
| F2 | 25,86 ± 0,12 b A | 23,92 ± 0,16 a B |
| F3 | 25,22 ± 0,19 c A | 22,54 ± 0,13 c B |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

O teste de χ^2 ($p > 0,05$), não apontou influência dos tratamentos e das gerações na razão sexual dos insetos (Tabela 3.6), ressaltando-se que em F₃ na temperatura de 31 °C, não tiveram sobreviventes, assim como em 34°C, a partir de F₁.

Tabela 3.6 – Razão sexual de *A. gemmatalis* em (25°C, 28°C, 31°C e 34°C) durante quatro gerações.

| Geração | Temperatura | | | | χ^2 |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|--------------------|
| | 25 °C | 28 °C | 31 °C | 34 °C | |
| F ₀ | 0,55 | 0,58 | 0,56 | 0,54 | 0,26 ^{ns} |
| F ₁ | 0,61 | 0,39 | 0,46 | – | 5,03 ^{ns} |
| F ₂ | 0,55 | 0,58 | 0,57 | – | 0,07 ^{ns} |
| F ₃ | 0,59 | 0,55 | – | – | 0,21 ^{ns} |
| χ^2 | 0,51 ^{ns} | 5,56 ^{ns} | 1,45 ^{ns} | – | |

χ^2 a 5% de significância. ns- Não significativo – não houve sobreviventes

O número de ovos foi afetado pelas temperaturas. Na primeira geração maior quantidade de ovos pode ser observada nos tratamentos 25°C, 28°C e 31°C. O número de ovos foi menor a 34°C, sendo todos inviáveis, o que impossibilitou a continuidade das gerações nesse tratamento (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Número de ovos, de *A. gemmatalis* em quatro temperaturas (25°C, 28°C, 31°C e 34°C) na primeira geração.

| Número de ovos | | | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 25 °C | 28 °C | 31 °C | 34 °C |
| 539,20 ± 70,24 a | 410,30 ± 53,36 a | 402,90 ± 13,66 a | 109,70 ± 29,44 b |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O número de ovos não apresentou diferença significativa dentro dos tratamentos ao longo das gerações, sendo apresentada a média geral de todas as gerações (Tabela 3.8). Redução nesta variável pode ser observada em temperaturas mais elevadas (31°C).

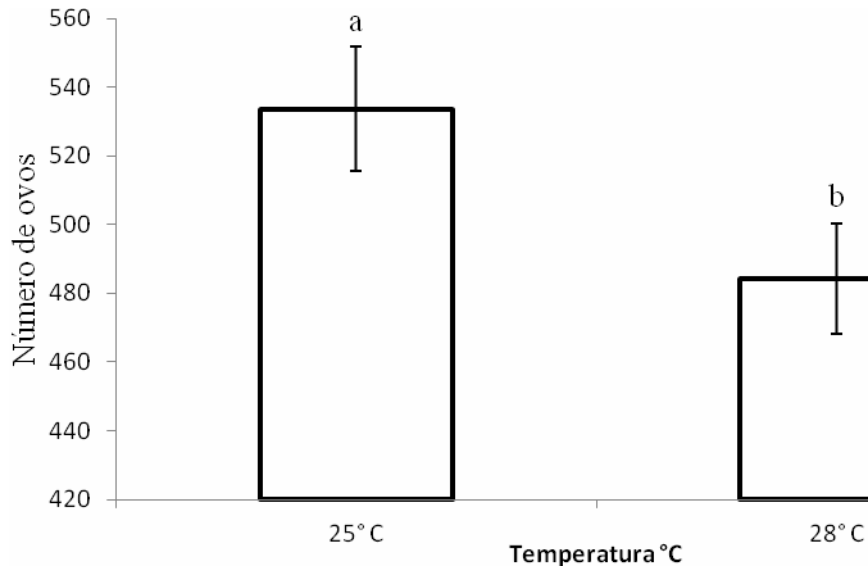
Tabela 3.8 – Número médio de ovos, de *A. gemmatalis* em três temperaturas durante três gerações.

| Número de ovos | | |
|------------------|------------------|------------------|
| 25 °C | 28 °C | 31 °C |
| 526,30 ± 23,82 a | 478,90 ± 20,89 a | 393,83 ± 12,42 b |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ao avaliar o número de ovos em insetos mantidos em 25° C e 28° C durante quatro gerações, pode-se observar que no primeiro o número de ovos foi maior (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Média do número de ovos de *A. gemmatalis* mantidas em temperaturas de 25 °C e 28 °C, durante quatro gerações. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



A longevidade das fêmeas em F₀, foi semelhante em todas as temperaturas adotadas. No entanto, em machos, pode-se observar menor longevidade em insetos mantidos a 34°C nesta geração (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 – Longevidade de machos de *A. gemmatalis* em quatro temperaturas durante a primeira geração.

| Longevidade dos machos | | | |
|------------------------|----------------|-----------------|---------------|
| 25 °C | 28 °C | 31 °C | 34 °C |
| 10,90 ± 0,48 a | 11,20 ± 0,49 a | 10,10 ± 0,35 ab | 9,10 ± 0,48 b |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ao longo das gerações a longevidade dos machos não diferiu significativamente dentro dos tratamentos. Contudo, diferença nesta variável pode ser constatada nas fêmeas, sendo a maior longevidade observada em F₂ para todos os tratamentos (Tabela 3.10).

Tabela 3.10 – Longevidade de fêmeas de *A. gemmatalis* em (25° C, 28° C e 31° C) durante três gerações.

| | Longevidade das fêmeas | | |
|----|------------------------|------------------|-------------------|
| | 25 °C | 28 °C | 31 °C |
| F0 | 12,22 ± 0,46 b A | 12,11 ± 0,35 b A | 11,00 ± 0,36 b A |
| F1 | 12,00 ± 0,40 b B | 13,71 ± 0,28 a A | 12,22 ± 0,52 ab B |
| F2 | 14,87 ± 0,35 a A | 14,25 ± 0,45 a A | 12,77 ± 0,36 a B |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.5.2 Ganho de Peso e Crescimento

A ANCOVA indicou efeito interativo apenas entre os tratamentos e a covariável peso inicial (Tabela 3.11 a), na geração F0, e tempo de desenvolvimento larval (Tabela 3.12 d), em F3. Não ocorreu efeito interativo entre os tratamentos e a covariáveis peso inicial e tempo de desenvolvimento larval na sua relação com o peso de pupa nas gerações. No ganho de peso não houve efeito do tratamento e das gerações (F₁, F₂ e F₃), como também para o crescimento nas gerações F₀, F₁ e F₂ (Tabela 3.11a,b,c).

Tabela 3.11 – Análise de covariância (ANCOVA) para verificar o efeito dos diferentes tratamentos no ajuste de peso de pupa pela covariável peso inicial na geração F₀: 25°C, 28°C, 31°C e 34° (a, b), geração F₁ e F₂: 25°C, 28°C (c) e 31°C e na geração F₃: 25°C e 28°C (d) em *A. gemmatalis*.

| Varição | GL | Peso de pupa (Valor de F) |
|--------------------------------------|-----|------------------------------|
| F₀ | | |
| (a) Peso inicial (covariável) | 1 | 0,67 ^{ns} |
| Tratamento | 3 | 0,73 ^{**} |
| Peso inicial x Tratamento | 3 | 3,39 ^{**} |
| Resíduo | 195 | - |
| (b) Tratamento | 3 | 0,85 ^{ns} |
| Peso inicial | 1 | 0,64 ^{ns} |
| Resíduo | 195 | - |
| F₁ e F₂ | | |
| (c) Peso inicial (covariável) | 2 | 0,13 ^{ns} |
| Tratamento | 2 | 0,26 ^{ns} |
| Geração | 2 | 2,48 ^{ns} |
| Tratamento x Geração | 1 | 1,70 ^{ns} |
| Peso inicial x Tratamento | 2 | 0,98 ^{ns} |
| Peso inicial x Geração | 2 | 0,05 ^{ns} |
| Peso inicial x temperatura x geração | 2 | 0,95 ^{ns} |
| Resíduo | 413 | - |
| F₃ | | |
| (d) Peso inicial (covariável) | 1 | 0,39 ^{ns} |
| Tratamento | 1 | 0,10 ^{ns} |
| Geração | 3 | 0,93 ^{ns} |
| Tratamento x Geração | 3 | 1,01 ^{ns} |
| Peso inicial x Tratamento | 1 | 2,66 ^{ns} |
| Peso inicial x Geração | 3 | 1,01 ^{ns} |
| Peso inicial x temperatura x geração | 3 | 0,655 ^{ns} |
| Resíduo | 375 | - |

*P < 0,05 **P < 0,01, *** P < 0,001, ns- não significativo

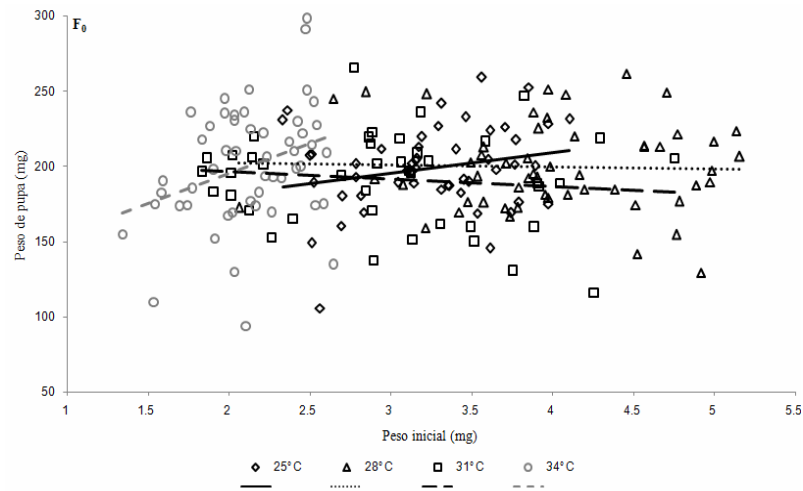
Tabela 3.12 – Análise de covariância (ANCOVA) para verificar o efeito dos diferentes tratamentos no ajuste de peso de pupa pela covariável tempo de desenvolvimento larval na geração F₀: 25°C, 28°C, 31°C e 34° (a, b), geração F₁ e F₂: 25°C, 28°C e 31°C (c) e na geração F₃: 25°C e 28°C (d) em *A. gemmatalis*.

| Varição | GL | Peso de pupa (Valor de F) |
|---|-----|------------------------------|
| F₀ | | |
| (a) Tempo de desenvolvimento (covariável) | 1 | 2,16 ^{ns} |
| Tratamento | 3 | 0,66 ^{ns} |
| Tempo de desenvolvimento x Tratamento | 3 | 0,79 ^{ns} |
| Resíduo | 195 | - |
| (b) Tratamento | 3 | 1,20 ^{ns} |
| Tempo de desenvolvimento | 1 | 2,17 ^{ns} |
| Resíduo | 195 | - |
| F₁ e F₂ | | |
| (c) Tempo de desenvolvimento (covariável) | 1 | 1,78 ^{ns} |
| Tratamento | 2 | 0,29 ^{ns} |
| Geração | 2 | 0,97 ^{ns} |
| Tratamento x Geração | 4 | 1,02 ^{ns} |
| Tempo de desenvolvimento x Tratamento | 2 | 0,42 ^{ns} |
| Tempo de desenvolvimento x Geração | 2 | 1,10 ^{ns} |
| T. de desenvolv. X Temperatura x geração | 2 | 1,06 ^{ns} |
| Resíduo | 413 | - |
| F₃ | | |
| (d) Tempo de desenvolvimento (covariável) | 1 | 14,25 ^{***} |
| Tratamento | 1 | 2,90 ^{ns} |
| Geração | 3 | 1,86 ^{ns} |
| Tratamento x Geração | 3 | 1,94 ^{ns} |
| Tempo de desenvolvimento x Tratamento | 1 | 3,87 [*] |
| Tempo de desenvolvimento x Geração | 3 | 2,00 ^{ns} |
| T. de desenvolv. x temperatura x geração | 3 | 1,86 ^{ns} |
| Resíduo | 375 | - |

*P<0,05, **P< 0,01, *** P< 0,001, ns- não significativo

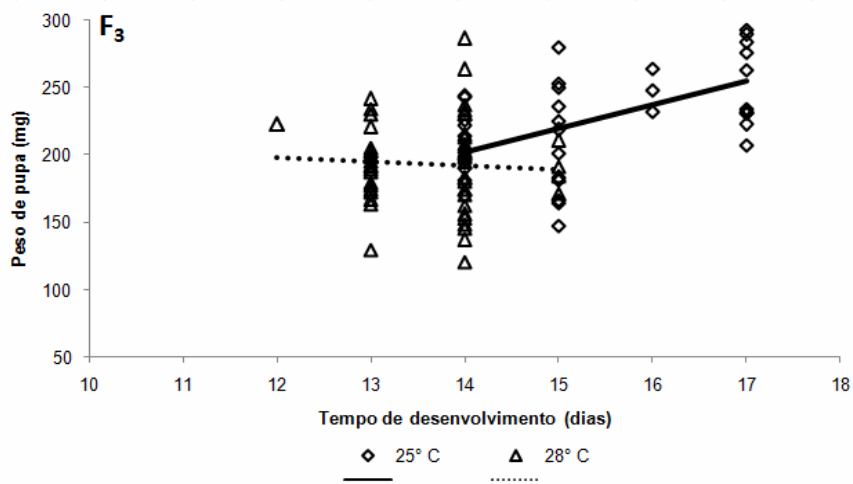
Relação positiva entre os fatores peso inicial e peso de pupa (ganho de peso) foi observada em lagartas mantidas em 25° C e 34° C em F₀ indicando aumento de peso proporcional do peso inicial (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Relação entre peso de pupa (mg) e peso inicial (mg) de *A. gemmatalis* criadas e alimentadas com plantas de soja BRS 359RR cultivadas em diferentes temperaturas (25° C, 28° C, 31° C e 34° C) nas gerações F₀.



O crescimento (peso de pupa x tempo de desenvolvimento) (Fig. 3.4) apresentou uma relação positiva com o tempo de alimentação no tratamento 25°C e uma relação negativa em 28°C na geração F₃. No último tratamento, lagartas que prolongaram o seu tempo de alimentação não apresentaram aumento proporcional no peso de pupa.

Figura 3.4 – Relação entre peso de pupa (mg) e tempo de desenvolvimento (dias) de *A. gemmatalis* criadas e alimentadas com plantas de soja BRS 359RR cultivadas em diferentes temperaturas (25° C, 28° C, 31° C e 34° C), na geração F₃.



3.6 DISCUSSÃO

A avaliação de *A. gemmatalis* em diferentes temperaturas durante quatro gerações, permitiu avaliar, aspectos biológicos, bem como a capacidade de adaptação deste

inseto, à condições térmicas mais elevadas, que são esperadas com o aquecimento global. A capacidade de insetos herbívoros de se adaptar às mudanças climáticas por meio de alterações fenotípicas e respostas evolutivas rápidas, poderiam reduzir os efeitos adversos de mudanças climáticas em muitas espécies (BALE et al., 2002).

O aumento da temperatura pode afetar a mortalidade, peso inicial e de pupa, duração das fases de larva, pré-pupa, pupa, longevidade dos adultos e número de ovos depositados de *A. gemmatalis*. Em geral, em temperaturas mais elevadas, os insetos apresentaram maior mortalidade, redução no tempo utilizado para seu desenvolvimento e no número de ovos. Resultados similares com relação ao aumento da mortalidade associada a temperaturas mais altas e redução do tempo de desenvolvimento também foram observadas em *A. gemmatalis* criadas em dieta artificial ao longo de três gerações (SILVA et al., 2012).

A maior mortalidade em insetos submetidos a temperaturas mais elevadas (28° C e 31° C), pode estar associada a duas teorias, a primeira em que se sugere que os efeitos do calor sobre as macromoléculas (proteínas, DNA, RNA, lípidos, carboidratos) são os causadores da maior mortalidade (ROTI ROTI, 1982), e a outra aponta para os danos da membrana celular, como o evento crítico (BOWLER, 1987). No entanto, essas teorias desconsideram o efeito do calor no organismo como um todo. De acordo com Denlinger e Yocum (1998), existe uma hierarquia na resistência térmica que segue macromoléculas, células, tecido e o organismo inteiro, esta progressão explica a mortalidade tardia muitas vezes observada na avaliação de tratamentos térmicos sobre insetos. O inseto pode permanecer vivo depois que foi submetido a elevadas temperaturas, no entanto, pode não conseguir completar o desenvolvimento normal (NEVEN, 2000). Esse fato pode ser observado neste estudo com *A. gemmatalis* mantidas a 34°C, onde, apesar da baixa mortalidade, os adultos apresentaram deformidade nas asas e ovos inviáveis. Silva et al. (2012) observaram o mesmo efeito sobre essa espécie a temperaturas acima de 31°C.

A 34°C, na primeira geração, observou-se os menores pesos iniciais, no entanto, não foi observada diferença significativa nos pesos de pupa atingidos por estes insetos. Ao longo das gerações os menores pesos de pupa apresentados por insetos mantidos a 28° C e 31° C, podem estar relacionados a uma possível economia energética, onde os insetos reduzem a atividade metabólica para a manutenção do equilíbrio térmico corporal (WATERS; HARRISON, 2012), o que pode influenciar na assimilação nutricional do alimento. Outra hipótese seria um maior gasto de energia devido a maior movimentação dos insetos submetidos a uma faixa de temperatura superior e inadequada para seu desenvolvimento, o que resulta na redução de seu peso (CHAPMAN, 1998).

A duração da fase larval foi reduzida com o aumento da temperatura de 25°C para 34°C. De modo geral, o tempo de desenvolvimento larval em cada instar ou o tempo de desenvolvimento total reduz exponencialmente com o aumento da temperatura (RATTE, 1985). No entanto, em alguns casos a aceleração do crescimento em insetos submetidos a temperaturas elevadas envolve altos custos metabólicos que refletem no insucesso na fase de pupa e redução da eficiência de armazenamento de lipídios como observados em *Spodoptera exigua* - Lepidoptera: Noctuidae (LEE; ROH, 2010).

Redução do tempo total de desenvolvimento de *A. gemmatalis* ao longo das gerações foi observado em 25°C e 31° C, o que sugere uma adaptação dos insetos aos diferentes regimes térmicos adotados. Estes resultados diferem dos encontrados por Silva et al. (2012), onde ao avaliar a mesma espécie em diferentes regimes térmicos, não observaram redução desta variável ao longo das gerações. Os diferentes resultados obtidos para mesma espécie, podem estar associados ao emprego de metodologias diferenciadas, para este estudo empregou-se a oscilação térmica entre períodos diurnos e noturnos, enquanto no experimento citado acima utilizou-se a adoção de temperaturas constantes.

O número de ovos foi negativamente afetado por temperaturas elevadas, sendo o menor número observado em insetos mantidos a 34°C. Em experimentos realizados por Milano et al. (2008), redução da quantidade de ovos em *A. gemmatalis*, também pode ser observada em temperaturas elevadas (35°C), onde, se observou menor frequência de cópulas e consequentemente menor número de espermatóforos nas fêmeas. Esses resultados permitem sugerir que a menor quantidade de ovos pode estar relacionada a redução de cópulas (não avaliada neste estudo) em insetos submetidos a temperaturas elevadas. Em diversos aspectos biológicos avaliados, os insetos mantidos a 31° C não diferirem dos mantidos nas temperaturas 25 e 28°C na primeira geração. No entanto, a biologia de insetos mantidos a 31° C, foi afetada pela temperatura no decorrer das gerações, observando-se redução do peso de pupa, oviposição e longevidade dos adultos. De acordo com Neven (2000), muitas das alterações no desenvolvimento e na reprodução de insetos submetidos a altas temperaturas, podem estar relacionadas a mudanças no sistema endócrino, que ainda não foram esclarecidas. A razão sexual não foi afetada pelo aumento na temperatura. Estudos realizados em *A. gemmatalis* (SILVA et al., 2012) corroboram os resultados obtidos neste trabalho.

Maior longevidade dos adultos pode ser observada em insetos mantidos nas temperaturas 25 e 28°C que são temperaturas ideais para o desenvolvimento deste inseto, sendo o inverso observado nas temperaturas mais altas. Outros estudos que relacionam a temperatura e o desenvolvimento dos insetos indicam que o período de sobrevivência dos

insetos adultos é mais curto em temperaturas mais elevadas (BARI; LANGE 1980; MOSCARDI et al., 1981). Estes resultados confirmam também os obtidos por Milano et al. (2008), ao avaliarem a influência da temperatura na longevidade dos adultos de *A. gemmatalis* observaram que a longevidade dos adultos decresceu em temperaturas mais elevadas. No entanto, aumento da longevidade das fêmeas em todas as temperaturas pode ser observado no decorrer das gerações, o que sugere uma adaptação dos insetos aos diferentes regimes térmicos empregados. Maior longevidade de fêmeas de *A. gemmatalis* ao longo das gerações, também foi observada a 25°C, o que não pode ser constatado para temperaturas mais elevadas (SILVA et al., 2012).

Os menores pesos iniciais observados em lagartas submetidas a elevadas temperaturas, não influenciaram em seu ganho de peso, que foi proporcional aos apresentados por insetos que foram mantidos em temperaturas mais amenas. A temperatura pode influenciar na eficiência da utilização dos alimentos. Em baixas temperaturas esta eficiência pode ser suprimida de modo que, mesmo uma dieta de alta qualidade pode não aumentar o crescimento larval (STAMP, 1990). Esta redução na eficiência da utilização dos alimentos pode explicar a similaridade dos pesos de pupa de *A. gemmatalis* nos diferentes regimes térmicos empregados. O crescimento foi negativamente influenciado pelo aumento da temperatura, insetos submetidos a 28°C tiveram menor crescimento quando comparados a 25°C. De acordo com Van Der Have e Jong (1996) o crescimento dos animais ectotérmicos é reduzido com o aumento da temperatura.

3.7 CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados dos parâmetros biológicos avaliados neste trabalho, pode-se inferir que a população de *A. gemmatalis* pode ser negativamente afetada pelo aumento da temperatura, no entanto indícios de adaptação aos diferentes regimes térmicos adotados ao longo das gerações foram observados. Entretanto, para que se confirme essa possível adaptação, estudos mais aprofundados de alterações genotípicas e capacidade de adaptação dos insetos, além dos efeitos da temperatura sobre a planta hospedeira e inimigos naturais são necessários para uma melhor compreensão dos efeitos das mudanças climáticas na dinâmica populacional dessa praga.

4 ARTIGO B: EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE ASPECTOS BIOLÓGICOS E SOBREVIVÊNCIA DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DURANTE QUATRO GERAÇÕES E NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM SOJA

4.1 RESUMO

A temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes que afetam as interações fisiológicas e comportamentais de insetos e plantas. Alterações neste fator podem modificar o grau de infestação e a distribuição dos artrópodes pragas nos agrossistemas, além de modificar a constituição de metabólitos secundários das plantas. Neste estudo avaliou-se o efeito de quatro temperaturas (25°C, 28°C, 31°C e 34°C) sobre a biologia de *Anticarsia gemmatalis* durante quatro gerações consecutivas e a influência destas temperaturas na concentração dos flavonoides em folhas de soja. Lagartas de final de 2^o instar, criadas desde a eclosão na cultivar BRS 359RR, em câmaras climatizadas, foram pesadas, individualizadas e avaliadas diariamente, observando-se a mortalidade, tempo de desenvolvimento, razão sexual, número de ovos e longevidade dos adultos. Para a identificação e quantificação de compostos fenólicos, plantas cultivadas em câmaras de crescimento nas respectivas temperaturas em V3, foram analisadas em HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Temperaturas mais altas proporcionaram aos insetos um encurtamento no ciclo de desenvolvimento, no entanto nesses tratamentos maior mortalidade, menor número e inviabilidade dos ovos foram observadas. Os pesos de pupa foram maiores nas temperaturas de 25°C e 28°C. A razão sexual não foi influenciada pelas temperaturas. Maior concentração de isoflavonoides foi encontrada em plantas cultivadas a 25°C. A 31°C e 34°C as plantas apresentaram uma alta concentração de ácido salicílico. Os resultados obtidos demonstram que o aumento de temperatura influencia no ciclo de desenvolvimento de *A. gemmatalis* e nas concentrações de compostos fenólicos presentes na soja.

Palavras-chave: Mudanças climáticas. Temperatura. Flavonóides. *Anticarsia gemmatalis*.

TEMPERATURE EFFECT ON BIOLOGICAL ASPECTS AND SURVIVAL OF *ANTICARSIA GEMMATALIS* HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) AND IN SECONDARY METABOLITES PRODUCTION DURING FOUR GENERATIONS IN SOYBEAN

4.2 ABSTRACT

Temperature is one of the most important abiotic factors affecting physiological and behavioral interactions of insects and plants. Changes in this factor can modify the infestation degree and the distribution of arthropod pests in agricultural systems, in addition to modifying the secondary plant metabolites composition. This study considered the effect of four

temperatures (25°C, 28°C, 31°C and 34°C) on *Anticarsia gemmatalis*'s biology for four consecutive generations and the influence of these temperatures on the flavonoids concentration in soybean leaves. Caterpillars at final 2nd instars', reared from hatching on BRS 359RR in controlled conditions, were weighed separately and daily evaluated, observing the mortality, development time, sex ratio, number of eggs and adult longevity. For identification and quantization of phenolic compounds, plants grown in growth chambers at respective temperatures until V3 were analyzed by HPLC. Higher temperatures provided a shortening of the development cycle of insects, however these treatments increased mortality, and fewer and unfeasible eggs were found. Pupae weights were higher at 25°C and 28°C temperatures. Sex ratio was not influenced by temperature. Higher concentrations of isoflavones were found in plants cultivated at 25°C. At 31°C and 34°C plants showed a high concentration of salicylic acid. The reached results show the influence of temperature increasing on the cycle development of *A. gemmatalis* and on the phenolic compounds concentration present in soybeans as well.

Keywords: Climate change. Temperature. Flavonoids. *Anticarsia gemmatalis*.

4.3 INTRODUÇÃO

Na última década, um grande número de eventos climáticos extremos causou danos aos ecossistemas e à sociedade (COUMOU; RAHMSTORF, 2013). Ondas de calor foram observadas em diversas partes do mundo (SCHÄR et al., 2004; FOUNDA; GIANNAKOPOULOS, 2009; KAROLY, 2009; BARRIOPEDRO et al., 2011; .RAHMSTORF; COUMOU, 2011; NOAA, 2012), o que causou grande número de mortes relacionadas ao calor, incêndios florestais e perdas nos sistemas agrícolas (COUMOU; RAHMSTORF, 2013).

Temperaturas médias globais superiores podem conduzir a ondas de calor mais severas (DELLA-MARTA et al., 2007; IPCC, 2007) o que pode influenciar nas relações bióticas no ecossistema, tais como relações inseto/planta. Os insetos por serem ectotérmicos podem devido ao seu curto ciclo de vida, responder rapidamente ao aumento da temperatura (CHEN et al., 2011). Até mesmo ondas de calor prolongadas podem ter impacto significativo na biologia de insetos (ADAMO; LOVETT, 2011).

Nas plantas, temperaturas elevadas atuam principalmente nas funções de fotossíntese (WEIS; JOSEPH, 1988). A taxa fotossintética obedece a uma curva com característica de sino, na qual o braço descendente está associado a efeitos deletérios sensíveis a temperatura, alguns dos quais são reversíveis e outros não (TAIZ; ZEIGER, 2009), podendo ocasionar perdas na produtividade. O regime térmico tem grande efeito sobre a atividade enzimática das células vivas, sendo assim, variações na temperatura levam a escassez ou acúmulo de certos compostos no interior das plantas (BENEDICT; HATFIELD, 1988).

Dentre as substâncias que podem sofrer alterações devido ao efeito da temperatura estão os metabólitos secundários (GOBBO NETO; LOPES, 2007), que são substâncias não nutritivas, produzidas por uma espécie vegetal, e que afetam a sobrevivência, crescimento, comportamento, fecundidade ou fertilidade de indivíduos de outra espécie (KOGAN, 1986; DESPRÉS; DAVID; GALLE, 2007). Mudanças na produção desses compostos podem alterar os níveis de resistência das plantas a insetos. Dentro do grupo de metabólitos secundários, encontram-se os flavonoides, que atuam na resistência de plantas a insetos e patógenos (KUBO; HANKE, 1986), e também estão relacionados à defesa das plantas contra o desequilíbrio da produção de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) que pode causar a morte celular (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010).

Os mecanismos bioquímicos da resistência de soja a insetos são diversos e, provavelmente, envolvem, variação na concentração de nutrientes, excitantes alimentares ou deterrentes, e antibióticos (FISHER et al., 1990). Ainda que a soja e outras leguminosas não apresentem metabólitos secundários com potencial aleloquímico evidente (KOGAN, 1986), muitos flavonoides, constitutivos ou induzidos, foram identificados em diferentes partes da planta (HOFFMANN-CAMPO, 1995). Alguns deles tem mostrado efeito antibiótico e/ou antinutricional em diversos insetos sugadores (PIUBELLI et al., 2003) e mastigadores (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001, 2006; PIUBELLI et al., 2005; SALVADOR, 2010).

Estudos para a adequação térmica dos insetos ou até mesmo simulando alterações da temperatura média global têm sido realizados, sendo na maioria deles utilizadas temperaturas constantes e em uma geração. Contudo, apesar da importância desses estudos, a adoção de um regime térmico constante não representa de forma adequada as condições observadas no ambiente natural. Temperaturas ambientais passam por ciclos diários (termoperíodos) em que as temperaturas diurnas são maiores que as noturnas. Embora os termoperíodos diários formem um padrão sazonal previsível de mudança, este padrão pode servir como uma fonte de informação ambiental a ser explorada por meio de adaptações diárias e sazonais que controlam o desenvolvimento e comportamento dos insetos (BECK, 1983). Outra forma de melhor explorar estudos sobre os efeitos de temperaturas mais elevadas sobre os insetos, é o estudo de várias gerações, que permitem avaliar, a estabilidade do comportamento, aspectos biológicos e indicam a capacidade de adaptação do inseto.

Alterações na temperatura, podem afetar aspectos biológicos dos insetos como verificado em experimentos anteriores, no entanto, a forma como essas alterações atuam na produção de metabólitos secundários em plantas de soja e a relação desses metabólitos na biologia dos insetos, ainda não foram esclarecidas. Desta forma este trabalho

teve como objetivo avaliar o efeito de quatro temperaturas sobre a biologia de *A. gemmatalis*, alimentadas diretamente nas plantas de soja submetidas as mesmas condições, durante quatro gerações consecutivas e a influência destas temperaturas na concentração dos flavonoides em folhas de soja.

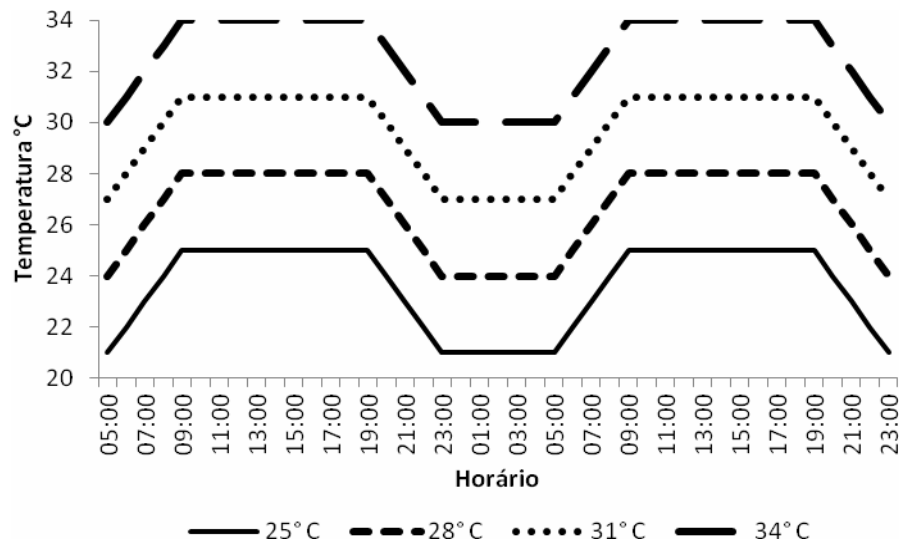
4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Cultivo das Plantas e Condições das Câmaras de Crescimento

Para alimentar os insetos, plantas de soja da cultivar BRS 359RR foram cultivadas em tubetes com terra esterilizada, em casa de vegetação com fotoperíodo de 14:10 horas (L:E), temperatura de 28 °C e umidade relativa de 65 %. Ao atingirem o estágio V1 foram transferidas para as câmaras de crescimento (fitotrons) com as seguintes temperaturas (25 °C, 28 °C, 31 °C e 34°C), com radiação fotossinteticamente ativa de $60\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ e umidade relativa de aproximadamente 60 %. As plantas foram irrigadas diariamente, com 50 mL de água. Uma vez por semana, as plantas foram irrigadas com solução nutritiva (BROUGHTON; DILWORTH, 1970) e suplementadas com 1 mL de solução de nitrato de amônio (40 g/L). Para garantir alimento, em todo o desenvolvimento da lagarta, foram realizadas duas sementeiras de forma escalonada, totalizando 200 tubetes por temperatura.

Durante o período noturno, todas as temperaturas foram reduzidas em 4° C, decrescendo gradativamente em 1 °C, a partir das 19:00 horas, sendo esta redução realizada até às 23:00 horas. Entre as 23:00 h e as 5:00 h as temperaturas mínimas adotadas mantiveram-se constantes. A partir das 5:00 h, as câmaras foram programadas para crescer em 1 °C de forma gradativa, até as 9:00 h. Mantendo-se as temperaturas máximas (25° C, 28° C, 28°C e 31°C) das 9:00 h até as 19:00 h (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Representação da oscilação diária da temperatura em fitotron com 25° C, 28° C, 31° C e 34° C.



4.4.2 Condução dos Bioensaios

Ao atingirem o estágio V3, as plantas foram oferecidas a lagartas de *A. gemmatilis* (final 2º instar) provenientes do laboratório de criação massal da Embrapa Soja, criadas desde a eclosão em folhas de soja e em suas respectivas temperaturas. Quando as plantas atingiram o estágio V3, as lagartas foram pesadas e individualizadas e mantidas em gaiolas confeccionadas em malha perfurada, para que não houvesse interferência nos processos fisiológicos da planta. Essas gaiolas foram presas aos tubetes com o auxílio de um elástico. Quando houve necessidade, a planta foi substituída.

Ao atingirem estágio de pupa, estas foram pesadas 48 h após a transformação, sexadas e mantidas em copos plásticos com tampa, contendo algodão umedecido. Após a emergência, os adultos foram colocados em gaiolas de acrílico por 72h nas mesmas condições citadas para o experimento anterior. Os casais foram retirados aleatoriamente das gaiolas de acrílico e individualizados em gaiolas confeccionadas com de tubos de PVC com 20 cm de altura por 10 cm de diâmetro (MILANO, 2008), totalizando 15 casais por temperatura. Estas foram vedadas na extremidade superior por filme plástico e na inferior com tampa de gerbox, contendo algodão embebido em alimento. Para a oviposição e coleta dos ovos, a gaiola foi revestida internamente com papel tipo sulfite, retirado sempre em que foi observada a postura dos ovos, sendo estes levados ao laboratório e contados com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Os ovos foram mantidos em copos parafinados

com algodão umedecido e alimento até a eclosão e as lagartas atingirem 2º instar nas respectivas temperaturas, sendo estas utilizadas para a sequência das gerações. Os casais individualizados foram mantidos na mesma temperatura durante as quatro gerações, para a análise da longevidade dos adultos, número de ovos e continuidade das gerações. As gaiolas com os casais de adultos foram observadas diariamente, substituindo-se o alimento e anotando-se a mortalidade em cada repetição.

4.4.3 Identificação e Quantificação de Metabólitos Secundários em Plantas Cultivadas em Diferentes Temperaturas

4.4.3.1 Preparo das amostras para a extração de compostos

Nas condições experimentais citadas nos itens 4.4.1, foram cultivadas plantas para identificação e quantificação dos flavonóides. Como parâmetro de comparação também foram realizadas extrações de plantas cultivadas em casa de vegetação até o estágio V3. As amostras de folhas foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (-20 °C) adotando-se 10 repetições por tratamento. Para a extração, a segunda e a terceira folhas trifolioladas de cada planta foi moída no almofariz com nitrogênio líquido. A amostra obtida foi pesada, e para a extração dos compostos fenólicos foi adicionado 5 mL de etanol 80 % HCl (0,001 mmol) e levada ao banho de ultrassom por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 9.880 x g a 2 °C por 12 min, secas à vácuo, solubilizadas com metanol 80% (1,5 mL), filtradas em membrana Millipore® 0,45 µm e analisadas em HPLC.

4.4.3.2 Análises cromatográficas

Alíquotas de 10 µL do extrato metanólico foram injetadas em HPLC (Shimadzu, Prominence com controlador CBM-20A; detetor SPD-20A; degaseificador DGU 20A5; Bomba LC-20AT; auto sampler SIL-20A e forno CTO 20A) (Figura 4.2). As análises foram realizadas em coluna de fase reversa C18 (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5 micra). A fase móvel foi composta pelo solvente A composto de 2 % de ácido acético (HOAc) e, pelo solvente B composto de uma mistura de metanol, ácido acético e água (MeOH: HOAc:H₂O; 18:1:1). O sistema inicial do gradiente linear foi de 75% de A e 25% de B, atingindo aos 40 min., a situação inversa, ou seja, 25% de A e 75% de B. Aos 45 minutos, retornando à situação inicial, mantida por 5 min, antes da injeção da

próxima amostra. O fluxo do solvente foi de 1 mL/min e a absorção de UV foi medida a 260 nm e 280 nm.

Os padrões identificados foram rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$; quercitina 3-*O*-raminoglicosídeo), genistina ($C_{21}H_{20}O_{10}$; 4',5,7- hydroxyisoflavone-7glucoside) e sua aglicona genisteína, assim como das agliconas daidzeína, gliciteína, a fitoalexina gliceolina, além do ácido salicílico das marcas Sigma e Fujicco. Para a obtenção da curva de calibração de cada padrão, diferentes diluições de cada substância foram injetadas no HPLC sendo o tempo de retenção e as áreas anotadas. Com os valores das áreas das substâncias padrão e de suas respectivas concentrações, foi construído um gráfico de dispersão e obtido uma equação de regressão linear. Após injeção das amostras, o tempo, a área e o espectro foram comparados com os padrões e a concentração das substâncias expressas em micrograma por grama de tecido fresco.

Figura 4.2 – Imagem do equipamento do HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizado para identificação e quantificação de compostos secundários de extratos vegetais .



4.4.4 Análise Estatística

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 100 repetições. As variáveis respostas consideradas neste trabalho foram: mortalidade de lagartas (%), peso inicial de lagartas (mg), peso de pupa (mg), tempo de desenvolvimento (dias), longevidade dos adultos(dias), número de ovos, razão sexual, ganho de peso e crescimento. O

ganho de peso foi estimado através do ajuste de peso de pupa pela covariável peso inicial. O crescimento para os diferentes tratamentos foi obtido pelo ajuste do peso de pupa e pela covariável tempo de desenvolvimento. A mortalidade e a razão sexual foi comparada pelo teste de qui-quadrado (χ^2) ao nível de 5 % de probabilidade. As demais variáveis (peso inicial e de pupa, tempo de desenvolvimento) foram submetidas às análises exploratórias para avaliar as pressuposições de normalidade dos resíduos (SHAPIRO; WILK, 1965), a homogeneidade de variância dos tratamentos e a aditividade do modelo (BURR; FOSTER, 1972) para permitir a aplicação da ANOVA. As médias foram então comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2009). A ANCOVA (análise de covariância) foi utilizada para estimar o crescimento e ganho de peso, conforme proposto por Raubenheimer; Simpson (1992). A razão sexual foi calculada dividindo-se o número de fêmeas pelo total de indivíduos.

As análises estatísticas dos metabólitos secundários foram realizadas com o programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2008), utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, para a comparação das médias.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Influência da Temperatura nos Aspectos Biológicos de *A. gemmatalis*

Os aspectos biológicos de *A. gemmatalis* foram afetados pelas diferentes temperaturas. O teste de χ^2 indicou diferenças na porcentagem de mortalidade em função dos tratamentos (Tabela 4.1). As maiores mortalidades ocorreram nas temperaturas mais elevadas (28 °C, 31 °C e 34 °C). Na primeira geração a 34 °C a alta porcentagem de mortalidade, juntamente com a inviabilidade dos ovos, impossibilitou a continuidade das gerações. Resposta semelhante foi observada em insetos mantidos a 31 °C na segunda geração. Não foram observadas alterações na mortalidade ao longo das gerações.

Tabela 4.1 – Mortalidade (%) de *A. gemmatalis* criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas, por quatro gerações

| Geração | Temperatura | | | |
|----------------|-------------|------------|------------|---------|
| | 25 °C | 28 °C | 31 °C | 34 °C |
| F ₀ | 24,00 a C | 25,00 a BC | 29,00 a AB | 38,00 A |
| F ₁ | 26,00 a B | 22,00 a B | 41,00 a A | - |
| F ₂ | 27,00 a A | 23,00 a A | - | - |
| F ₃ | 22,00 a A | 29,00 a A | - | - |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem pelo teste χ^2 a 5% de significância.

– não houve sobreviventes.

O peso inicial, de pupa, duração da fase larval, de pré-pupa, de pupa e, conseqüentemente, o tempo de desenvolvimento total dos insetos foram influenciados pelas temperaturas. Na primeira geração os tratamentos 31 °C e 34 °C apresentaram os maiores pesos iniciais. No entanto, nestas temperaturas foram observados os menores pesos de pupa. O menor período de duração do tempo total de desenvolvimento foi observado em 34° C, seguido de 31° C (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Peso médio inicial (mg), peso de pupa (mg), fase larval, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média \pm EP) de *A. gemmatalis* criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas, na primeira geração

| 25°C | 28°C | 31°C | 34°C |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| Peso inicial (mg) | | | |
| 3,34 \pm 0,08 b | 3,02 \pm 0,05 c | 3,64 \pm 0,07 a | 3,69 \pm 0,08 a |
| Peso de pupa (mg) | | | |
| 217,40 \pm 5,43 a | 204,52 \pm 5,27 ab | 199,59 \pm 4,72 b | 197,88 \pm 4,39 b |
| Desenvolvimento fase larval (dias) | | | |
| 9,09 \pm 0,08 a | 8,06 \pm 0,03 b | 8,23 \pm 0,05 b | 6,49 \pm 0,11 c |
| Pré-pupa (dias) | | | |
| 2,00 \pm 0,00 a | 2,00 \pm 0,00 a | 1,20 \pm 0,05 b | 1,34 \pm 0,06 b |
| Pupa (dias) | | | |
| 8,86 \pm 0,09 a | 7,79 \pm 0,09 b | 8,60 \pm 0,10 a | 7,90 \pm 0,10 b |
| Tempo total de desenvolvimento (dias) | | | |
| 27,96 \pm 0,10 a | 25,85 \pm 0,10 b | 25,09 \pm 0,12 c | 21,74 \pm 0,13 d |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na geração F₁ insetos mantidos na temperatura de 31 °C apresentaram os maiores pesos iniciais, quando comparado as temperaturas de 25 °C e 28 °C. Os maiores

pesos de pupa foram observados em insetos mantidos a 25° C e 31° C. Menor período de duração das fases larval, pupal e total foram observados em 31° C e 28° C (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Peso médio inicial (mg), peso de pupa (mg), desenvolvimento da fase larval, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média ± EP) de *A. gemmatalis* criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas, por duas gerações (F₀ e F₁)

| | 25 °C | 28 °C | 31 °C |
|----|---------------------------------------|--------------------|-------------------|
| | Peso inicial (mg) | | |
| F0 | 3,34 ± 0,08 b B | 3,02 ± 0,05 b C | 3,64 ± 0,07 b A |
| F1 | 4,26 ± 0,06 a B | 4,16 ± 0,06 a B | 4,48 ± 0,06 a A |
| | Peso Pupa (mg) | | |
| F0 | 217,40 ± 5,43 b A | 204,52 ± 5,27 a AB | 199,59 ± 4,72 b B |
| F1 | 219,50 ± 5,01 b A | 195,30 ± 4,90 a B | 232,35 ± 4,31 a A |
| | Desenvolvimento da fase larval (dias) | | |
| F0 | 9,09 ± 0,08 a A | 8,06 ± 0,03 a B | 8,23 ± 0,05 a B |
| F1 | 8,46 ± 0,07 b A | 7,71 ± 0,06 b B | 6,91 ± 0,09 b C |
| | Pré - pupa (dias) | | |
| F0 | 2,00 ± 0,00 a A | 2,00 ± 0,00 a A | 1,20 ± 0,05 * |
| F1 | 1,74 ± 0,05 b A | 1,74 ± 0,05 b A | 1,00 ± 0,00 * |
| | Pupa (dias) | | |
| F0 | 8,86 ± 0,09 a A | 7,79 ± 0,09 b B | 8,60 ± 0,10 a A |
| F1 | 8,76 ± 0,06 a A | 7,95 ± 0,04 b B | 7,71 ± 0,09 b B |
| | Tempo total de desenvolvimento (dias) | | |
| F0 | 27,96 ± 0,10 a A | 25,85 ± 0,10 a B | 25,09 ± 0,12 a C |
| F1 | 26,97 ± 0,09 b A | 25,40 ± 0,10 b B | 21,64 ± 0,12 b C |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

*Para a variável pré- pupa na temperatura 31°C, não houve interação.

Redução no peso inicial ao longo das gerações (F₂ e F₃) foi observada em insetos mantidos a 25 °C, o que não influenciou em seu peso de pupa, os maiores pesos de pupa deste tratamento foram observados nessas gerações. Diferenças no tempo de desenvolvimento total puderam ser observadas ao longo das gerações, havendo uma redução em 25 °C (F₁, F₂ e F₃) (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Peso médio inicial (mg), peso de pupa (mg), fase larval, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média \pm EP) de *A. gemmatalis* criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas, por quatro gerações (F₀, F₁, F₂ e F₃)

| | 25 °C | 28 °C |
|---------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| Peso inicial (mg) | | |
| F ₀ | 3,34 \pm 0,08 b B | 3,02 \pm 0,05 c C |
| F ₁ | 4,26 \pm 0,06 a B | 4,16 \pm 0,06 a B |
| F ₂ | 2,79 \pm 0,04 c B | 3,37 \pm 0,06 b A |
| F ₃ | 2,67 \pm 0,04 c B | 4,19 \pm 0,08 a A |
| Peso Pupa (mg) | | |
| F ₀ | 217,40 \pm 5,43 b A | 204,52 \pm 5,27 a AB |
| F ₁ | 219,50 \pm 5,01 b A | 195,30 \pm 4,90 a B |
| F ₂ | 252,90 \pm 3,88 a A | 209,18 \pm 4,34 a B |
| F ₃ | 247,50 \pm 4,35 a A | 202,93 \pm 5,14 a B |
| Desenvolvimento da fase larval (dias) | | |
| F ₀ | 9,09 \pm 0,08 a A | 8,06 \pm 0,03 b B |
| F ₁ | 8,46 \pm 0,07 b A | 7,71 \pm 0,06 c B |
| F ₂ | 8,53 \pm 0,06 b A | 8,15 \pm 0,11 b B |
| F ₃ | 8,68 \pm 0,05 b B | 9,08 \pm 0,04 a A |
| Pré - pupa (dias) | | |
| F ₀ | 2,00 \pm 0,00 a A | 2,00 \pm 0,00 a A |
| F ₁ | 1,74 \pm 0,05 b A | 1,74 \pm 0,05 b A |
| F ₂ | 1,93 \pm 0,03 a A | 1,91 \pm 0,03 a A |
| F ₃ | 1,94 \pm 0,02 a A | 1,63 \pm 0,06 b B |
| Pupa (dias) | | |
| F ₀ | 8,86 \pm 0,09 a A | 7,79 \pm 0,09 b B |
| F ₁ | 8,76 \pm 0,06 a A | 7,95 \pm 0,04 b B |
| F ₂ | 8,44 \pm 0,06 b A | 7,83 \pm 0,05 b B |
| F ₃ | 8,37 \pm 0,06 b A | 8,55 \pm 0,07 a A |
| Tempo total de desenvolvimento (dias) | | |
| F ₀ | 27,96 \pm 0,10 a A | 25,85 \pm 0,10 b B |
| F ₁ | 26,97 \pm 0,09 b A | 25,40 \pm 0,10 c B |
| F ₂ | 26,90 \pm 0,06 b A | 25,88 \pm 0,11 b B |
| F ₃ | 26,99 \pm 0,09 b B | 27,26 \pm 0,09 a A |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A razão sexual não foi afetada pelos tratamentos: o teste de χ^2 , não indicou influência dos tratamentos e das gerações na razão sexual dos insetos (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Razão sexual de *A. gemmatalis* em quatro temperaturas e quatro gerações.

| Geração | Temperatura | | | | χ^2 |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|--------------------|
| | 25 °C | 28 °C | 31 °C | 34 °C | |
| F ₀ | 0,51 | 0,52 | 0,44 | 0,58 | 2,80 ^{ns} |
| F ₁ | 0,54 | 0,59 | 0,52 | – | 1,14 ^{ns} |
| F ₂ | 0,52 | 0,54 | – | – | 0,23 ^{ns} |
| F ₃ | 0,48 | 0,54 | – | – | 0,47 ^{ns} |
| χ^2 | 0,57 ^{ns} | 0,81 ^{ns} | 1,04 ^{ns} | | |

χ^2 a 5% de significância. ns- Não significativo – não houve sobreviventes

O número de ovos foi maior na temperatura mais baixa 25° C e menor na mais alta (34° C), na primeira geração. A menor quantidade de ovos foi observada em 34° C e 31° C em F₀ e F₁, respectivamente, o que inviabilizou a continuidade das gerações. As temperaturas de 25° C e 28° C, não diferiram estatisticamente com relação a essa variável em F₂ e F₃ (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Número médio de ovos, de *A. gemmatalis* em quatro temperaturas e quatro gerações.

| | 25 °C | 28 °C | 31 °C | 34 °C |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| | Número de ovos | | | |
| F ₀ | 552,53 ± 12,45 a A | 463,06 ± 12,39 b B | 457,07 ± 23,69 a B | 228,00 ± 20,27C |
| F ₁ | 569,47 ± 10,15 a A | 483,30 ± 8,93 b B | 312,65 ± 35,69 b C | – |
| F ₂ | 590,57 ± 16,05 a A | 586,00 ± 16,26 a A | – | – |
| F ₃ | 598,73 ± 10,92 a A | 595,87 ± 15,71 a A | – | – |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

- Não houve sobreviventes

Na primeira geração a temperatura de 25° C proporcionou uma maior longevidade das fêmeas, quando comparadas aquelas que se desenvolveram a 34° C. A longevidade dos machos não foi afetada pelas temperaturas (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 – Longevidade de machos e fêmeas de *A. gemmatalis* em quatro temperaturas, na primeira geração.

| | Longevidade de adultos (dias) | | | |
|----------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | 25 °C | 28 °C | 31 °C | 34 °C |
| | Fêmeas | | | |
| F ₀ | 12,28 ± 0,37 A | 11,57 ± 0,31 AB | 11,54 ± 0,24 AB | 10,50 ± 0,50 B |
| | Machos | | | |
| | 11,13 ± 0,39 A | 10,40 ± 0,41 A | 10,73 ± 0,43 A | 9,67 ± 0,56 A |

Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Ao avaliar a média geral da longevidade dos adultos criados nas temperaturas 25°C, 28° C e 31° C pode-se observar o efeito significativo do fator gerações para fêmeas e machos, onde o aumento da longevidade pode ser constatado com a avaliação de mais uma geração (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 – Longevidade média de fêmeas e machos de *A. gemmatalis*. Média geral das temperaturas (25° C, 28° C e 31° C) em duas gerações.

| Geração | Longevidade de adultos (dias) | |
|----------------|-------------------------------|----------------|
| | Fêmeas | Machos |
| F ₀ | 11,56 ± 0,22 b | 10,86 ± 0,21 b |
| F ₁ | 12,81 ± 0,23 a | 12,25 ± 0,18 a |

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Na longevidade dos machos, foi observada efeito das diferentes temperaturas. A maior longevidade foi observada em insetos mantidos a 31° C (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 – Longevidade de machos de *A. gemmatalis*, mantidos em 25° C, 28° C e 31° C. Média geral de duas gerações

| Temperatura | Longevidade dos Machos (dias) |
|-------------|-------------------------------|
| 25° C | 11,70 ± 0,24 ab |
| 28° C | 10,96 ± 0,26 b |
| 31° C | 12,03 ± 0,30 a |

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Na longevidade de fêmeas e machos em quatro gerações nas temperaturas 25° C e 28° C, não se observou efeito significativo da temperatura. No entanto foi observado

efeito das gerações. Os insetos mantidos nessas temperaturas apresentaram maior longevidade tanto de machos como das fêmeas no decorrer das gerações (Tabela 4.10).

Tabela 4.10 – Longevidade de fêmeas e machos (dias) de *A. gemmatalis*. Mantidas em 25° C e 28° C, média geral das duas temperaturas durante quatro gerações.

| Geração | Longevidade de adultos (dias) | |
|----------------|-------------------------------|----------------|
| | Fêmeas | Machos |
| F ₀ | 11,92 ± 0,25 b | 10,76 ± 0,28 c |
| F ₁ | 12,73 ± 0,27 b | 11,90 ± 0,17 b |
| F ₂ | 14,76 ± 0,26 a | 13,67 ± 0,31 a |
| F ₃ | 14,58 ± 0,23 a | 13,89 ± 0,28 a |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

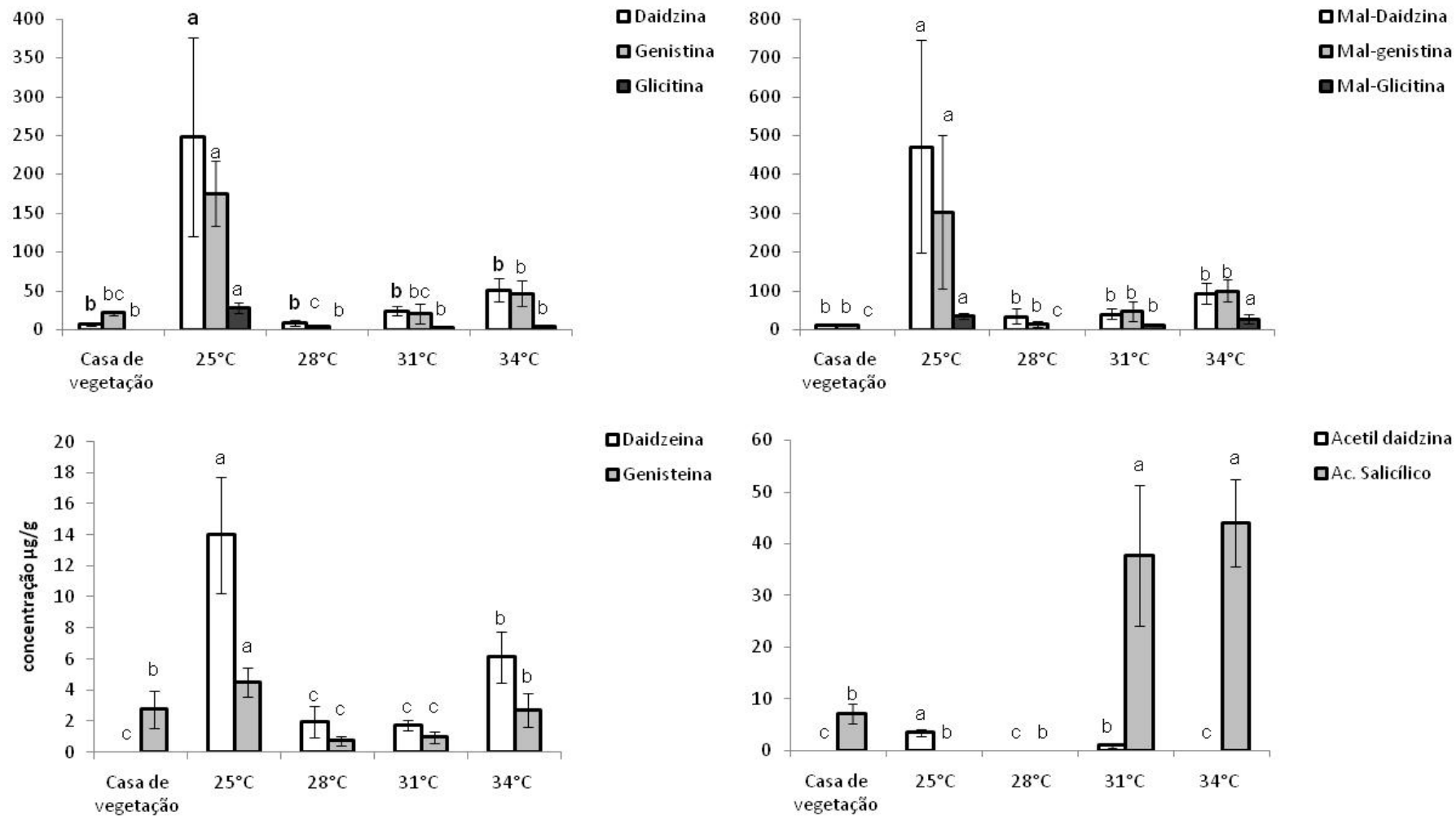
Não houve efeito interativo do peso inicial com o peso de pupa, tampouco do tempo de desenvolvimento e peso de pupa, na ANCOVA. Dessa forma, assumiu-se a validade dos dados obtidos pela ANOVA, sendo os valores expressos na média de cada fator.

4.5.2 Influência da Temperatura no Metabolismo Secundário de Plantas de Soja

Ao analisar as substâncias do metabolismo secundário presentes na cultivar de soja BRS 359 RR cultivadas em fitotron, foram identificados os seguintes compostos: as isoflavonas glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina), as malonís (daidzina, genistina e glicitina), as agliconas (daidzeína e genisteína) acetil daidzeína, e ácido salicílico. As substâncias daidzina, genistina, malonís (daidzina e genistina) e genisteína foram identificadas em todos os tratamentos (Figura 4.3). A maior concentração foi observada na temperatura 25 °C, quando comparado as demais temperaturas.

A aglicona daidzeína foi identificada em todos os tratamentos exceto em casa de vegetação. A maior concentração dessa substância foi observada em 25°C de plantas que se desenvolveram a 34°C. Pequena concentração de acetil daidzina foi identificada em plantas cultivadas as 25°C e 31°C, sendo esta maior a 25°C. O composto ácido salicílico não foi identificado em plantas cultivadas a 25°C e 28°C. Entretanto este fenólico foi observado em plantas cultivadas em temperaturas mais elevadas 31°C e 34°C.

Figura 4.3 – Concentração de compostos secundários em folhas de soja BRS 359RR no estágio V3 cultivadas em diferentes temperaturas (25 °C; 28 °C; 31 °C; 34 °C). Médias seguidas da mesma letra entre as temperaturas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



O pterocarpano gliceolina foi observado nos extratos de plantas cultivadas em casa de vegetação e submetidas a diferentes temperaturas (25° C, 28° C e 31°C). Maior ocorrência ocorreu em plantas cultivadas a 25°C (Tabela 4.11), onde esta fitoalexina foi observada em 50% das repetições. Em 28° C e 31°C esse composto foi identificado em até três repetições. Plantas submetidas a temperaturas mais elevadas 34°C, não foi identificada a presença desta substância.

Tabela 4.11 – Ocorrência de gliceolina em extratos de tecido foliar da cultivar BRS 359RR cultivadas em diferentes temperaturas, avaliada em dez repetições

| Tratamento | Ocorrência de Gliceolinas |
|-------------------|---------------------------|
| Casa de vegetação | + |
| 25° C | ++ |
| 28° C | + |
| 31° C | + |
| 34° C | - |

- ausência de gliceolina

+ ocorrência de gliceolina em duas a três repetições

++ ocorrência de gliceolina em cinco repetições

4.6 DISCUSSÃO

O aumento da temperatura afetou os parâmetros biológicos de *A. gemmatalis*, como já observado no capítulo anterior e por Silva et al. (2012). Insetos mantidos em temperaturas mais elevadas apresentaram maior mortalidade. Fato este, que pode estar relacionado aos efeitos deletérios de elevadas temperaturas sobre as macromoléculas e/ou membrana celular (ROTI ROTI, 1982; BOWLER 1987). As altas temperaturas tendem a matar as células através da desnaturação das proteínas, alterando a estrutura e propriedades da membrana e de enzimas, e também pela desidratação (CHAPMAN, 1998; GULLAN; CRANSTON, 2005). O efeito de elevadas temperaturas nos processos fisiológicos pode em alguns casos não causar alta mortalidade nos insetos, contudo pode afetar as condições normais de crescimento dos mesmos (NEVEN, 2000). O que pode ser observado a 31°C e 34°C, onde a deformidade dos adultos, a redução das posturas e a inviabilidade dos ovos impossibilitaram, nestes tratamentos, o estudo de quatro gerações.

De modo geral insetos submetidos a temperaturas elevadas apresentaram os maiores pesos iniciais e os menores pesos de pupa. O menor peso de pupa pode estar

relacionado à redução da atividade metabólica. Para a manutenção do equilíbrio térmico corporal, os insetos diminuem a atividade metabólica (WATERS; HARRISON, 2012) o que pode reduzir a assimilação nutricional do alimento, diminuindo assim o seu peso corpóreo.

A duração da fase larval, de pré-pupa, de pupa e desenvolvimento total de *A. gemmatalis* foi reduzida com o aumento da temperatura. Fato este, que corrobora com resultados obtidos em estudos realizados com a mesma espécie alimentada em dieta artificial e submetida a diferentes regimes térmicos (SILVA et al., 2012), e também em outras espécies de Lepidopteros: *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) (BAVARESCO et al., 2002) *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (BUSATO et al., 2005) e *Earias insulana* (Lepidoptera: Noctuidae) (KANDIL, 2013). Em geral o aumento da temperatura reduz exponencialmente o tempo de desenvolvimento em ectotérmicos (RATTE, 1985), o que sugere que a remoção de hormônio juvenil ou a secreção de ecdisona podem ser fortemente sensíveis à temperatura (DAVIDOWITZ et al., 2003).

O encurtamento do ciclo em insetos mantidos em altas temperaturas implica em custos metabólicos, que refletem no insucesso na fase de pupa e redução da eficiência de armazenamento de lipídios como observados em outra espécie de lepidoptero *Spodoptera exigua*, Lepidoptera:Noctuidae (LEE; ROH, 2010). Estudos sobre a relação da temperatura com aspectos bioquímicos de *Earias insulana* (Lepidoptera: Noctuidae), demonstraram que temperaturas elevadas (32°C e 37° C), reduzem a concentração total de proteínas, lipídeos, glicose e enzimas larvais o que pode causar inibição no metabolismo, bem como impactar negativamente a potencialidade reprodutiva (KANDIL, 2013), assim como outros aspectos biológicos.

Pupas com menor massa, como observado em temperaturas elevadas, originam adultos de tamanho inferior, e como essas variáveis têm sido intimamente relacionadas à fecundidade de insetos, estes possuem chances menores de produzir descendentes. Em ectotérmicos a temperatura é um fator abiótico extremamente importante na determinação do tamanho corporal (KLOK; HARINSSON; 2013). A relação entre o peso de pupa e fecundidade foi estudada em insetos da ordem Diptera (*Molophilus ater*), onde se observou um acréscimo na fecundidade em média 4-5 ovos com um aumento de 0,1 mg no peso de pupa (HADLEY, 1971). No presente estudo menor quantidade de ovos foi observada em insetos mantidos a 34°C, que também apresentaram menores pesos de pupas. Assim, sugere-se que a massa da pupa influenciou negativamente na fecundidade destes insetos. Além da biomassa da pupa, um outro fator que pode influenciar na reprodução e consequentemente na fecundidade dos insetos, são as repostas comportamentais a

temperaturas elevadas. Em temperaturas extremas (35° C), Milano et al. (2008) observou pouca movimentação de *A. gemmatalis* e alimentação constante, mesmo no período de escotofase, o que pode ser causado pela desidratação. Segundo o mesmo autor, adicionalmente a menor movimentação pode ter havido influência da temperatura na frequência de cópulas; fêmeas desenvolvidas nessas condições apresentaram menor número de espermátóforos e, conseqüentemente menor número de ovos. A reação dos insetos frente a extremos térmicos pode variar entre as espécies, provocando alterações no metabolismo dos mesmos e, por consequência no comportamento e reprodução (CHAPMAN, 1998).

No decorrer das gerações redução do número de ovos também foi observada em insetos submetidos a 31° C. Este resultado confirma os obtidos por Milano et al. (2008), em que adultos de *A. gemmatalis* mantidos a 30° C, apresentaram menor fecundidade, longevidade das fêmeas, e viabilidade dos ovos quando comparados a 25°C. Entretanto, o aumento da temperatura não afetou a razão sexual dos insetos, confirmando os dados obtidos por Silva et al. (2012).

Menor longevidade dos adultos foi observada em insetos mantidos a 34° C sem distinção de sexo. Não houve diferença na longevidade em insetos mantidos a 25° C, 28° C e 31° C. Em outros estudos sobre o efeito da temperatura no desenvolvimento dos insetos, indicaram que o período de sobrevivência dos insetos adultos é mais curto em temperaturas mais elevadas (BARI; LANGE 1980; MOSCARDI et al., 1981), como foi observado no presente trabalho.

Ao longo das gerações, redução do tempo total de desenvolvimento e maior longevidade dos adultos em 25°C, 28° C e 31° C e aumento do peso de pupa em 25° C e 31°C, puderam ser observados em *A. gemmatalis*, o que sugere uma adaptação dos insetos aos diferentes regimes térmicos adotados. Estes resultados diferem dos encontrados por Silva et al. (2012), onde ao avaliar a mesma espécie em diferentes regimes térmicos, não observaram redução desta variável ao longo das gerações. Os diferentes resultados obtidos para mesma espécie, podem estar associados ao emprego de metodologias diferenciadas, para este estudo empregou-se a oscilação térmica entre períodos diurnos e noturnos, enquanto no experimento citado acima utilizou-se a adoção de temperaturas constantes.

Nos extratos foliares de soja cultivadas sob diferentes temperaturas foram identificados os isoflavonóides: daidzina, genistina, glicitina, malonis (daidzina, genistina e glicitina), daidzeína e genisteína, acetil daidzina, a fitoalexina gliceolina, além do fitormônio ácido salicílico. Os isoflavonóides são reconhecidos por desempenhar uma grande variedade de funções como: precursores da produção de fitoalexinas (LOZOVAYA et al., 2007),

inibidores do ataque de patógenos (NAOUMKINA et al., 2007) e resistência de plantas a insetos (ZHOU et al., 2011).

Em geral, menor concentração de isoflavonoides foi observada com o aumento da temperatura. Vários trabalhos têm sido realizados para verificar a influência da temperatura na produção de flavonóides em sementes e vagens de soja. Redução significativa na concentração de isoflavonas nas sementes em maturação foi observada em elevadas temperaturas (TSUKAMOTO et al., 1995). O aumento da temperatura de 18 ° C para 23 ° C e 28° C durante o desenvolvimento da semente acarretou em decréscimo do conteúdo total de isoflavona em cerca de 65 % e 90 % respectivamente (CALDWELL; BRITZ; MIRECKI, 2005). Estresse de alta temperatura [33/25 ° C (temperaturas dia / noite)] imposta no final do período reprodutivo (R5 -R8) reduziu a concentração total de isoflavonas de 46-86 e 20-73 % em sementes e vagens, respectivamente (CHENNUPATI et al., 2012). No entanto, estudos sobre a resposta da produção de metabólitos secundários em folhas de soja sob elevadas temperaturas ainda são escassos.

No presente estudo maior concentração de isoflavonoides foi encontrada em folhas de plantas cultivadas a [25/21 ° C (temperaturas dia/noite)], limite inferior de temperatura adotado. Variações extremas da temperatura são desfavoráveis ao metabolismo das plantas, de maneira geral. Temperaturas amenas as tornam mais produtivas enquanto as temperaturas altas incidem negativamente sobre as vias metabólicas das plantas (SANGWAN, 2001). As baixas temperaturas têm influências significativas nos níveis de metabólitos secundários (GOBBO-NETO, LOPES, 2007). Correlação positiva foi identificada entre a intensidade e a duração do frio imposto a mudas de milho (*Zea mays*) e a abundância de antocianinas e mRNA para as enzimas chaves da via dos fenilpropanóides, tais como PAL (fenilalanina amônia-liase) e chalcona sintase (CHRISTIE; ALFENITO; WALBOT, 1994). Também demonstrado em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), um aumento de quatro a cinco vezes de compostos antioxidantes após submissão a baixas temperaturas (KOEPE et al., 1970)

Dentre os isoflavonóides destaca-se a daidzeína e seus conjugados, que são precursores de fitoalexinas, incluindo as gliceolinas (GRAHAM; KIM; GRAHAM, 1990; LOZOVAYA et al., 2007). As fitoalexinas são compostos produzidos pelas plantas em resposta ao ataque de patógenos e insetos, e estão intimamente relacionados à sua defesa (DUKA; ARDELEAN, 2010). Neste trabalho maior número de repetições onde foi constatada a ocorrência de gliceolinas foi observada em plantas cultivadas a 25°C, o que pode estar

relacionado a maior concentração de daidzeína e seus conjugados quantificados neste tratamento.

Em 34°C as plantas apresentaram uma alta concentração de ácido salicílico, substância que tem demonstrado grande importância em processos fisiológicos relacionados à adaptação dos vegetais, além de estar associada à resposta celular do tipo dano oxidativo, a diferentes fatores de estresse abiótico (BENEDICT; HATFIELD, 1988) O ácido salicílico também tem demonstrado capacidade de se acumular rapidamente em plantas atacadas por patógenos e insetos (KANNO et al., 2012), resultando na ativação da sinalização de defesa (HASEGAWA et al., 2010).

Grande parte dos compostos identificados neste trabalho tem sido testados e relacionados a resistência de plantas a insetos. Daidzeína aplicada em discos foliares afetou negativamente o crescimento e sobrevivência da larva do repolho, *Trichoplusia ni*, Lepidoptera:Noctuidae (SHARMA & NORRIS, 1991). Genisteína aplicada, seguindo o mesmo protocolo, em discos foliares, reduziu o consumo de *Heteronychus arator*, Coleoptera: scarabaeidae (SUTHERLAND et al., 1980). Os salicilatos também têm apresentado efeitos adversos sobre insetos, *Operophtera brumata*, (Lepidoptera: Geometridae) alimentados com folhas de *Salix myrsinifolia* com altos níveis de salicilato tiveram seu crescimento e consumo afetados negativamente (RUUHOLA et al., 2001). Entretanto neste estudo, insetos que foram mantidos no tratamento em que as plantas apresentaram maior concentração de metabólitos secundários, foram os que apresentaram menor mortalidade, maiores pesos de pupa e quantidade de ovos.

O melhor desempenho observado em insetos mantidos no tratamento com maior concentração de metabólitos secundários, pode estar relacionado a baixa toxicidade destes compostos, além da diferente forma de atuação destas substâncias conforme sua concentração e a espécie dos insetos. Comparados a muitas outras substâncias secundárias, os flavonóides não são especialmente tóxicos, e têm baixa atividade fisiológica em muitos insetos (HARBORNE; GRAYER, 1993).

Os isoflavonoides genisteína e daidzeína que tem sido reportados como substâncias importantes na defesa de plantas contra herbívoros, contudo não afetam a sobrevivência, crescimento ou fecundidade *Lymantria dispar* (Lepidoptera:Lymantriidae) (KAROWE; RADY, 2010). Dependendo da concentração e da espécie do inseto podem atuar de forma diferenciada, como por exemplo o flavonoide rutina que pode ser estimulante alimentar para o gafanhoto *Schistocerca americana* (Drury) (BERNAYS et al., 1991) e ou atuar negativamente na biologia de *A. gemmatilis* causando prolongamento no ciclo e alta

mortalidade (GAZZONI et al. 1997; HOFFMANN et al. 2006; SALVADOR et al., 2010). Além disso, flavonóides com estrutura relativamente parecidas, podem agir de forma diferente no mesmo inseto (HARBORNE; GRAYER, 1993), como no caso da rutina (quercitina 3-*O*-rutinosídeo) que funciona como estimulante alimentar para *Manduca sexta* (Lepidoptera:Sphingidae), enquanto a quercetina 3-rhamnosídeo que possui menor quantidade de açúcar em relação a rutina age como deterrente (BOER; HANSON, 1987).

Cultivares ou genótipos reconhecidos por sua característica de resistência a insetos como: IAC-100 e PI 227687, apresentam em sua composição química os flavonóides rutina (90 e 350 µg/g) e genistina (44 e 19 µg/g), respectivamente (SALVADOR, 2008). A rutina tem sido relatada por atuar de forma negativa na biologia de *A. gemmatalis* (GAZZONI et al. 1997; PIUBELLI et al., 2005; HOFFMANN et al. 2006; SALVADOR et al., 2010). Genistina de forma isolada quando adicionada a dieta artificial de *A. gemmatalis*, não causou efeitos deletérios ao ciclo biológico do inseto, no entanto impacto negativo acentuado, foi observado quando esta substância foi associada a rutina. O flavonoide rutina, não foi identificado na cultivar BRS 359 RR utilizada nesse trabalho, sendo este um dos fatores que podem estar também relacionados ao melhor desempenho dos insetos em plantas cuja maior concentração de metabólitos foi identificada.

A composição química da planta é variável e representa um desafio para a alimentação do inseto. No entanto, os insetos conseguiram suplantar essa barreira para que atingissem sucesso evolutivo. Para isto, desenvolveram estratégias de alimentação para superar as barreiras das plantas (PANDA; KHUSH, 1995; MELLO; SILVA-FILHO, 2002), estes possuem um conjunto de enzimas que constituem a sua defesa contra agentes tóxicos químicos (MELLO; SILVA-FILHO, 2002). Uma das estratégias para superar este problema é a detoxicação de produtos químicos por oxidação, redução, hidrólise ou conjugação de moléculas (SCOTT; WEN, 2001). Em insetos cuja alimentação se restringe a um número reduzido de hospedeiros, melhor adaptação aos compostos do metabolismo secundário pode ser observada. *A. gemmatalis*, apesar de possuir um amplo espectro de plantas hospedeiras, sua alimentação em hospedeiros não preferenciais é rara, ocasionada pela falta das plantas hospedeiras preferenciais ou a alguma deficiência nutricional dos hospedeiros preferenciais disponíveis (MOSCARDI et al., 2012), por isso nesta espécie, espera-se uma forma mais eficiente de adaptação aos fitoquímicos.

4.7 CONCLUSÃO

Temperaturas elevadas afetam negativamente o ciclo biológico de *Anticarsia gemmatalis*, como já constatado em estudos anteriores. Estas condições promovem nas plantas redução da concentração de metabólitos secundários. O melhor desempenho biológico de *A. gemmatalis* observado a 25° C e em plantas onde foi quantificada maior concentração de isoflavonóides, permite sugerir que as substâncias identificadas nos extratos foliares da cultivar utilizada nesse trabalho, não possuem alta toxicidade nesse inseto. Ainda, considerando-se a ampla distribuição dos isoflavonóides na cultura da soja e também o fato da cultivar utilizada não possuir característica de resistência a insetos, aliado a temperatura de 25° C que é considerada ideal ao desenvolvimento do inseto, são fatores que podem ter colaborado para uma resposta mais eficiente dos insetos a este tratamento.

5 ARTIGO C: EFEITO DA TEMPERATURA E ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE CO₂ SOBRE ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* E METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO DE PLANTAS DE SOJA

5.1 RESUMO

Alterações da temperatura atmosférica em consequência do aumento de CO₂ podem modificar o grau de infestação e a distribuição dos artrópodes pragas nos agrossistemas, além de modificar a constituição de metabólitos primários e secundários das plantas. Neste estudo avaliou-se o efeito de quatro temperaturas (25°C, 28°C, 31°C e 34°C) e elevada concentração de CO₂ (456 ppm) sobre a biologia de *Anticarsia gemmatalis* e o efeito destas condições na concentração dos flavonóides, carbono (C), nitrogênio (N), na relação C:N e açúcares totais em folhas de soja. Lagartas de final 2^o ínstar, criadas desde a eclosão na cultivar BRS 359RR em suas respectivas temperaturas, foram pesadas, individualizadas e avaliadas diariamente, observando-se a mortalidade, tempo de desenvolvimento, razão sexual, número de ovos e longevidade dos adultos. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado. Para a identificação e quantificação de metabólitos secundários, açúcares, C, N e C:N as plantas foram cultivadas em câmaras de crescimento nas respectivas temperaturas até o estágio V3. As amostras para a identificação dos compostos fenólicos foram analisadas por cromatografia líquida. Os açúcares totais foram determinados pelo método espectrofotométrico do fenol sulfúrico, e o percentual de C, N e C:N foram avaliados por cromatografia gasosa. Maior mortalidade foi observada em insetos submetidos a 34°C. O peso de pupa sofreu influência das temperaturas, sendo maiores a 28°C. Maior quantidade de ovos foi verificada a 28°C e decresceu com o aumento da temperatura. A razão sexual não foi influenciada pelas temperaturas. Maior concentração de isoflavonoides foi encontrada em plantas cultivadas a 25°C (456 ppm). Elevadas temperaturas afetam a biologia de *A. gemmatalis*, causando maior mortalidade, redução da longevidade e número de ovos. Plantas de soja submetidas a maiores temperaturas e concentrações de CO₂, apresentaram redução de substâncias do metabolismo secundário, no percentual de nitrogênio e aumento da concentração de açúcares totais aumentando o que possivelmente pode aumentar a suscetibilidade das plantas a insetos.

Palavras-chave: Mudanças climáticas. Temperatura. Flavonóides. Açúcares totais

TEMPERATURE AND CO₂ HIGH CONCENTRATION EFFECTS ON BIOLOGICAL ASPECTS OF *ANTICARSIA GEMMATALIS* AND ON PRIMARY AND SECONDARY METABOLISM OF SOYBEAN PLANTS

5.2 ABSTRACT

Changes in atmospheric temperature as a consequence of CO₂ increasing may alter the infestation degree and distribution of arthropod pests in agricultural systems, in addition to modifying the primary and secondary plant metabolites profile. This study evaluated the effect of four temperatures (25°C, 28°C, 31°C and 34°C) and high CO₂ concentration (456

ppm) on *Anticarsia gemmatalis*'s biology and the effect of these conditions on the flavonoids composition profile, carbon (C), nitrogen (N), total sugars and the C:N ratio in soybean leaves. Worms on 2nd final instars', reared from hatching on BRS 359RR at the respective temperatures were weighed separately and evaluated daily, observing the mortality, development time, sex ratio, number of eggs and adult longevity. The experimental design was completely randomized. For identification and quantification of secondary metabolites, sugars, C, N and C:N ratio, plants were grown in a growth chamber at respective temperatures until V3 stage. Samples for phenolic compounds identification were analyzed by liquid chromatography. Total sugars were determined by phenol sulfuric spectrophotometric method, and the percentage of C, N and C:N ratio were determined by gas chromatography. Higher mortality was observed in insects subjected to 34°C. Pupal weight was influenced by temperature, being highest at 28°C. More eggs were observed at 28°C and decreased with increasing temperature. The sex ratio was not influenced by temperature. Higher concentrations of isoflavones were found in plants grown at 25°C (456 ppm). Elevated temperatures and CO₂ concentrations affect *A. gemmatalis* biology causing mortality increasing; longevity and number of eggs reduction. Soybean plants subjected to higher temperatures and CO₂ concentrations showed reduction of secondary metabolism substances, on nitrogen content and increased total sugars concentration, suggesting in this case what possibly is related to a higher susceptibility of plants to insects.

Keywords: Climate change. Temperature. Flavonoids. Total sugars.

5.3 INTRODUÇÃO

A agricultura é extremamente vulnerável às alterações climáticas (EITZINGER et al., 2010; GORNALL et al., 2010). A mudança na concentração de gases de efeito estufa (GEEs), segundo o quarto relatório do IPCC poderá desencadear um aumento na temperatura média global entre 1,4 a 5,8 °C nos próximos cem anos (CHRISTENSEN et al., 2007). Um dos principais GEEs é o dióxido de carbono (CO₂), que no último século aumentou sua concentração em 20% (LONG; ORT, 2002). Temperaturas mais elevadas, esperadas em consequência de alterações do CO₂ atmosférico, podem reduzir a produtividade das culturas, por oferecer ambiente mais propício ao desenvolvimento de algumas espécies de plantas daninhas e pragas (NELSON, 2009). A frequência e a magnitude de secas podem ser intensificadas nas próximas décadas (CHRISTENSEN et al., 2007), o que pode desencadear o déficit hídrico nas plantas provocando alterações morfológicas, fisiológicas e químicas, influenciando na atratividade e suscetibilidade a insetos fitófagos e herbívoros (HUBERTY; DENNO, 2004; GUTBRODT et al., 2012).

Por outro lado, níveis elevados de CO₂ em geral podem aumentar a produtividade das plantas (LONG et al., 2004). Estimativas sugerem que o aumento da concentração de CO₂ atmosférico do nível atual de 395,97 ppm (CONWAY; TANS, 2013) para 550 ppm, poderia aumentar em 40 % a fotossíntese nas culturas C3 (LONG et al., 2004.),

porém pode também impactar indiretamente nas culturas através dos efeitos sobre pragas e doenças (GORNALL et al., 2010). Estudos sugerem que algumas pragas respondem positivamente às concentrações de CO₂ elevadas (NEWMAN, 2004; SUDDERTH et al., 2005; STALEY; JOHNSON, 2008). O ganho de produtividade obtido pode ser suprimido devido a alterações no metabolismo primário e secundário das plantas, modificando a sua interação com as pragas. Plantas que crescem sob condições de CO₂ elevados variam sua suscetibilidade a insetos, e algumas destas variações podem ser uma resposta indireta ao aumento da temperatura (ZAVALA et al., 2013).

O crescimento e o desenvolvimento das plantas depende de um fluxo contínuo de sais minerais para a realização de importantes funções metabólicas da célula. Alterações no clima podem afetar o metabolismo primário das plantas, modificando a relação de elementos que são essenciais, como o carbono (C) e o nitrogênio (N). Elemento essencial pode ser definido como um componente intrínseco na estrutura ou metabolismo de uma planta, cuja ausência causa anormalidades severas no crescimento, desenvolvimento e reprodução vegetal (EPSTEIN; BLOOM, 2005).

O carbono é um importante constituinte das plantas, junto ao hidrogênio e oxigênio representa aproximadamente 90 % de sua matéria seca (TANAKA, 1992). O nitrogênio está presente na composição das mais importantes biomoléculas presentes nas plantas, tais como: ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas (MIFLIN; LEA, 1976; HARPER, 1994; TAIZ; ZEIGER, 2009). Em muitos sistemas de produção, a disponibilidade de nitrogênio é quase sempre um fator limitante, influenciando o crescimento da planta mais do que qualquer outro nutriente (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

A qualidade da folha como uma fonte de alimento para os insetos depende da concentração de metabólitos primários especialmente N, o que muitas vezes limita o crescimento de insetos imaturos (DELUCIA et al., 2012). Taxas elevadas de assimilação de C em altas concentrações de CO₂ tem um efeito de diluição do N, promovendo o aumento da relação C:N no tecido das plantas (RIKONEN et al., 2005; ZAVALA et al., 2013).

Condições elevadas de CO₂ como mencionado anteriormente estimulam a fotossíntese, maior eficiência neste processo pode resultar em um aumento da concentração do total de carboidratos e açúcares nas plantas cultivadas (AINSWORTH et al., 2002). As alterações da relação C:N e o aumento no teor de C, carboidratos e açúcares nas plantas podem modificar os padrões de herbivoria em insetos (ZAVALA et al., 2013). Os insetos quando confrontados com desequilíbrios nutricionais, podem alterar o comportamento alimentar, o que pode promover uma alimentação compensatória (SCHADLER et al., 2007)

Como as mudanças climáticas são uma realidade, a crescente emissão de CO₂, e consequente elevação da temperatura, juntamente com a necessidade do controle de pragas para a manutenção da produtividade agrícola, reforçam a necessidade de estudos para compreender as respostas às alterações antropogênicas no metabolismo da planta e o seu efeito na comunidade de artrópodes herbívoros da soja. Os estudos anteriores subsidiaram informações sobre o efeito da temperatura na biologia de *A. gemmatalis* e no metabolismo secundário de plantas de soja, no entanto, informações sobre o efeito interativo de elevadas temperaturas e CO₂, na biologia do inseto, metabolismo primário e secundário de plantas de soja, ainda não foram esclarecidos. Desta forma, este trabalho teve por objetivo, avaliar aspectos biológicos de *A. gemmatalis* sob diferentes temperaturas e elevada concentração de CO₂, assim como as respostas da soja a esses fatores, com relação ao seu metabolismo primário (açúcares e relação C:N) e no seu metabolismo de defesa.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Aspectos Biológicos de *Anticarsia gemmatalis* em Fitotron com Elevadas Concentrações de CO₂

As plantas oferecidas aos insetos da cultivar BRS 359RR (AL-83-RS x BRS 262) foram cultivadas em fitotron com injeção de CO₂ na concentração de 456 ppm (concentração 20% mais elevada do que a atual), nas respectivas temperaturas (25 °C, 28 °C, 31 °C e 34 °C) com fotoperíodo de 14:10 h. (L:E) umidade relativa de aproximadamente 60 % e radiação fotossinteticamente ativa de 440 μmol m⁻² s⁻¹. Semeadas em tubetes com terra esterelizadada, adotando-se no plantio três sementes, deixando após o desbaste apenas uma planta por tubete. As plantas foram irrigadas diariamente e uma vez por semana receberam uma aplicação de solução nutritiva (BROUGHTON; DILWORTH, 1970) e 1 mL de solução de nitrato de amônio (40 g/L). Para garantir alimento, em todo o desenvolvimento da lagarta, foram realizados dois plantios de forma escalonada, totalizando 200 tubetes por temperatura.

Quando as plantas atingiram o estágio V3, lagartas de *A. gemmatalis* (final de 2º instar) provenientes do laboratório de criação massal da Embrapa Soja, criadas desde a eclosão em folhas de soja e em suas respectivas temperaturas, foram pesadas e individualizadas em gaiolas confeccionadas em malha perfurada, para não haver interferência nos processos fisiológicos da planta. Estas gaiolas foram presas aos tubetes com o auxílio de um elástico. Quando houve necessidade, a planta foi substituída.

Após atingirem estágio de pupa, estas foram separadas por sexo, mantidas em copos plásticos com tampa contendo algodão umedecido para garantir a umidade necessária ao seu desenvolvimento. O peso de pupa foi avaliado 48 h após a transformação. Logo após a emergência, os adultos foram colocados em gaiolas de acrílico nas dimensões 34 cm x 34 cm x 47 cm (MAGRINI et al., 1996) para abertura das asas e realização do voo nupcial, estas foram forradas com papel toalha, contendo recipiente com alimento (10 g de mel, 60 g de açúcar, 1 g de ácido sórbico, 1 g de metil parabeno dissolvidos em um litro de água destilada) e cerveja. Em todo o preparo da dieta do adulto foi retirada uma alíquota da solução estoque 300 mL e realizada a sua diluição em 200 mL de cerveja.

Para manter a luminosidade mínima necessária para o acasalamento do inseto, durante o período de escotofase, lâmpadas de 40 watts foram mantidas acesas (HOFFMANN-CAMPO et al., 1985; MAGRINI, 1993). Após 72 h, os casais foram retirados aleatoriamente das gaiolas de acrílico e individualizados em gaiolas confeccionadas com de tubos de PVC com 20 cm de altura por 10 cm de diâmetro (MILANO, 2008), totalizando 15 casais por temperatura, exceto na temperatura de 34°C, onde o número reduzido de insetos impossibilitou a formação deste número de casais. Estas foram vedadas na extremidade superior por filme plástico e na inferior com tampa de gerbox, contendo algodão embebido em alimento. Para a oviposição e coleta dos ovos, a gaiola foi revestida internamente com papel tipo sulfite, retirado sempre em que foi observada a postura dos ovos, sendo estes levados ao laboratório e contados com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 100 repetições. As variáveis respostas consideradas neste trabalho foram: mortalidade de lagartas (%), peso inicial de lagartas (mg), peso de pupa (mg), longevidade dos adultos(dias), número de ovos e razão sexual.

5.4.2 Identificação e Quantificação de Metabólitos Secundários em Plantas Cultivadas em Diferentes Temperaturas e em Elevadas Concentrações de CO₂

5.4.2.1 Cultivo das plantas e preparo das amostras para a extração de compostos

Para identificação e quantificação dos flavonoides, plantas foram cultivadas na condição citada no item 5.4.1. e como testemunha foram utilizadas plantas cultivadas em câmaras com as mesmas condições de luminosidade, temperatura e umidade sem a injeção de CO₂ (concentração natural do local, aproximadamente 380 ppm). As amostras foliares (10

repetições por tratamento), foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (-20 °C). Para a extração, a segunda e a terceira folha trifoliolada de cada planta foi moída no almofariz com nitrogênio líquido. A amostra obtida foi pesada e, para a extração dos compostos fenólicos, foi adicionado 5 mL de etanol 80 % HCl (0,001 mmol) e levada ao banho de ultrassom por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 9.880 x g a 2 °C por 12 min, secas à vácuo, solubilizadas com metanol 80% (1,5 mL), filtradas em membrana Millipore® 0,45 µm e analisadas em HPLC.

5.4.2.2 Análises cromatográficas

Aliquotas de 10 µL do extrato metanólico foram injetadas em HPLC (Shimadzu, Prominence com controlador CBM-20A; detetor SPD-20A; degaseificador DGU 20A5; Bomba LC-20AT; auto sampler SIL-20A e forno CTO 20A). As análises foram realizadas em coluna de fase reversa C18 (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5 micra). A fase móvel foi composta pelo solvente A composto de 2 % de ácido acético (HOAc) e pelo solvente B composto de uma mistura de metanol, ácido acético e água (MeOH: HOAc:H₂O; 18:1:1). O sistema inicial do gradiente linear foi de 75% de A e 25% de B, atingindo aos 40 min. A situação inversa, ou seja, 25% de A e 75% de B. Aos 45 minutos, voltou à situação inicial, permanece nela por 5 min, antes da injeção da próxima amostra, para voltar à condição inicial. O fluxo do solvente foi de 1 mL/min e a absorção de UV foi medida a 260 nm e 280 nm.

Os padrões de flavonoides identificados foram rutina (C₂₇H₃₀O₁₆; quercitina 3-*O*-raminoglicosídeo), genistina (C₂₁H₂₀O₁₀; 4',5,7- thydroxyisoflavone-7glucoside) e sua aglicona genisteína, assim como das agliconas daidzeína e gliciteína, além do ácido salicílico das marcas Sigma e Fujicco. Para a obtenção da curva de calibração de cada padrão, diferentes diluições de cada substância foram injetadas no HPLC e o de tempo retenção e áreas anotadas. Com os valores das áreas das substâncias padrão e de suas respectivas concentrações, foi construído um gráfico de dispersão e obtido uma equação de regressão linear. Após injeção das amostras, o tempo, a área e o espectro foram comparados com os padrões e a concentração das substâncias expressas em micrograma por grama de tecido fresco.

5.4.3 Quantificação de Metabólitos Primários (Carbono (C), Nitrogênio (N) e Açúcares) em Plantas Cultivadas em Diferentes Temperaturas e em Elevadas Concentrações de CO₂

5.4.3.1 Cultivo das plantas e preparo das amostras para a análise da relação C:N e extração de açúcares

As plantas da cultivar BRS 359RR foram semeadas em fitotron, nas respectivas temperaturas (25 °C, 28 °C, 31 °C e 34 °C), adotando-se as mesmas condições do tópico 5.4.1.. Para a análise da relação C:N e da concentração de açúcares totais foram coletadas 15 amostras, sendo que cada amostra consistiu da coleta de quatro plantas em estágio V3, essas plantas foram secas por 72 horas, e moídas em moedor de café Cadence[®]. Como parâmetro de comparação também foi realizada a análise de C, N, C:N e açúcares totais em plantas cultivadas em casa de vegetação.

As concentrações de C, N e a relação C:N foram determinadas por cromatografia gasosa através do equipamento Flah 2000 (Organic Elemental Analyzer). Foram pesadas 10 mg da amostra e armazenadas dentro de envelopes confeccionados com papel alumínio, estes foram colocados no equipamento, composto de dois fornos (1000 °C e 650 °C), onde ocorreu a queima do material, liberando assim os gases analisados, óxido nítrico e dióxido de carbono.

Para a análise de açúcares totais foram pesadas 500 mg da amostra, transferidas para um elermeyer de 250 mL, onde foi adicionado 20 mL de etanol 80 %. A mistura da amostra e a solução etanólica foi submetida a agitação constante a 80 °C em banho maria durante uma hora. Após o período de extração a quente, a mistura foi transferida para tubos de 50 mL e centrifugados durante 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi retirado, transferido para um becker, onde foi adicionado 5 mL de acetato de chumbo a 10 % e 0,3 g de carbonato de sódio. A solução foi homogeneizada, com um bastão de vidro e centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Após esse processo, a solução foi filtrada em papel filtro Whatman n° 2 e armazenada em balão volumétrico de 25 mL, sendo a solução completada com etanol 80% e homogeneizada. Para determinação espectrofotométrica do teor de açúcares, uma alíquota do extrato foi retirado e diluído na proporção de 1:10.

Os açúcares foram determinados pela técnica de Dubois (1956) através do método espectrofotométrico do fenol sulfúrico, utilizando-se 0,5 mL da amostra diluída, adicionando a mesma proporção de água destilada, 1 mL de solução Fenol 5 % e 5 mL de

ácido sulfúrico. Após 30 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 490 nm, sendo que para cada repetição a leitura realizada em duplicata. Para determinação da concentração total dos açúcares na solução extraída da amostra, foi construída uma curva padrão com as seguintes concentrações de glicose (0, 20, 40, 60 e 80 µg). A glicose utilizada para a construção da curva foi a glicose anidra P.A. da marca Wako, seca em estufa a 105 °C durante 30 minutos, antes de preparar a solução padrão.

5.4.4 Análise Estatística

A mortalidade e a razão sexual foram comparadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2) ao nível de 5 % de probabilidade. As demais variáveis (peso inicial e de pupa, tempo de desenvolvimento) foram submetidas às análises exploratórias para avaliar as pressuposições de normalidade dos resíduos (SHAPIRO; WILK, 1965), a homogeneidade de variância dos tratamentos e a aditividade do modelo (BURR; FOSTER, 1972) para permitir a aplicação da ANOVA. As médias foram então comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2009). A ANCOVA (análise de covariância) foi utilizada para estimar o crescimento e ganho de peso, conforme proposto por Raubenheimer; Simpson (1992). A razão sexual foi calculada dividindo-se o número de fêmeas pelo total de indivíduos.

A concentração dos flavonoides, teor de C, N, a relação C:N e açúcares totais foram submetidas análise de variância e testes de médias de Tukey ao nível de 5 % utilizando-se o realizadas com o programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2008).

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Aspéctos Biológicos de *A. gemmatalis* em Diferentes Temperaturas e Alta Concentração de CO₂

Diferença na mortalidade dos insetos foi observada apenas na temperatura 34°C, como indicado pelo teste de χ^2 , o mesmo teste, indicou ainda que não houve influência dos tratamentos na razão sexual dos insetos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Mortalidade (%) e razão sexual de *A. gemmatalis* criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas (25°C, 28°C, 31° C e 34° C) e a 456ppm de CO₂.

| Tratamento | Mortalidade (%) | Razão sexual |
|------------|-----------------|--------------------|
| 25 °C | 51,00 a | 0,65 |
| 28 °C | 59,00 a | 0,44 |
| 31 °C | 52,00 a | 0,46 |
| 34 °C | 66,00 b | 0,59 |
| χ^2 | 13,49** | 6,24 ^{ns} |

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem pelo teste χ^2 a 5% de significância.

Ns - não significativo.

Os parâmetros biológicos peso inicial, duração da fase larval e de pupa, assim como o tempo de desenvolvimento total de *A. gemmatalis*, foram afetados tanto pelas temperaturas (Tabela 5.2). Lagartas mantidas em 25° C apresentaram o maior peso inicial e o menor peso inicial foi observado nos tratamentos 28° C e 34°. Contudo, o menor peso inicial das lagartas criadas em 28°C não influenciou em seu peso de pupa, sendo o maior peso de pupa observado neste tratamento, seguido de 25°C e 31°C. O menor peso de pupa foi observado em 34° C. O maior tempo de desenvolvimento larval foi observado em 25° C seguido de 31° C, os tratamentos 28°C e 34° C apresentaram o menor tempo de desenvolvimento nesta fase. A duração da fase de pupa e tempo de desenvolvimento total dos insetos foi inversamente proporcional ao aumento da temperatura, sendo a menor duração observada em 31° C e 34° C.

Tabela 5.2 – Peso inicial (mg), peso de pupa (mg), tempo de desenvolvimento em cada ínstar, pré-pupa, pupa e tempo total de desenvolvimento em dias (média ± EP) de *A. gemmatalis* criadas em folhas de soja submetidas a diferentes temperaturas e a 456 ppm de CO₂ em uma geração.

| Tratamento | Peso inicial (mg) | Peso de pupa (mg) | Tempo de desenvolvimento larval (dias) | Pupa (dias) | Tempo total de desenvolvimento (dias) |
|------------|-------------------|--------------------|--|---------------|---------------------------------------|
| 25° C | 4,11 ± 0,10 b | 204,10 ± 6,15 b | 9,74 ± 0,13 a | 9,51 ± 0,12 b | 29,25 ± 0,18 a |
| 28° C | 3,05 ± 0,04 c | 231,68 ± 3,99 a | 8,38 ± 0,06 c | 9,94 ± 0,10 a | 27,33 ± 0,14 b |
| 31° C | 4,77 ± 0,09 a | 197,30 ± 5,27 b | 9,13 ± 0,07 b | 7,21 ± 0,13 c | 24,55 ± 0,19 c |
| 34° C | 2,82 ± 0,06 c | 168,33 ± 5,90 c | 7,35 ± 0,12 d | 5,29 ± 0,08 d | 19,64 ± 0,16 d |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As temperaturas influenciaram no número de ovos pelos insetos. Insetos mantidos a 28° C produziram maior quantidade de ovos, o menor número de ovos foi observado em 34° C (Tabela 5.3). Como não foi possível a individualização e formação dos casais em 34° C devido ao número reduzido de indivíduos e alta mortalidade dos machos para este tratamento após o período de voo nupcial e acasalamento, foi avaliado apenas a longevidade das fêmeas, a qual foi comparada com as demais temperaturas adotadas. Para esta variável pode-se observar que as temperaturas mais elevadas (31° C e 34°C) reduziram a longevidade das fêmeas. Maior longevidade foi observada a 28° C seguida de insetos mantidos a 25°C.

Tabela 5.3 – Número de ovos, de *A. gemmatalis* submetidas a diferentes temperaturas e a 456 ppm de CO₂.

| Tratamento | Número de ovos | Longevidade das fêmeas (dias) |
|------------|------------------|-------------------------------|
| 25° C | 632,86 ± 68,63 b | 11,06 ± 0,35 b |
| 28° C | 914,69 ± 46,15 a | 18,35 ± 0,26 a |
| 31° C | 416,06 ± 59,82 b | 9,28 ± 0,54 c |
| 34° C | 144,50 ± 42,95 c | 8,87 ± 0,63 c |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A análise de covariância indicou não haver efeito interativo entre os tratamentos e a covariável peso inicial e tempo de desenvolvimento larval. No ajuste do peso de pupa pela covariável peso inicial, observou-se apenas o efeito dos tratamentos, validando as médias obtidas na análise de variância (Tabela 5.4a). Para o ajuste do peso de pupa pela covariável tempo de desenvolvimento larval verificou-se efeito significativo da covariável (Tabela 5.4c), sendo essa relação representada pelo modelo de linhas paralelas (Fig. 5.1).

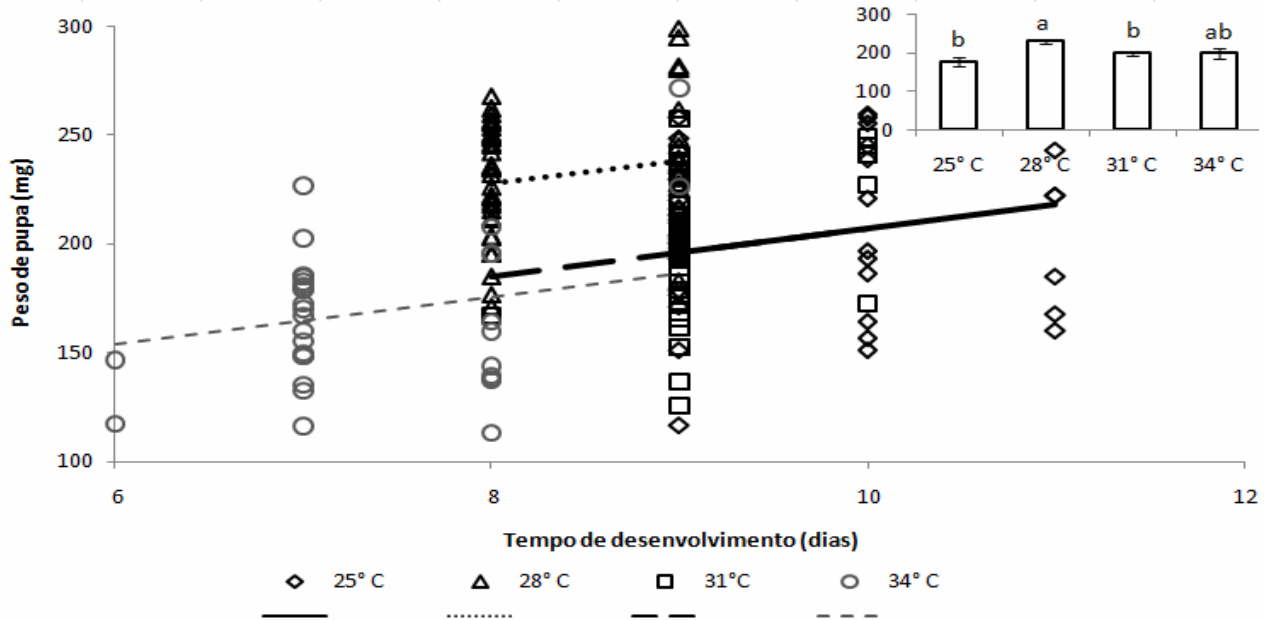
Tabela 5.4 – Análise de covariância (ANCOVA) para verificar o efeito dos diferentes tratamentos no ajuste de peso de pupa pelas covariáveis peso inicial (a, b), e tempo de desenvolvimento larval (c, d) 25°C, 28°C, 31°C e 34° em uma geração: de *A. gemmatalis*.

| Variação | GL | Peso de pupa (Valor de F) |
|---|----|------------------------------|
| F₀ | | |
| (a) Peso inicial (covariável) | 1 | 3,40 ^{NS} |
| Tratamento | 3 | 4,36* |
| Peso inicial x Tratamento | 3 | 2,22 ^{NS} |
| Resíduo | 16 | - |
| (b) Tratamento | 3 | 27,81*** |
| Peso inicial | 1 | 3,32 ^{NS} |
| Resíduo | 16 | - |
| (c) Tempo de desenvolvimento (covariável) | 1 | 12,08** |
| Tratamento | 3 | 2,05 ^{NS} |
| Tempo de desenvolvimento x Tratamento | 3 | 2,46 ^{NS} |
| Resíduo | 16 | - |
| (d) Tratamento | 3 | 11,11*** |
| Tempo de desenvolvimento | 1 | 11,76** |
| Resíduo | 16 | - |

*p<0,05, **p< 0,01, *** p< 0,001, ns- não significativo

O efeito principal dos tratamentos e da covariável, embora não-interativo, foi significativo, no crescimento dos insetos (peso de pupa ajustado pelo tempo de desenvolvimento larval). A Figura 5.1 demonstra que o alongamento no tempo de alimentação das lagartas (covariável) não proporcionou aumento nos pesos de pupas em 25° C e 31° C. A média dos quadrados mínimos (gráfico inserido na Figura 5.1) indica que insetos mantidos a 28° C, apresentaram uma melhor relação do peso de pupa com o tempo de desenvolvimento.

Figura 5.1 – Relação entre peso de pupa (mg) e tempo de desenvolvimento (dias) de *A. gemmatilis* criadas e alimentadas com plantas de soja BRS 359RR cultivadas em diferentes temperaturas (25° C, 28° C, 31° C e 34° C) e em elevada concentração de CO₂ (456ppm).

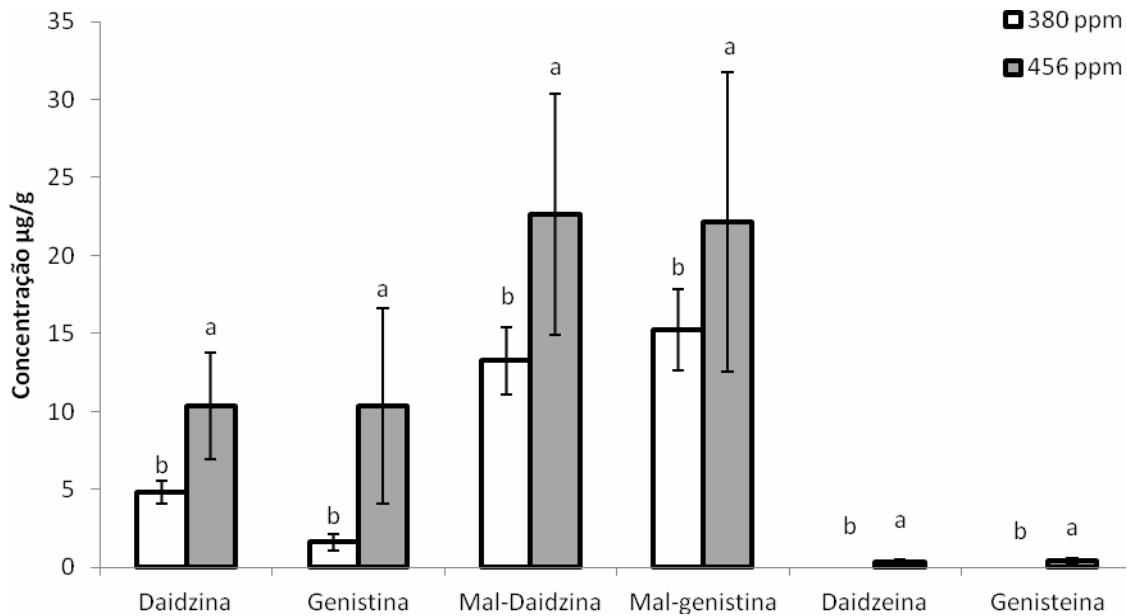


5.5.2 Influência de Diferentes Temperaturas e Alta Concentração de CO₂ no Metabolismo Secundário de Plantas de Soja

Nos extratos foliares de soja BRS 359 RR submetidas a diferentes temperaturas e concentrações de CO₂, foram identificados os seguintes isoflavonoides: daidzina, daidzeína, genistina, genisteína, e as malonís (daidizina, genistina).

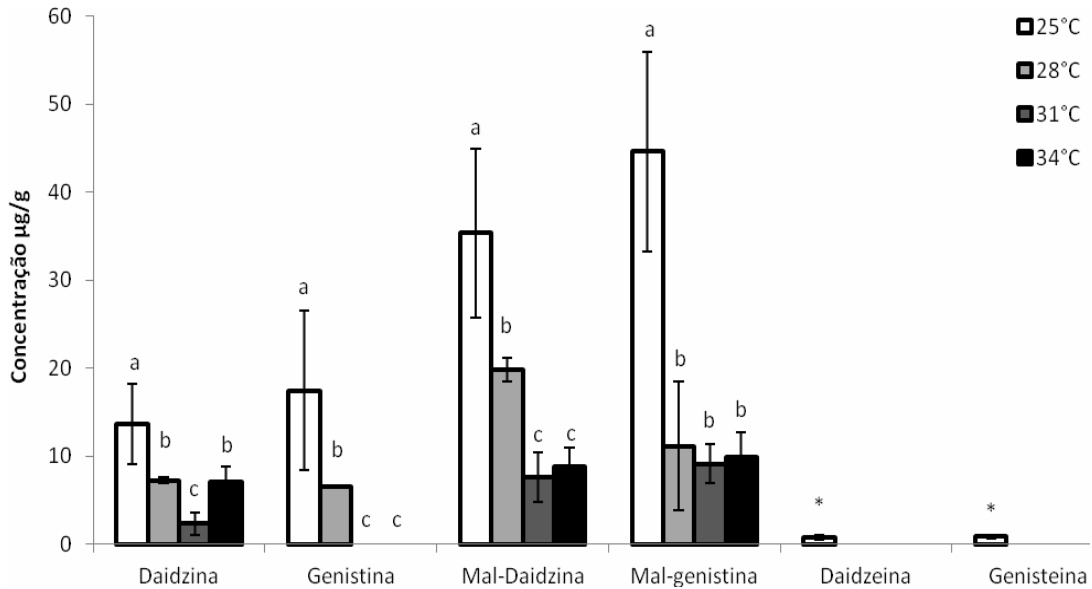
Ao avaliar a média geral da concentração dos metabólitos secundários em todas as temperaturas, foi observado que as plantas responderam de forma diferenciada com relação a concentração adotada de CO₂ e as temperaturas. Maior concentração de todas as substâncias identificadas foi observada em plantas submetidas a uma maior concentração de CO₂ (456 ppm (Figura 5.2) .

Figura 5.2 – Concentração de compostos secundários em folhas de soja BRS 359RR no estágio V3 cultivadas em fitotron com a concentração natural de CO₂ (380 ppm) e com injeção de 456 ppm CO₂. Média geral das temperaturas. Médias seguidas da mesma letra por substância não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



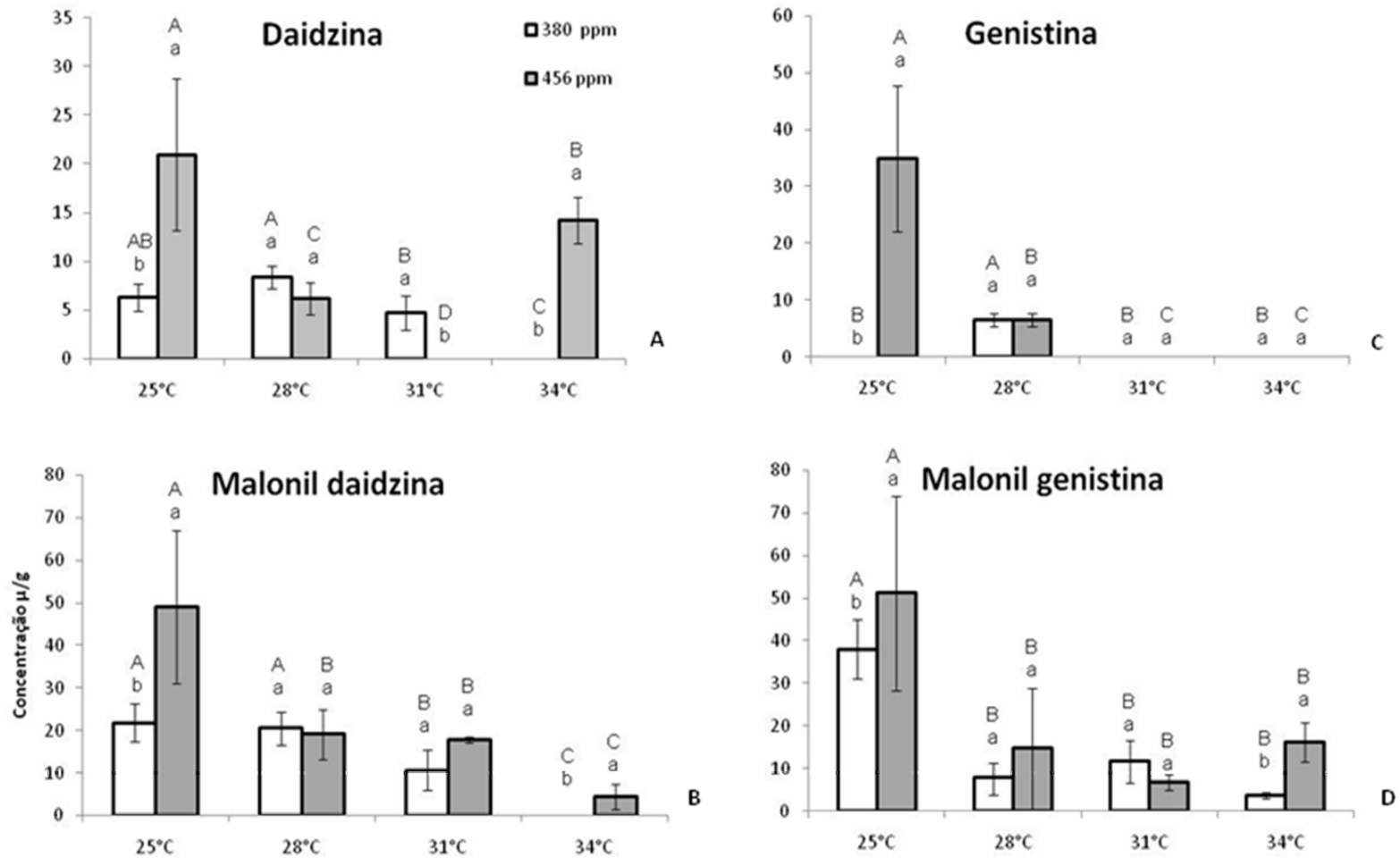
Ao analisar a produção de metabólitos secundários nas diferentes temperaturas independente da concentração de CO₂ adotada, pode se observar maior concentração destes compostos em plantas cultivadas a 25 °C. As plantas comportaram-se de forma semelhante com relação a produção dos isoflavonoides genistina e malonil genistina, sendo maior concentração destas substâncias observadas a 25°C seguida do tratamento 28°C. Na substância malonil daidzina, maior concentração foi verificada a 25° C. As substâncias daidzeína e genisteína só foram identificadas a 25°C (Figura 5.3).

Figura 5.3 – Concentração de compostos secundários em folhas de soja BRS 359RR no estágio V3 cultivadas em diferentes temperaturas 25 °C, 28 °C, 31 °C e 34 °C. Média geral das concentrações 380 e 456 ppm de CO₂. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



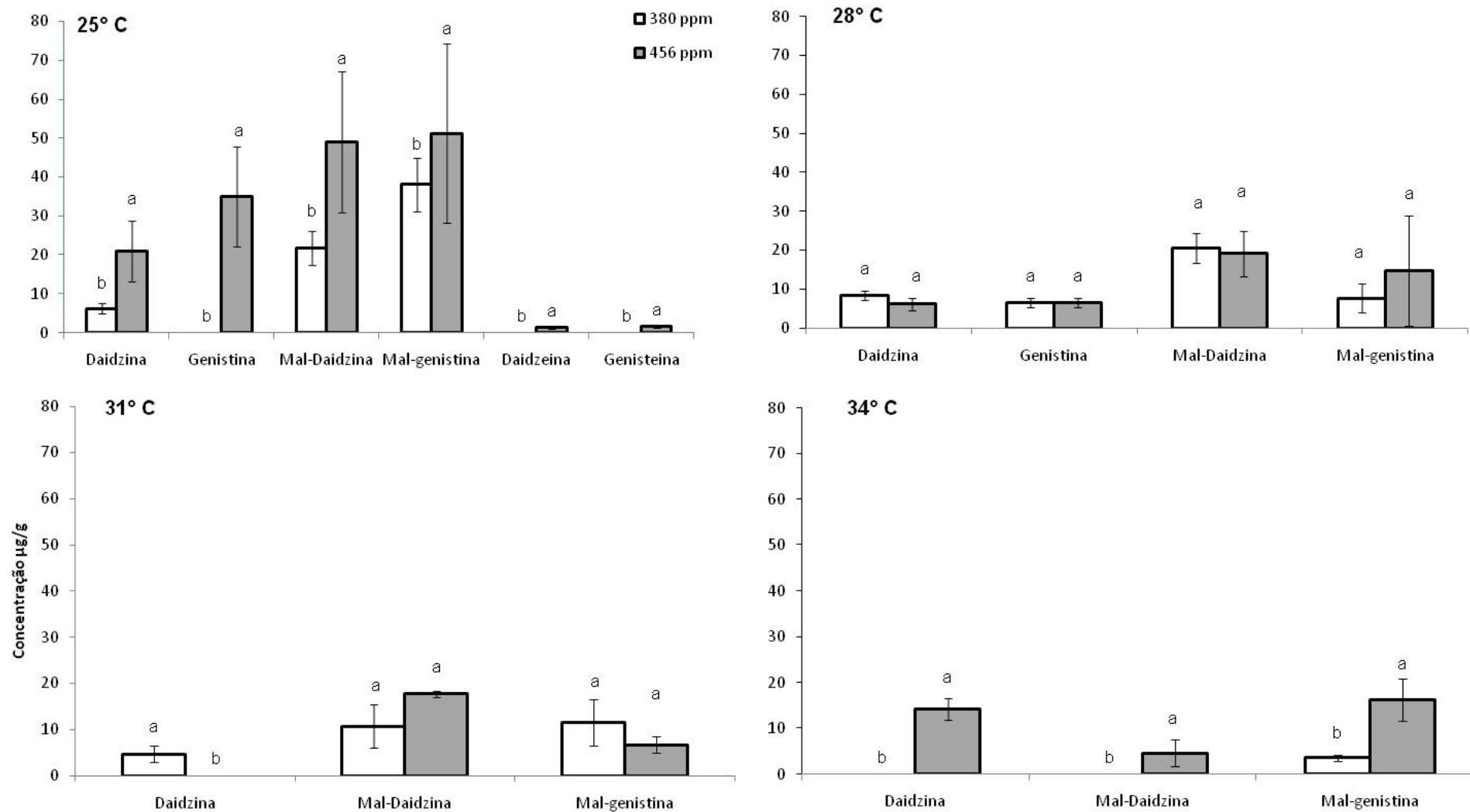
Maior concentração de daidzina foi observada nas plantas cultivadas a 25°C com adição de CO₂:456 ppm (20.95 µ/g), seguido da temperatura 34°C (14.24 µ/g). Em plantas cultivadas a 28°C não houve diferença na concentração desta substância entre as concentrações de CO₂ adotadas. A 31° C maior concentração desta substância foi observada em plantas cultivadas em câmaras nas condições naturais de CO₂ (380 ppm), sendo este composto não identificado em câmaras com injeção de CO₂ (Figura 5.4A). O mesmo comportamento foi observado para a produção da substância malonil daidzina, exceto na temperatura 31°C onde foi verificada a presença desta substância em plantas cultivadas a 456 ppm, cuja concentração não diferiu da encontrada em extratos foliares das plantas mantidas a 380 ppm (Figura 5.4B). Maior concentração de genistina foi observada no tratamento 25°C: 456ppm. Essa substância não foi identificada a 25°C – 380 ppm e nas temperaturas 31°C e 34°C (Figura 5.4C). Malonil genistina foi observada em maior concentração a 25° C e 34° C (456 ppm); em 28°C e 31°C, não houve diferença da concentração desta substância nas plantas nas duas concentrações de CO₂ utilizadas (Figura 5.4D).

Figura 5.4 – Concentração de daidzina (A), malonil daidzina (B), genistina (C) e malonil genistina (D), em folhas de soja BRS 359RR no estádio V3 cultivadas em diferentes temperaturas (25 °C; 28 °C; 31 °C; 34 °C) em concentração natural de CO₂ (380ppm) e 456 ppm. Letra minúscula compara as concentrações de CO₂ dentro de cada temperatura e maiúscula compara cada concentração de CO₂ nas diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Maior concentração de todas as substâncias foi identificada em plantas cultivadas a 25°C com injeção de 456 ppm de CO₂. Neste tratamento foi possível observar diferença significativa entre as concentrações de dióxido de carbono utilizadas, o que não pode ser verificado em plantas cultivadas em 380 e 456 ppm, a 28°C, para todas as substâncias e a 31°C, para as malonis (daidzina e genistina). Com o aumento da temperatura, observou-se redução na quantidade de compostos identificados nos extratos foliares. A substância genistina não foi detectada em plantas cultivadas a 31°C e 34°C (Figura 5.5).

Figura 5.5 – Concentração de compostos secundários em folhas de soja BRS 359RR no estágio V3 cultivadas nas temperaturas 25 °C; 28 °C; 31 °C; 34 °C submetidas a concentração atual de CO₂ e 456 ppm. Médias seguidas da mesma letra dentro de cada substância não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



A fitoalexina gliceolina foi identificada nos extratos foliares de plantas cultivadas em câmaras de crescimento, sem injeção de CO₂ (380ppm), nas temperaturas 25° C, 28° C e 34° C, sendo a maior ocorrência identificada no tratamento 25°C. Nas plantas cultivadas em ambiente com 446 ppm de CO₂, não foi verificada a ocorrência de gliceolinas nas temperaturas 25°C e 28°C. Não houve diferença de ocorrência de gliceolinas em (31° C e 34°C) nas diferentes concentrações de dióxido de carbono utilizadas (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Ocorrência de gliceolina em extratos de tecido foliar da cultivar BRS 359RR cultivadas em diferentes temperaturas e concentrações de CO₂

| | 25° C | 28° C | 31° C | 34° C |
|---------|---------------------------|-------|-------|---------------------------|
| 380 ppm | ++ (100% das amostras) | - | + | ++ (100% das amostras) |
| 456 ppm | - | - | + | ++ (90% das amostras) |

- ausência de gliocelina

+ ocorrência de gliceolina em seis a oito repetições

++ ocorrência de gliceolina em nove a dez repetições

5.5.3 Influência de Diferentes Temperaturas e Alta Concentração de CO₂ no Metabolismo

Primário: Concentração de Carbono, Nitrogênio, relação C/N e a Concentração de Açúcares em Plantas de Soja.

Para ambas concentrações de CO₂ maior percentual de carbono foi identificado a 25° C, não havendo diferença significativa entre as demais temperaturas. Comparando-se as concentrações de CO₂ (380ppm e 456 ppm) diferença no percentual de carbono entre as concentrações de CO₂ foi constatada apenas no tratamento 25°C, sendo maior a 456ppm (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Concentração de Carbono (%), em tecido vegetal de plantas de soja (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em diferentes temperaturas e concentrações de CO₂.

| Concentração de CO ₂ | Temperaturas | | | |
|------------------------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | 25°C | 28°C | 31°C | 34°C |
| 380 ppm | 43,63 ± 0,41 b A | 42,75 ± 0,45 a AB | 41,87 ± 0,89 a B | 43,18 ± 3,34 a AB |
| 456 ppm | 45,89 ± 1,21 a A | 42,80 ± 0,46 a B | 42,28 ± 1,58 a B | 43,50 ± 0,49 a B |
| Médias | 44,76 | 42,78 | 42,08 | 43,34 |
| CV(%) = 3.34 | | | | |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As maiores concentrações de N foram observadas em plantas cultivadas a 25°C e 34° C com 380 ppm (Tabela 5.7). Redução do percentual de N pode ser observada nesses tratamentos quando houve o aumento da concentração de CO₂ atmosférico (456ppm). No entanto, o inverso pode ser verificado nas temperaturas 28° C, onde maior percentual de N foi detectado em plantas cultivadas sob elevadas concentrações de CO₂. Comparando-se as temperaturas dentro de cada concentração de CO₂, menor concentração de N foi observada a 28° C e 31° C a 380ppm, e em 25° C e 31° C em 456 ppm.

Tabela 5.7 – Concentração de Nitrogênio (%), em tecido vegetal de plantas de soja (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em diferentes temperaturas e concentrações de CO₂

| Concentração de CO ₂ | Temperaturas | | | | | | | |
|------------------------------------|-----------------|--|-----------------|--|----------------|--|-----------------|--|
| | 25°C | | 28°C | | 31°C | | 34°C | |
| 380 ppm | 4,03 ± 0,32 a B | | 2,56 ± 0,32 b C | | 1,79 ± 0,31 aD | | 4,93 ± 0,46 a A | |
| 456 ppm | 2,75 ± 0,62 b B | | 3,22 ± 0,30 a A | | 2,01 ± 0,30 aC | | 3,37 ± 0,46 b A | |
| Médias | 3,39 | | 2,89 | | 1,90 | | 4,15 | |
| CV(%) = 12.96 | | | | | | | | |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Aumento da relação C:N pode ser observado em plantas cultivadas nas temperaturas de 25° C e 34° C, sob elevada concentração de CO₂ (456 ppm). O inverso pode ser verificado nas temperaturas 28° C e 31°C, onde a maior relação C:N foi identificada em plantas cultivadas com 380 ppm de CO₂ (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 – Média geral da relação Carbono:Nitrogênio em tecido vegetal de plantas de soja (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em diferentes temperaturas e concentrações de CO₂.

| Concentração de CO ₂ | Nitrogênio (%) | Carbono (%) | Relação C:N (%) |
|---------------------------------|----------------|----------------|-----------------|
| 380 ppm | 3,33 ± 1,28 a | 42,86 ± 1,83 b | 15,11 ± 6,24 b |
| 456 ppm | 2,84 ± 0,68 b | 43,62 ± 1,73 a | 16,34 ± 4,25 a |
| CV(%) | 12,96 | 3,34 | 14,91 |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A média geral de todas as temperaturas demonstrou que as plantas responderam de forma diferenciada as concentrações de CO₂ adotadas (Tabela 5.9). Redução do percentual de N pode ser observado em plantas cultivadas sob elevada concentração de CO₂ (456 ppm), maior percentual de C e um aumento da relação C:N também ocorreram nas plantas submetidas a injeção de CO₂ (456ppm).

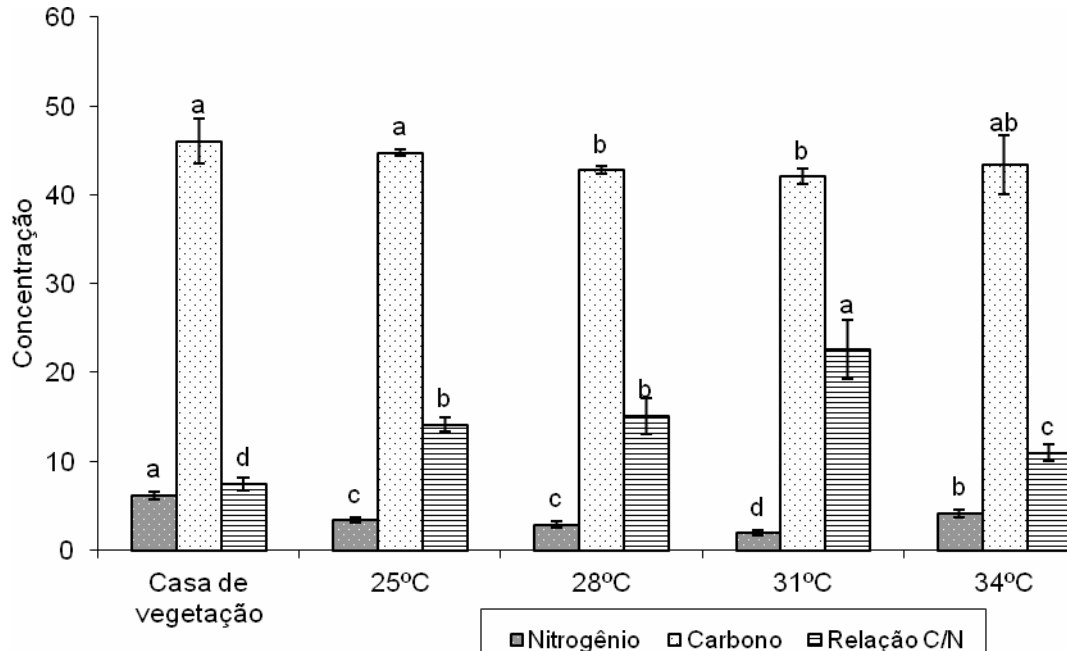
Tabela 5.9 – Média geral da concentração (%) de Nitrogênio, Carbono e Relação Carbono:Nitrogênio em tecido vegetal de plantas de soja (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em diferentes temperaturas e concentrações de CO₂.

| Concentração de CO ₂ | Temperaturas | | | |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 25°C | 28°C | 31°C | 31°C |
| 380 ppm | 10,87 ± 0,76 b C | 16,90 ± 2,04 a B | 23,86 ± 3,32 a A | 8,80 ± 0,98 b C |
| 456 ppm | 17,42 ± 3,56 a B | 13,38 ± 1,16 b C | 21,44 ± 3,01 b A | 13,14 ± 1,91 a C |
| Médias | 14,15 | 15,14 | 22,65 | 10,97 |
| CV(%) = 14,81 | | | | |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ao comparar os resultados obtidos em casa de vegetação aos do fitotron a 380 ppm, pode-se notar uma redução do percentual de nitrogênio em todas as temperaturas. A concentração de carbono não diferiu estatisticamente em plantas cultivadas em casa de vegetação e na temperatura 25° C em fitotron. Um aumento da relação C:N pode ser constatado em plantas mantidas no fitotron (Figura 5.6).

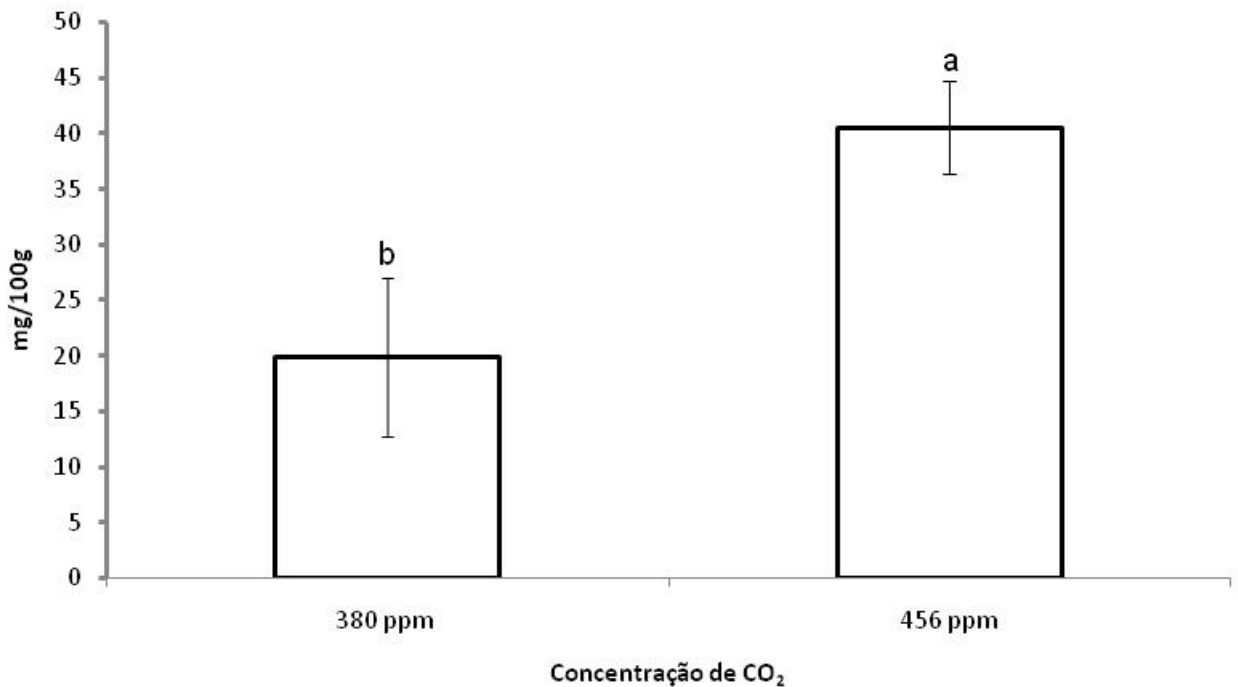
Figura 5.6 – Concentração de Nitrogênio, Carbono e Relação Carbono/Nitrogênio em tecido vegetal de plantas de soja BRS 359RR (Estádio V3) desenvolvidas em casa de vegetação e fitotron com diferentes temperaturas e condição natural de CO₂, aprox. 380 ppm.



Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao analisar a média geral de todas as temperaturas para a concentração de açúcares totais, um aumento deste composto foi observado em plantas cultivadas sob elevada concentração de CO₂ (Figura 5.7). A menor concentração de açúcares totais foi observada em plantas desenvolvidas em 25° C e 34° C a 380 ppm de CO₂. Nessa concentração, maior quantidade de açúcares foi observada nas plantas mantidas em 28° C e 31° C. Em plantas cultivadas a 456 ppm de CO₂, a menor concentração de açúcares totais foi verificada em 31°C, nas plantas das demais temperaturas não verificou-se diferença na quantidade de açúcar. A comparação de açúcares totais entre plantas que se desenvolveram nas duas concentrações de CO₂, indicou aumento significativo da concentração de açúcares totais em plantas desenvolvidas em 25° C e 34° C a 456 ppm, redução em 31°C e não mostrou diferença entre as concentrações em plantas cultivadas a 28° C (Tabela 5.10).

Figura 5.7 – Média geral da concentração de açúcares totais em tecido vegetal de plantas de soja BRS 359RR (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em casa de vegetação e em diferentes temperaturas.



Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

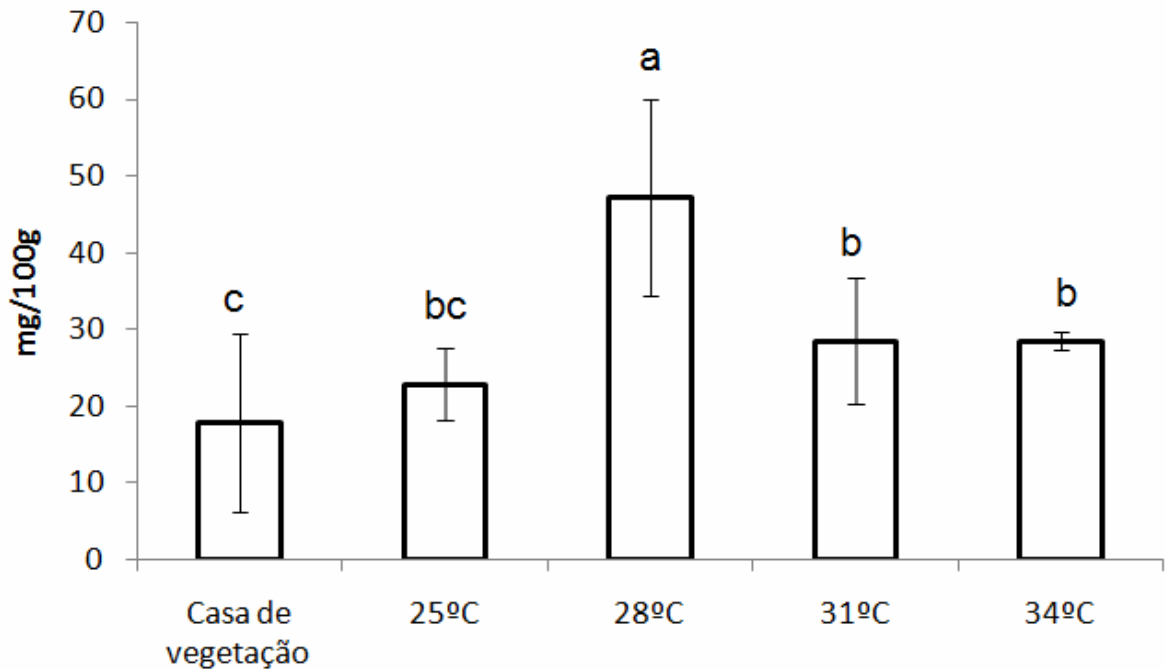
Tabela 5.10 – Concentração de açúcar total (mg/100g) em tecido vegetal de plantas de soja (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron em diferentes temperaturas e concentrações de CO₂.

| Concentração de CO ₂ | Temperaturas | | | |
|---------------------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | 25°C | 28°C | 31°C | 34°C |
| 380 ppm | 3,22 ± 1,68 b B | 41,37 ± 6,95 a A | 31,80 ± 8,23 a A | 5,80 ± 1,25 b B |
| 456 ppm | 41,20 ± 14,06 a A | 45,00 ± 8,31 a A | 25,10 ± 7,85 a B | 51,20 ± 10,44 a A |
| Médias | 23,21 | 43,29 | 28,45 | 28,50 |
| CV(%) = 27,62 | | | | |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ao comparar os resultados de concentração de açúcares totais das plantas desenvolvidas em fitotron nas diferentes temperaturas com os resultados de plantas desenvolvidas em casa de vegetação, observou-se maior concentração de açúcares em plantas cultivadas a 28°C. Plantas cultivadas em casa de vegetação apresentaram menor concentração de açúcares. No entanto, não diferiram estatisticamente de plantas desenvolvidas a 25°C em câmaras de crescimento (Figura 5.8).

Figura 5.8 – Concentração de açúcares totais em tecido vegetal de plantas de soja BRS 359RR (Estádio V3) desenvolvidas em fitotron e em casa de vegetação, em diferentes temperaturas com 380 ppm de CO₂.



Médias seguidas da mesma lera não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

5.6 DISCUSSÃO

Os parâmetros biológicos de *A. gemmatilis* foram afetados pelo aumento da temperatura. A maior mortalidade foi observada em insetos mantidos a 34° C. Elevadas taxas de mortalidade também foram observadas para a mesma espécie, quando submetida a 34° C e 37° C (SILVA et al., 2012). Extremos térmicos superiores podem ocasionar danos nas macromoléculas e/ou membrana celular (ROTI ROTI, 1982; BOWLER, 1987), além de causar morte celular através da desnaturação das proteínas e alteração da estrutura e propriedades da membrana, e enzimas, bem como pela desidratação (CHAPMAN, 1998; GULLAN;CRANSTON, 2005).

Os pesos iniciais e de pupa foram influenciados pelas temperaturas, insetos mantidos no limite térmico superior 34°C, apresentaram os menores pesos iniciais e de pupa. O menor peso de pupa observado em temperaturas elevadas pode estar relacionado a uma economia energética, para a manutenção do equilíbrio térmico corporal, os insetos diminuem a atividade metabólica (WATERS; HARRISON, 2012) o que pode reduzir a assimilação nutricional do alimento e, conseqüentemente, originar menor biomassa nas pupas.

O tempo de desenvolvimento das fases: larval, de pupa e total de *A. gemmatalis* foi menor nas temperaturas mais elevadas. Estes resultados confirmam os obtidos por Silva et al. (2012) que ao avaliar o efeito de diferentes regimes térmicos realizados para a mesma espécie alimentada em dieta artificial, também constataram redução do tempo de desenvolvimento em temperaturas elevadas (31° C, 34° C e 37° C). Segundo Ratte (1985), o aumento da temperatura reduz exponencialmente o tempo de desenvolvimento em ectotérmicos. Possivelmente pela alta sensibilidade do inseto a remoção de hormônio juvenil ou a secreção de ecdisona pelo aumento da temperatura (DAVIDOWITZ et al., 2003).

O ciclo de vida mais curto, pode proporcionar aos insetos um menor período de exposição aos predadores, garantindo assim, maior sobrevivência e também maior número de gerações durante o ano. No entanto, o encurtamento do ciclo em insetos mantidos em altas temperaturas, pode acarretar no insucesso da fase de pupa e redução da eficiência de armazenamento de lipídios como observados em *Spodoptera exigua* (Hubner), Lepidoptera: Noctuidae (LEE; ROH, 2010). Redução da concentração total de proteínas, lipídeos, glicose e enzimas larvais foram observadas em *Earias insulana* (Boisd.) Lepidoptera: Noctuidae, submetidas a temperaturas elevadas (32°C e 37° C), a menor concentração destas substâncias pode afetar negativamente o potencial reprodutivo dos insetos (KANDIL, 2013).

A menor biomassa de pupas constatada em insetos submetidos a temperaturas elevadas, pode levar a ocorrência de adultos menores. Em geral, o tamanho do adulto afeta a fecundidade. Ainda, o peso de pupa tem sido altamente correlacionado ao tamanho dos adultos. Ao nosso conhecimento, não existe pesquisa relacionando a fecundidade com o tamanho de pupas e lepidopteros noctuideos. Entretanto, em outras ordens de insetos, com um aumento de 0,1 mg no peso de pupa, observou-se um aumento de cerca de 4-5 ovos em *Molophilus ater* (Meigen) Diptera: Tipulidae, (HADLEY, 1971). Desta forma, o menor número de ovos observados em insetos submetidos a 34°C, pode estar relacionado a menor biomassa de pupa. Respostas comportamentais em consequência da manutenção de insetos em temperaturas mais elevadas, também podem influenciar na reprodução dos insetos e por consequência afetar a fecundidade. Pouca movimentação e alimentação constante, foram observadas em *A. gemmatalis* quando mantidas a 35°C (MILANO et al., 2008), tais respostas comportamentais podem ter ocasionado menor frequência de cópulas, o mesmo autor verificou que nessas condições de temperaturas, fêmeas apresentaram menor número de espermatóforos e, conseqüentemente, menor número de ovos.

O aumento da temperatura não afetou a razão sexual dos insetos. Estes resultados confirmam os obtidos por Silva et al. (2012), onde diferença nesta variável para *A.*

gemmatalis também não foi constatada entre as os regimes térmicos estudados. Influência da temperatura na razão sexual também não foi verificada em *Plutella xylostella*, Lepidoptera: Plutellidae (GUO; QIN, 2010).

A longevidade das fêmeas foi afetada por temperaturas elevadas, menor longevidade pode ser observada a 31° C e 34° C. Estudos sobre a temperatura e o desenvolvimento dos insetos, indicam que o período de sobrevivência dos insetos adultos é mais curto em temperaturas mais elevadas (BARI; LANGE 1980; MOSCARDI et al., 1981).

Os isoflavonóides daidzina, daidzeína, genistina, genisteína e as malonís (daidizina, genistina), foram identificados nos extratos foliares de soja submetidas a (380 e 456 ppm) de CO₂ e a (25°C, 28°C, 31°C e 34°C). Tais substâncias têm sido relacionadas a uma variedade de funções: precursores da produção de fitoalexinas (LOZOVAYA et al., 2007), inibidores do ataque de patógenos (NAOUMKINA et al., 2007) e resistência de plantas a insetos (ZHOU et al., 2011). As concentrações dos metabólitos secundários identificados foram influenciadas pelas concentrações de dióxido de carbono utilizadas (380 e 456 ppm) e temperaturas adotadas. A elevada concentração de CO₂ proporcionou um maior acúmulo das substâncias identificadas, principalmente em temperaturas mais amenas. No entanto, estudos realizados para verificar o efeito de elevadas concentrações de CO₂ na produção de substâncias do metabolismo secundário em plantas de soja cultivadas sob altas concentrações de CO₂ (550 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) demonstraram aumento apenas na concentração de quercitina, e redução de genisteína (O' NEILL et al., 2010). Redução das concentrações de fenólicos totais e flavonóides também foram observados em grãos de arroz cultivados sob elevada concentração de CO₂ (GOUFO et al., 2014). Variações extremas da temperatura são desfavoráveis ao metabolismo das plantas, de modo geral, temperaturas amenas são mais favoráveis as plantas, enquanto altas temperaturas incidem negativamente sobre as vias metabólicas das plantas (SANGWAN, 2001).

O efeito da temperatura na produção de flavonóides em sementes e vagens de soja, tem sido bastante estudado, e para estas estruturas das plantas as elevadas temperaturas tem proporcionado menor acúmulo de metabólitos secundários (TSUKAMOTO et al., 1995). O aumento da temperatura de 18 ° C para 23 ° C e 28° C durante o desenvolvimento da semente acarretou em decréscimo do conteúdo total de isoflavona em cerca de 65 % e 90 % respectivamente (CALDWELL; BRITZ; MIRECKI, 2005). Estresse de alta temperatura [33/25 ° C (temperaturas dia/noite)] imposta no final do período reprodutivo (R5 -R8) reduziu a concentração total de isoflavonas de 46-86 e 20-73 % em sementes e vagens, respectivamente (CHENNUPATI et al., 2012). No entanto, estudos sobre a resposta

da produção de metabólitos secundários em folhas de soja sob elevadas temperaturas ainda são escassos, neste trabalho o maior acúmulo de isoflavonóides em plantas cultivadas a 25° C, limite térmico inferior adotado, e a redução destes compostos observada em temperaturas mais elevadas (28°C, 31° C e 34° C), sugere que as estruturas foliares, assim como verificado em vagens e sementes, também são influenciadas pela temperatura na produção de substâncias do metabolismo secundário, sendo as temperaturas mais baixas mais propícias para a produção destes compostos.

Das substâncias identificadas pode-se destacar a daidzina. Esta substância é precursora de fitoalexinas, incluindo a gliceolina (GRAHAM; KIM; GRAHAM, 1990; LOZOVAYA et al., 2007). As fitoalexinas são substâncias que podem ser produzidas pelas plantas em resposta ao ataque de patógenos e insetos, atuando na sua defesa (DUKA; ARDELEAN, 2010). A temperatura pode influenciar na produção desta fitoalexina. Em hipocótilos de soja, menor concentração de gliceolinas foi verificada a 32°C, quando comparada 25°C (CLASSEN; WARD, 1985) Baixas temperaturas podem promover o acúmulo de fitoalexinas em plantas (MERCIER; ARUL; CHANTAL, 1993). As gliceolinas juntamente com outros isoflavonóides mostraram efeitos antinutricionais e/ou antibióticos em *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (NEUPANE; NORRIS, 1991; SHARMA; NORRIS, 1991). Folhas de feijão tratadas com gliceolina foram menos aceitas por *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber (Coleoptera: Chrysomelidae) e *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Chrysomelidae), mas esse tratamento não afetou *Cerotoma trifurcata* (Foster) (Coleoptera:Chrysomelidae), mesmo nas maiores concentrações testadas (FISCHER; KOGA; PAXTON, 1990). Embora as propriedades antinutricionais das gliceolinas contra insetos desfolhadores tenham sido observadas sob condições experimentais, essas respostas são aparentemente espécie-específicas, pois essas fitoalexinas também não mostraram efeito significativo no crescimento, desenvolvimento ou sobrevivência de *Pseudoplusia includens* Lepidoptera: Noctuidae (HART; KOGAN; PAXTON, 1983). Neste trabalho maior número de repetições onde foi constatada a ocorrência de gliceolinas foi observada em plantas cultivadas a 25°C com menor concentração de CO₂ e a 34°C em ambas concentrações de CO₂ utilizadas. Estes resultados diferem dos encontrados por Classen e Ward (1985), que constataram menor ocorrência de gliceolinas em temperaturas elevadas.

Os compostos daidzina, daidzeína, genistina e genisteína identificados neste trabalho, tem sido testados e relacionados a resistência de plantas a insetos. Em testes de preferência alimentar de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) vagens tratadas com daidzina não apresentaram diferença na preferência quando comparadas a testemunha e foram

mais preferidas quando comparadas a vagens tratadas com genistina (TOLEDO, 2005). Daidzeína aplicada em discos foliares afetou negativamente o crescimento e sobrevivência da larva do repolho, *Trichoplusia ni*, (Lepidoptera: Noctuidae) (SHARMA; NORRIS, 1991). Genistina adicionada a dieta artificial não demonstrou efeito antinutricional em *A. gemmatalis*, no entanto, quando esta substância foi adicionada juntamente com o flavonóide rutina, maior mortalidade, redução de pesos iniciais e de pupa, além de maior duração da fase larval foi observado (SALVADOR, 2008). Genisteína aplicada em discos foliares reduziu o consumo de *Heteronychus arator*, Coleoptera: Scarabaeidae (SUTHERLAND et al., 1980).

O melhor desempenho dos insetos observado no tratamento onde foi verificada maior concentração de isoflavonóides pode estar relacionada as diferentes formas de ação destas substâncias sobre artrópodes pragas e a capacidade de adaptação dos insetos a estas substâncias. Apesar de amplamente distribuídos nas cultivares de soja os isoflavonóides não possuem alta toxicidade aos artrópodes pragas. Comparados a muitas outras substâncias secundárias, os flavonóides não são especialmente tóxicos, e têm baixa atividade fisiológica em muitos insetos (HARBORNE; GRAYER, 1993). E podem atuar de diferentes formas conforme a sua concentração e a espécie. Dependendo da concentração e da espécie de inseto podem atuar de forma diferenciada, como por exemplo o flavonoide rutina pode ser estimulante alimentar para o gafanhoto *Schistocerca americana*, Orthoptera: Acrididae (Drury) (BERNAYS et al., 1991) e atuar negativamente na biologia de *A. gemmatalis* causando prolongamento no ciclo e alta mortalidade (GAZZONI et al., 1997; HOFFMANN et al. 2006; SALVADOR et al. 2010). Além disso, flavonóides com estrutura relativamente parecidas, podem agir de forma diferente no mesmo inseto (HARBORNE; GRAYER, 1993), como no caso da rutina (quercitina 3-*O*-rutinosídeo) que funciona como estimulante alimentar para *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae), enquanto a quercetina 3-rhamnosídeo que possui menor quantidade de açúcar em relação a rutina age como deterrente (BOER; HANSON 1987).

Ainda, cultivares ou genótipos reconhecidos por sua característica de resistência a insetos como: IAC-100 e PI 227687, apresentam em sua composição química os flavonóides rutina (90 e 350 µg/g) e genistina (44 e 19 µg/g), respectivamente (SALVADOR, 2008). O flavonoide rutina, não foi identificado na cultivar BRS 359 RR, utilizada nesse trabalho. A rutina tem sido relatada por atuar de forma negativa na biologia de *A. gemmatalis* (GAZZONI et al. 1997; PIUBELLI et al., 2005; HOFFMANN et al. 2006; SALVADOR et al., 2010), e a genistina de forma isolada, não causa efeitos deletérios ao ciclo biológico de *A. gemmatalis* quando adicionada a dieta artificial. No entanto, impacto negativo acentuado foi

observado quando esta substância foi associada a rutina. A ausência da rutina, também pode ser um dos fatores relacionados ao melhor desempenho dos insetos em plantas cuja maior concentração de metabólitos foi identificada.

Para o inseto a composição química da planta constitui um desafio em sua alimentação, barreira esta que pode ser superada através de estratégias de adaptação como um conjunto de enzimas que atuam contra agentes tóxicos químicos (MELLO; SILVA-FILHO, 2002) e detoxificação por oxidação, redução, hidrólise ou conjugação de moléculas (SCOTT; WEN, 2001) das substâncias presentes nas plantas. O desenvolvimento de insetos em um número reduzido de hospedeiras, propicia uma forma mais eficiente de reconhecimento e adaptação dos metabólitos secundários presentes nas plantas. Em *A. gemmatalis*, praga-chave da cultura da soja, a alimentação em hospedeiros não preferenciais é rara, ocasionada pela falta das plantas hospedeiras preferenciais ou a alguma deficiência nutricional dos hospedeiros preferenciais disponíveis (MOSCARDI et al., 2012).

Elevadas concentrações de CO₂, associadas ao aumento de temperatura podem promover mudanças no metabolismo primário das plantas, modificando a concentração de substâncias essenciais como carbono (C), nitrogênio (N), carboidratos e açúcares totais, o que pode modificar as relações inseto-planta. Para ambas concentrações de CO₂ maior percentual de carbono foi identificado a 25° C, sendo maior em 456ppm de CO₂. Aumento da relação carbono e nitrogênio (C:N) pode ser observado em plantas cultivadas nas temperaturas de 25° C e 34° C sob elevada concentração de CO₂ (456 ppm). Maior concentração de metabólitos secundários nestes tratamentos pode estar relacionada ao aumento de carbono. Plantas cultivadas em CO₂ elevado possuem maior relação C: N que plantas cultivadas em níveis ambientais de CO₂ (AINSWORTH et al., 2002), aumentando assim a quantidade de carbono disponíveis para serem transformados em compostos fenólicos (O NEIL et al., 2010).

As maiores concentrações de N foram encontradas em plantas cultivadas a 25°C e 34° C com 380 ppm. Redução do percentual de N pode ser observada nesses tratamentos quando houve o aumento da concentração de CO₂ atmosférico (456ppm). No entanto, o inverso pode ser verificado nas temperaturas 28° C, onde maior percentual de N foi encontrado em plantas cultivadas sob elevadas concentrações de CO₂, a maior qualidade nutricional destas plantas, pode estar relacionada ao melhor desempenho dos insetos nestas condições. Taxas elevadas de assimilação de C em altas concentrações de CO₂ tem um efeito de diluição do N, promovendo o aumento da relação C:N no tecido das plantas (RIIKONEN et al., 2005; ZAVALA et al., 2013). A redução da concentração de N pode ser explicada

devido ao fato de uma proporção substancial de N foliar ser investida na atividade da Rubisco (EVANS, 1989), e também ao estímulo da reação de carboxilação em elevadas concentrações de CO₂ (SENEWEERA et al., 2011).

Aumento de açúcares totais foi observado em plantas cultivadas sob elevada concentração de CO₂. Condições elevadas de CO₂ como mencionado anteriormente, estimulam a fotossíntese, principalmente em plantas C3, uma maior eficiência deste processo resulta em um aumento a concentração do total de carboidratos e açúcares nas plantas cultivadas (AINSWORTH et al., 2002). Em soja, os níveis de açúcares foliares aumentaram em 31 %, em plantas cultivadas sob elevadas concentrações de CO₂, plantas estas que apresentaram também aumento significativo na densidade de *Popillia japonica*, Coleoptera: Scarabaeidae (HAMILTON et al., 2005).

5.7 CONCLUSÃO

Elevadas temperaturas e concentrações de CO₂ afetam a biologia de *A. gemmatilis*, causando maior mortalidade, redução da longevidade e número de ovos. Estas condições também promovem alterações no metabolismo primário e secundário da soja, elevadas temperaturas e concentrações de CO₂, reduzem o percentual de nitrogênio e causam o aumento da concentração de açúcares totais, aumentando assim provavelmente a suscetibilidade das plantas a insetos.

CONCLUSÕES FINAIS

A população de *A. gemmatilis* pode ser negativamente afetada pelo aumento da temperatura, no entanto, indícios de adaptação aos diferentes regimes térmicos adotados ao longo das gerações foram observados.

Temperaturas elevadas promovem nas plantas redução da concentração de metabólitos secundários.

Plantas submetidas a elevadas temperaturas e concentrações de CO₂ apresentaram maior percentual de carbono, menor percentual de nitrogênio e um aumento da relação C:N.

Elevadas temperaturas e concentração de CO₂, promoveram um aumento da concentração de açúcares totais em folhas de soja.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I.N.; MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.43, n.3, p. 241-8, 2005.
- ADAMO, S.A.; LOVETT, M.M.E. Some like it hot: the effects of climate change on reproduction, immune function and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 214, p. 1997-2004, 2011.
- AINSWORTH, E.A.; DAVEY, P.A.; BERNACCHI, C.J.; DERMODY, O.C.; HEATON, E.A.; MOORE, D.J.; MORGAN, P.B.; NAIDU, S.L.; RA, H.Y.; ZHU, X.; CURTIS, P.S., LONG, S.P. A meta-analysis of elevated CO₂ effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. **Global Change Biology**, Oxford, v.8, n.8, p. 695-709, 2002.
- AMARASEKARE, K. G.; EDELSON, J. V. Effect of Temperature on Efficacy of Insecticides to Differential Grasshopper (Orthoptera: Acrididae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.97, n.5, p.1595-1602, 2004.
- AMARASEKARE, P.; SIFUENTES, R. Elucidating the temperature response of survivorship in insects. **Functional Ecology**, Oxford, v. 26, n. 4, p.959-968, 2012.
- ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 6. ed. São Paulo: Org. Andrei Ed., 2003. v.2.
- ANDREW, N. R.; HUGHES, L. Diversity and assemblage structure of phytophagous Hemiptera along a latitudinal gradient: predicting the potential impacts of climate change. **Global Ecology & Biogeography**, Oxford, v.14, n.3, p.249-262, 2005.
- ANGILLETTA, M. J.; STEURY, T. D.; SEARS, M. W. Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. **Integrative and Comparative Biology**, Mclean, v. 44, n. 6, p. 498-509, 2004.
- AWAD, M.; CASTRO, P.R.C. **Introdução à fisiologia vegetal**. São Paulo: Nobel, 1983.
- BALE J. S.; HAYWARD, S. A. L. Insect overwintering in a changing climate. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 213, p. 980-994, 2010.
- BALE, J. S.; MASTERS, G. J.; HODKINSON, I. D.; AWMACK, C.; BEZEMER, T. M.; BROWN, V. K.; BUTTERFIELD, J.; BUSE, A.; COULSON, J. C.; FARRAR, J.; GOOD, J. E. G.; HARRINGTON, R.; HARTLEY, S.; JONES, T. H.; LINDROTH, R. L.; PRESS, M. C.; SYMRNIODIS, I.; WATT, A.; WHITTAKER, J. B. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. **Global Change Biology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2002.
- BARI, M. A.; LANGE, W. H. Influence of temperature on the development, fecundity, and longevity of the artichoke plume moth. **Environmental Entomology**, College Park, v. 9, n. 5, p. 673-676, 1980.

BARRIOPEDRO, D.; FISCHER, E.M.; LUTERBACHER, J.; TRIGO, R.M.; GARCÍA-HERRERA, R. The hot summer of 2010: redrawing the temperature record map of Europe. **Science**, Washington, v. 332, p.220-224, 2011.

BAVARESCO, A.; M.S. GARCIA; A.D. GRÜTZMACHER; FORESTI, J.; RINGENBERG, R. Biologia e Exigências Térmicas de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.31, n.1, p.49-54, 2002.

BECK SD. Insect thermoperiodism. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 28, p. 91-108, 1983.

BECK, S.D. Resistance of plants to insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.10., p. 207-232, 1965.

BENEDICT, J.H.; HATFIELD, J. L. Influence of temperature induced stress on host plant suitability to insects. In: HEINRICHS, E. A. **Plant stress-insect interactions**. John Wiley and Sons, 1988. p. 139-165.

BERNAYS, E.A.; HOWARD, II.; CHAMPAGNE, D.; ESTESEN, B.I. Rutin: a phagostimulant for the grasshopper *Schistocerca americana*. **Entomologia experimentalis et applicata**, Dordrecht, v.60, p.19-28, 1991.

BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Oxygen Deprivation, Metabolic Adaptations and Oxidative Stress. In: MANCUSO, Stefano; SHABALA, Sergey (Ed.). **Waterlogging signalling and tolerance in plants**. New York: Springer, 2010. Chapter 7.

BLOOM, A. J. et al. CO₂ enrichment inhibits shoot nitrate assimilation in C₃ but not C₄ plants and slows growth under nitrate in C₃ plants. **Ecology**, Tempe, Ariz, v. 93, n. 2, p. 355-367, 2012.

BOER, G.; HANSON, F.E. Feeding responses to solanaceous allelochemicals by larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Entomologia experimentalis et applicata**, Dordrecht, v. 45, p. 123-131, 1987.

BONATO, E.R. (Ed.) **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000.

BOWLER, K. Cellular heat injury. Are membranes involved? In: BOWLER, K.; FULLER, B.J (Ed.). **Temperature and Animal Cells. Society for Experimental Biology Symposium**, Cambridge, v. 41, p. 157-185, 1987.

BOWLER, K.; TERBLANCHE, J. S. Insect thermal tolerance: what is the role of ontogeny, ageing and senescence? **Biological Reviews**, Cambridge, v.83, n.3, p.339-355, 2008.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C.M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, 2000.

BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J. Plant nutrient solutions: In SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. (Ed.). **Hand book for rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium technology**. Hawaii: Niftal Project, University of Hawaii, 1970. p. 245-249.

BUENO, R. C.; BUENO, A. F.; MOSCARDI, F.; PARRA, J. R.; 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, n. 2, p. 170, 2011.

BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; ZOTTI, M.J.; BANDEIRA, J.M. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações dos biótipos “milho” e “arroz” de *Spodopterafrugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 329-335, 2005.

CALDWELL, C.R., BRITZ, S.J., MIRECKI, R.M. Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] grown in controlled environments. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 53, p.1125-1129, 2005.

CASTEEL, C.L.; O'NEILL, B.F.; ZAVALA, J.A.; BILGIN, D.D.; BERENBAUM, M.R.; DELUCIA, E.H. Transcriptional profiling reveals elevated CO₂ and elevated O₃ alter resistance of soybean (*Glycine max*) to Japanese beetles (*Popillia japonica*). **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.31, n.4, p.419-434, 2008.

CHAPMAN, Reginald Frederick. **The insects: structure and function**. Cambridge: Cambridge University press, 1998.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, n. 3, p. 239-264, 2003.

CHEN, I.C.; HILL, J.K.; OHLEMÜELLER, R.; ROY, D.B.; THOMAS, C.D. Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. **Science**, Washington, v. 333, p. 1024-1026, 2011.

CHENNUPATI P., SEGUIN P., CHAMOUN R., AND JABAJI S. Effects of High-Temperature Stress on Soybean Isoflavone Concentration and Expression of Key Genes Involved in Isoflavone Synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 51, p.12421-12427, 2012.

CHESNEY, M.; GHEYSSSENS, J.; TASCHINI, L. The Issue of Climate Change. In: _____. **Environmental Finance and Investments**. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 5-16.

CHRISTENSEN, J.H.; HEWITSON, B.; BUSUIOC, A.; CHEN, A.; GAO, X.; HELD, I.; JONES, R.; KOLLI, R.K.; KWON, W.T.; LAPRISE, R.; MAGAÑA RUEDA, V.; MEARNNS, L.; MENÉNDEZ, C.G.; RÄISÄNEN, J.; RINKE, A.; SARR, A.P.W. Regional Climate Projections. In: SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K. B.; TIGNOR, M.; MILLER, H. L. (Ed.). **Climate Change 2007: The Physical Science Basis**. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. p. 847-940.

CHRISTIE, P.J.; ALFENITO, M.R.; WALBOT, V. Impact of low- temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. **Planta**, Berlin, v.194, p. 541-549, 1994.

CLASSEN, D.; WARD, E. W. B. Temperature-induced susceptibility of soybeans to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*: production and activity of elicitors of glyceollin. **Physiological plant pathology**, London, v. 26, n. 3, p. 289-296, 1985.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2012/2013**. Brasília, 2013.

CONWAY T.; TANS P. Globally averaged marine surface annual mean data. U.S. National Oceanic and Atmospheric Administration, Earth System Research Laboratory. 2013. Disponível em: <<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html>> Acesso em: 23 jul. 2013.

COUMOU, Dim.; ROBINSON, Alexander; RAHMSTORF, Stefan. Global increase in record-breaking monthly-mean temperatures. **Climatic change**, Dordrecht, v. 118, n.3-4, 771-782, 2013.

CURRANO, E.D.; WILF, P.; WING, S.L.; LABANDEIRA, C.C.; LOVELOCK, E.C.; ROYER, D.L. Sharply increased insect herbivory during the Paleocene–Eocene Thermal Maximum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 6, p. 1960-1964, 2008.

DAVIDOWITZ, Goggy; D'AMICO, Louis J.; NIJHOUT, H. Frederik. Critical weight in the development of insect body size. **Evolution & development**, Malden, v. 5, n. 2, p. 188-197, 2003.

DAVIS, A. J.; JENKINSON, L. S.; LAWTON, J. H.; SHORROCKS, B.; WOOD, S. Making mistakes when predicting shifts in species range in response to global warming. **Nature**, London, v. 391, n. 6669, p.783-786, 1998.

DECONTO, J.G. (Coord.). **Aquecimento global e a nova geografia da produção agrícola no Brasil**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária: Unicamp, 2008.

DELLA-MARTA, P.M.; HAYLOCK, M.R.; LUTERBACHER, J.; WANNER, H. Doubled length of western European summer heat waves since 1880. **Journal of Geophysical Research**, Washington, v. 112, p.1–11, 2007.

DELUCIA, Evan H. et al. Climate change: resetting plant-insect interactions. **Plant physiology**, Washington, v. 160, n. 4, p. 1677-1685, 2012.

DENLINGER, D.L.; YOCUM, G.D. Physiology of heat sensitivity. In: HALLMAN, G.J.; DENLINGER, D.L. (Ed.). **Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management**. Boulder: Westview Press, 1998. p. 7–54.

DERMODY, O.; O'NEILL, B. F.; ZANGERL, A. R.; BERENBAUM, M. R.; DELUCIA, E. H. Effects of elevated CO₂ and O₃ on leaf damage and insect abundance in a soybean agroecosystem. **Arthropod-Plant Interactions**, v.2, n.3, p.125-135, 2008

DESPRÉS, L.; DAVID, J. P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v.22, n. 6, p. 298-307, 2007.

DIXON, A. F. G.; HONEK A.; Keilp.; KOTELA M. A. A.; SIZLINGA.L.; JAROSÍK, V. Relationship between the minimum and maximum temperature thresholds for development in insects. **Functional Ecology**, Oxford, v. 23, p. 257-264, 2009.

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.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substances. **Nature**, London, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUKA, R.; ARDELEAN, D. Phytoncides and phytoalexins – vegetal antibiotics **Journal Medical Aradean**, v. 13, p. 19-25, 2010.

EASTBURN, D. M.; M. M.; DELUCIA, E. H.; DERMODY, O.; MCELRONE, A. J. Elevated atmospheric carbon dioxide and ozone alter soybean diseases at SoyFACE. **Global Change Biology**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 320-330, 2010.

EITZINGER, J.; ORLANDINI, S.; STEFANSKI, R.; NAYLOR, R. E. L. Climate change and agriculture: introductory editorial. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 148, p. 499-500, 2010.

EPSTEIN E.; BLOOM A.J. **Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives**. 2nd edn. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, 2005.

EVANS, J. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. **Oecologia**, Berlin, v. 78, p.9-19, 1989.

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

FERREIRA, B. S. C.; PANIZZI, A. R. Distribuição de ovos e lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner em plantas de soja. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.7, p.54-59, 1978.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v.6, p. 36-41, 2008.

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

FOUNDA, D.; GIANNAKOPOULOS, C. The exceptionally hot summer of 2007 in Athens, Greece—a typical summer in the future climate? **Glob Planet Chang**, v. 67, p.227-236, 2009.

FRAENKEL, G. Evaluation of our thoughts on secondary plant substances. **Entomologia experimentalis et applicata**, Dordrecht, v.12, p. 473-486, 1969.

FRANKS, P.J.; ADAMS, M.A.; AMTHOR, J.S.; BARBOUR, M.M.; BERRY, J.A.; ELLSWORTH, D.S.; FARQUHAR, G.D.; GHANNOUM, O.; LLOYD, J.; MCDOWELL, N. Sensitivity of plants to changing atmospheric CO₂ concentration: from the geologic past to the next century. **New Phytologist**, Cambridge, v.197, p. 1077-1094, 2013.

FRAZIER, M. R.; HUEY, R. B.; BERRIGAN, D. Thermodynamics constrains the evolution of insect population growth rates: “Warmer is better”. **American Naturalist**, Chicago, v. 168, p. 512-520, 2006.

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, p. 31-35. 2005.

FURBANK, R. T.; HATCH, M. D. Mechanism of C4 photosynthesis—the size and composition of the inorganic carbon pool in bundle sheath cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 85, p. 958-964, 1987.

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

GHANNOUM, Oula. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, London, v. 103, n. 4, p. 635-644, 2009.

GHINI, R. **Mudanças Climáticas globais e doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 374-381, 2007.

GORNALL, J.; BETTS, R.; BURKE, E.; CLARK, R.; CAMP, J.; WILLETT, K.; WILTSHIRE, A. GORNALL. Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. **Philosophical transactions of the Royal Society of London . Series B . Biological Sciences**, London, v. 365, n. 1554, p. 2973-2989, 2010.

GOUFO, Piebiep; PEREIRA, José; FIGUEIREDO, Nuno; OLIVEIRA, M. Beatriz P.P.; CARRANCA, Corina; ROSA, Eduardo A.S.; TRINDADE, Henrique. Effect of elevated carbon dioxide (CO₂) on phenolic acids, flavonoids, tocopherols, tocotrienols, g-oryzanol and antioxidant capacities of Rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Cereal Science**, London, v. 59, p. 15-24, 2014.

GRAHAM, R.W.; LUNDELIUS, E.L.JR; GRAHAM, M.A.; SCHROEDER, E.K.; TOOMEY, R.S.III; ANDERSON, E.; BARNOSKY, A.D.; BURNS, J.A.; CHURCHER, C.S.; GRAYSON, D.K.; GUTHRIE, R.D.; HARRINGTON, C.R.; JEFFERSON, G.T.; MARTIN, L.D.; MCDONALD, H.G.; MORLAN, R.E.; SEMKEN, H.A.JR; WEBB, S.D.; WERDELIN, L.; WILSON, M.C. Spatial Response of Mammals to Late Quaternary Environmental Fluctuations. **Science**, Washington, v.272, p.1601-1606, 1996.

GRAHAM, T.L.; KIM, J.E.; GRAHAM, M.Y. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. **Molecular plant-microbe interactions**, Saint Paul, v.3, p. 157-166, 1990.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The insects: an outline of entomology**. 3rd. ed. Davis, USA: Blackwell Publishing, 2005.

GUO, Sufen; QIN, Yuchuan. Effects of temperature and humidity on emergence dynamics of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 6, p. 2028-2033, 2010.

GUTBRODT, B.; DORN, S.; MODY, K. Drought stress affects constitutive but not induced herbivore resistance in apple plants. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 6, n. 2, p. 171-179, 2012.

HADLEY, Malcolm. Pupation and fecundity of *Molophilus ater* Meigen (Diptera: Tipulidae) in relation to larval weight. **Oecologia**, Berlin, v. 7, n. 2, p. 164-169, 1971.

HAMILTON, J. G.; DERMODY, O.; ALDEA, M.; ZANGERL, A. R.; ROGERS, A.; BERENBAUM, M. R.; DELUCIA, E. H. Anthropogenic changes in tropospheric composition increase susceptibility of soybean to insect herbivory. **Environmental Entomology**, College Park, v. 34, n. 2, p. 479-485, 2005.

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

HARPER, J.E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K.J.; BENNETT, J.M.; SINCLAIR, T.R. et al. **Physiology and determination of crop yield**. Madison: ASA/CSSA/SSSA 1994. Chapt.11A. p.285-302.

HART, Suzanne V.; KOGAN, Marcos; PAXTON, Jack D. Effect of soybean phytoalexins on the herbivorous insects Mexican bean beetle and soybean looper. **Journal of chemical ecology**, New York, v. 9, n. 6, p. 657-672, 1983.

HASEGAWA, M.; MITSUHARA, I.; SEO, S.; IMAI, T.; KOGA, J.; OKADA, K.; YAMANE, H.; OHASHI, Y. Phytoalexin accumulation in the interaction between rice and the blast fungus. **Molecular plant-microbe interactions**, Saint Paul, v. 23, p. 1000-1011, 2010.

HERZOG, Donald C.; TODD, James W. Sampling velvetbean caterpillar on soybean. In: _____. **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer, 1980. p. 107-140.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B. DE; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja**. Londrina: EMBRAPA, 1985.

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

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

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; HARBONE, J.B.; MCAFFERY, A.R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soybean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia experimentalis et applicata**, Dordrecht, v. 98, 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. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. (Circular Técnica).
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; RAMOS NETO, J.A; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, L.J. Detrimental effect of rutina on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1453-1459, 2006.
- HUBERTY, A.F.; DENNO, R.F. Plant water stress and its consequences for herbivorous insects: a new synthesis. **Ecology**, Tempe, Ariz., v. 85, p.1383-1398, 2004.
- HULME, M.; VINER, D. A climate change scenario for the tropics. **Climatic Change**, Dordrecht, v.39, p.145-176, 1998.
- HUNTER, M.D. Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on insect– plant interactions. **Agricultural and Forest Entomology**, v.3, p. 153-159, 2001.
- IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C. Simulated Sunlight-UV Sensitivity of Experimental Dust Formulations of the Nuclear Polyhedrosis Virus of *Helicoverpa/Heliothis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, n.2, p.192-194, 1996.
- IPCC. In: SOLOMON, S. (Ed). **The physical science basis, contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2007.
- IPCC. **Managing the risks of extreme events and disasters to advance climate change adaptation**: special report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge: Cambridge University Press, 2012. Chapter 9.
- JERMY, T. Feeding inhibitors and food preference in chewing phytophagous insects. **Entomologia experimentalis et applicata**, Dordrecht, v.9, p.1-12, 1966.
- KANDIL MERVAT, A.A. Relationship between temperature and some biological aspects and biochemical of *Earias insulana* (Boisd.)(Lepidoptera: noctuidae). **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**, Cairo, v. 6, n.1, p. 11-20, 2013.
- KANNO, H.; HASEGAWA, M.; KODAMA, O. Accumulation of salicylic acid, jasmonic acid and phytoalexins in rice, *Oryza sativa*, infested by the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). **Applied entomology and zoology**, Tokyo, v. 47, p. 27–34, 2012.
- KAROL, Y. D. The recent bushfires and extreme heat wave in southeast Australia. **Bulletin of the Australian Meteorological and Oceanographic Society**, Australia, v. 22, p.10-13, 2009.
- KAROWE, D.N.; RADI, J.K. Are the phytoestrogens genistein and daidzein anti-herbivore defenses? A test using the Gypsy Moth (*Lymantria dispar*). **Journal of chemical ecology**, New York, v. 37, n. 8, p. 830-837, 2011.
- KLOK, C. Jaco; HARRISON, Jon F. The temperature size rule in arthropods: independent of macro-environmental variables but size dependent. **Integrative and comparative biology**, Mclean, v. 53, n. 4, p. 557-570, 2013.

KOEPPE, D.E.; ROHRBAUGH, L.M.; RICE, E.L.; WENDER, S.H. The effect of age and chilling temperatures on the concentration of scopolin and caffeoylquinic acids in tobacco. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.23, n. 2, p. 258-266, 1970.

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

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

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

LEAKEY, A. D.B. Rising atmospheric carbon dioxide concentration and the future of C4 crops for food and fuel. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Washington, v. 276, n. 1666, p. 2333-2343, 2009.

LEE, J.H.; JOHNSON, S.J. Microhabitat distribution of velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) pupae in soybean fields in Louisiana. **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, p. 740-745, 1990

LEE, KwangPum; ROH, Chris. Temperature - by - nutrient interactions affecting growth rate in an insect ectotherm. **Entomologia experimentalis et applicata**, Dordrecht, v. 136, n. 2, p. 151-163, 2010.

LESSIN, R.C.; GHINI, R. Efeito do aumento da concentração de CO2 atmosférico sobre oídio e o crescimento de plantas de soja. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n.6, nov.Qdec. 2009

LEVINSON, D. H.; FETTIG, C. J. Climate change: Overview of data sources, observed and predicted temperature changes, and impacts on public and environmental health. In: _____. **Global Climate Change and Public Health**. New York: Springer, 2014. p. 31-49.

LINCOLN, D. E.; COUVET, D.; SIONIT, N. Response of an insect herbivore to host plants grown in carbon dioxide enriched atmospheres. **Oecologia**, Berlin, v. 69, n. 4, p. 556-560, 1986.

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

LOBELL, D. B.; SCHLENKER, Wolfram; COSTA-ROBERTS, Justin. Climate trends and global crop production since 1980. **Science**, Washington, v. 333, n. 6042, p. 616-620, 2011.

LONG, S.; ORT, D. **SoyFace**: a changing environmental for agriculture. Disponível em:<<http://agronomyday.cropsci.uiuc.edu/2002/soyface/index/html>>. Acesso em: 11 ago. 2013.

LONG, S.P.; AINSWORTH, E.A.; ROGERS, A.; ORT, D.R. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v.55, p. 591-628, 2004.

- LOZOVAYA, V.V.; LYGIN, A.V.; ZERNOVA OV, ULANOV AV, LI S, HARTMAN GL, WIDHOLM J.M. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase. **Planta**, Berlin, v. 225, p. 665-679, 2007
- MAGRINI, E. A. **Tabela de vida para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em condições de laboratório**. 1993. 77p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- 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.
- MARKHAM, K.R. Flavones, flavonols and their glycosides. In: DEY P.M.; HARBONE J.B. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, 1989. p. 197-235.
- MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. Biological Techniques Series. London: Academic Press, 1982.
- MEEHL, G.A. et al. Global Climate Projections. In: SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K.B.; TIGNOR, M.; MILLER, H.L. (Ed.). **Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge University Press, Cambridge, 2007.
- MELLO, Marcia O.; SILVA-FILHO, Marcio C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Washington, v. 14, n. 2, p. 71-81, 2002.
- MERCIER, J.; ARUL, J.; CHANTAL, J. Effect of UV -C on phytoalexin accumulation and resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrots. **Journal of phytopathology**, Berlin, v. 139, p. 17-25, 1993.
- MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, New York, v.15, p.873-885, 1976.
- MILANO, P.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; CÔNSOLI, F. L. Influência da temperatura na frequência de cópula de *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Spodopterafrugiperda*(J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, p. 528-535, 2008.
- MILANO, P.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; CÔNSOLI, F. L. Influência da temperatura na frequência de cópula de *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Spodopterafrugiperda*(J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, p. 528-535, 2008.
- MONTOYA, J. M.; RAFFAELLI, D. Climate change, biotic interactions and ecosystem services. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1549, p. 2013-2018, 2010.

MORITZ, C.; PATTON, J.L.; CONROY, C.J.; PARRA, J.L.; WHITE, G.C.; BEISSINGER, S.R. Impact of a Century of Climate Change on Small-Mammal Communities in Yosemite National Park, USA. **Science**, Washington, v. 322, p. 261-264, 2008.

MOSCARDI, F.; BARFIELD, C. S.; ALLEN, G. E. Effects of temperature on adult velvetbean caterpillar oviposition, egg hatch, and longevity. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 74, n. 2, p. 167-171, 1981.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: COPPING, L.G.; GREEN, M.B.; REES, R.T. (Ed.). **Pest management in soybean**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 98-109.

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

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

NAOUMKINA, M.; FARAG, M.A.; SUMNER, L.W.; TANG, Y.; LIU, C.J.; DIXON, R.A. Inaugural article, different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 17909-17915, 2007.

NARDONI, Laws Angela; BELOVSKY, Gary E. How will species respond to climate change? Examining the effects of temperature and population density on an herbivorous insect. **Environmental entomology**, College Park, v. 39, n. 2, p. 312-319, 2010.

NELSON, G. C. et al. **Climate change: impact on agriculture and costs of adaptation**. New York: Intl Food Policy Res Inst., 2009.

NEUPANE F. P.; NORRIS D. M. Iodoacetic acid alteration of soybean resistance to the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, n. 2, p. 215-221, 1990.

NEVEN, Lisa G. Physiological responses of insects to heat. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 103-111, 2000.

NEWMAN, J. A. Climate change and cereal aphids: the relative effects of increasing CO₂ and temperature on aphid population dynamics. **Global Change Biology**, Oxford, v.10, p. 5-15, 2004.

NIZIOLEK, Olivia K.; BERENBAUM, M. R.; DELUCIA, Evan H. Impact of elevated CO₂ and increased temperature on Japanese beetle herbivory. **Insect Science**, Victoria, v. 20, n. 4, p. 513-23, Aug. 2012.

NOAA (2012). **National Climatic Data Center (NCDC), state of the climate: global hazards**. Disponível em: <<http://www.ncdc.noaa.gov/sotc/national/2012/7>>. Acesso em: July 2012.

O'NEILL, B.F.; ZANGERL, A.R.; DERMODY, O.; BILGIN, D.D.; CASTEEL, C.L. et al. Impact of elevated levels of atmospheric CO₂ and herbivory on flavonoids of soybean (*Glycine max* Linnaeus). **Journal of chemical ecology**, New York, v. 36, p.35-45, 2010.

O'NEILL, B.F.; ZANGERL, A.R.; DELUCIA, E.H.; BERENBAUM, M.R. Longevity and Fecundity of Japanese Beetle (*Popillia japonica*) on Foliage Grown Under Elevated Carbon Dioxide. **Environmental Entomology**, College Park, v.37, p.601-607, 2008.

PAAIJMANS, Krijn P.; HEINIG, R.L.; SELIGA, R.A.; BLANFORD, J.I.; BLANFORD, S.; MURDOCK, C.C.; THOMAS, M.B. Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. **Global change biology**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 2373-2380, Aug. 2013.

PANDA, N.; KHUSH, G.S. **Host plant resistance to insects**. Wallingford: CAB International, 1995.

PARMESAN, C.; GAINES, S.; GONZALEZ, L.; KAUFMAN, D. M.; KINGSOLVER, J.; TOWNSEND PETERSON, A. T.; SAGARIN, R. Empirical perspectives on species borders: from traditional biogeography to global change. **Oikos**, v.108, p.58-75, 2005.

PEREIRA, M. J. B.; BERTI-FILHO, E. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações da broca-do-fruto *Annona* (*Cerconota anonella*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.8, p.2278-2284, 2009.

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

PIUBELLI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; ARRUDA, I.C.; FRANCHINI, J.C.; LARA, F.M. Flavonoid increase in soybean genotypes as response of *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, n. 5, p. 1223-1233, 2003.

PORTER, J.H.; PARRY, M.L.; CARTER, T.R. The potential effects of climatic change on agricultural insect pests. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v.57, n.1-3, p.221-240, 1991.

PRAÇA, L.B.; SILVA NETO, S.P.; MONNERAT, R.G. *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae): biologia, amostragem e métodos de controle. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 196).

PROVERBS, M.D.; NEWTON, J.R. Effect of heat on the fertility of the codling moth, *Carocapsa pomonella* (L.). **The Canadian entomologist**, Ottawa, v. 94, n. 3, p. 225-233, 1962.

RAHMSTORF, S.; COUMOU, D. Increase of extreme events in a warming world. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.108, p.17905-17909, 2011.

RATTE, Hans T. Temperature and insect development. In: _____. **Environmental physiology and biochemistry of insects**. Heidelberg: Springer Berlin, 1985. p. 33-66.

RAUBENHEIMER, D.; SIMPSON S.J. Analysis of covariance: an alternative to nutritional indices. **Entomologia experimentalis et applicata**, Dordrecht, v. 62, p. 221-231, 1992.

RIIKONEN, J.; HOLOPAINEN, T.; OKSANEN, E.; VAPAAVUORI, E. Leaf photosynthetic characteristics of silver birch during three years of exposure to elevated concentrations of CO₂ and O₃ in the field. **Tree physiology**, Oxford, v. 25, p. 621-632, 2005.

ROBINET, C.; ROQUES, A. Direct impacts of recent climate warming on insect populations. **Integrative Zoology**, Carlton, v. 5, n. 2, p. 132-142, 2010.

ROBINSON EA, RYAN G.D.; NEWMAN, J.A. A meta-analytical review of the effects of elevated CO₂ on plant-arthropod interactions highlights the importance of interacting environmental and biological variables. **The New phytologist**, London, v.194, p. 321-336, 2012.

ROCKSTROM, J. et al. A safe operating space for humanity. **Nature**, London, v. 461, p. 472-475, 2009. doi:10.1038/461472a.

ROTI ROTI, J.L. Heat-induced cell death and radiosensitization: Molecular mechanisms. **National Cancer Institute monograph**, Bethesda, p. 3-10, 1982.

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

RUUHOLA, T.; TIKKANEN, O.; TAHVANAINEN, J. Differences in host use efficiency of larvae of a generalist moth, *Operophtera brumata* on three chemically divergent *Salix* species. **J Chem Ecol.**, v. 27, p.1595–1615, 2001.

SALVADOR, M. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; OLIVEIRA, M. C. N. de; GRAÇA, J. P. da; SILVA, D. M da; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)? **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 5, p. 774-783, Sept./Oct. 2010.

SALVADOR, M.C. Efeito de genótipos de soja e de flavonóides na biologia e no intestino médio de *Anticarsia gemmatilis*. 2008. 115 fls. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

SANGWAN, NS; FAROOQI AHA, SHABIH F, SANGWAN RS et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.34, n.1, p. 3-21, 2001.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT: User's Guide: Statistics**, Version 9.2. Cary: SAS Institute, NC: Statistical Analysis Systems, 2009.

SCHADLER, M.; ROEDER, M.; BRANDL, R.; MATTHIES, D. Interacting effects of elevated CO₂, nutrient availability and plant species on a generalist invertebrate herbivore. **Global Change Biology**, Oxford, v.13, p.1005-1015, 2007.

SCHÄR, C.; LUIGI, Vidale P.; LÜTHI, D.; FREI, C.; HÄBERLI, C.; LINIGER, M.; APPENZELLER, C. The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. **Nature**, London, v. 427, p.331-336, 2004.

SCOTT, J.G.; WEN, Z.M. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, p. 958-967, 2001.

SENEWEERA, S.; MAKINO, A.; HIROTSU, N.; NORTON, R.; SUZUKI, Y. New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO₂: The role of leaf nitrogen and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. **Environmental and experimental botany**, Elmsford, v.71, p.128-136, 2011.

SHARMA, H. C.; NORRIS, D. M. Chemical basis of resistance in soybean to cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 55, n. 3, p. 353-364, 1991.

SHARMA, H.C.; NORRIS, D.M. Comparative feeding preference and food intake and utilization by the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) on three legume species. **Environmental Entomology**, College Park, v. 20, p. 1589-594, 1991.

SILVA, D.M. da; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; BUENO, A. de F.; BUENO, R.C.O. de F.; OLIVEIRA, M.C.N. de; 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, p. 285-292, 2012.

SMITH, P.; GREGORY, P. J. Climate change and sustainable food production. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2013.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; HOFFMAN-CAMPO, C.B.; CORSO, I.C.; OLIVEIRA, L.J.; MOSCARDI, F. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2006. (Embrapa Soja. Documentos, 269).

SOUSA, C. D. M., SILVA, H. R., VIEIRA-JR, G. M., AYRES, M. C. C., COSTA, C. D., ARAÚJO, D. S., CHAVES, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, 30(2), 351-355.

STALEY, J. T.; JOHNSON, S. N. Climate change impacts on root herbivores. In JOHNSON, S. N.; Murray, P. J. (Ed.). **Root Feeders: an ecosystem perspective**. Wallingford, UK: CABI, 2008.

STAMP, Nancy E. Growth versus molting time of caterpillars as a function of temperature, nutrient concentration and the phenolic rutin. **Oecologia**, Berlin, v. 82, n. 1, p. 107-113, 1990.

STILING, P.; CORNELISSEN, T. How does elevated carbon dioxide (CO₂) affect plant-herbivore interactions? A field experiment and meta-analysis of CO₂-mediated changes on plant chemistry and herbivore performance. **Global Change Biology**, Oxford, v. 13, p.1823-42, 2007.

STIREMAN, J.O.; DYER, L.A.; JANZEN, D.H.; SINGER, M.S.; LILL, J.T.; MARQUIS, R.J.; RICKLEFS, R.E.; GENTRY, G.L.; HALLWACHS, W.; COLEY, P.D.; BARONE, J.A.;

GREENEY, H.F.; CONNAHS, H.; BARBOSA, P.; MORAIS, H.C.; DINIZ, I.R. Climatic unpredictability and parasitism of caterpillars: Implications of global warming. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.102, n.48, p.17384-17387, 2005.

STRECK, N. A.; ALBERTO, C. M. Estudo numérico do impacto da mudança climática sobre o rendimento de trigo, soja e milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 9, p. 1351-1359, 2006.

SUDDERTH, E. A.; STINSON, K. A.; BAZZAZ, F. A. Host - specific aphid population responses to elevated CO₂ and increased N availability. **Global Change Biology**, Oxford, v. 11, n. 11, p. 1997-2008, 2005.

SUN, J.; FUXA, J. R.; HENDERSON, G. Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.84, p.38-46, 2003.

SUTHERLAND, Oliver RW et al. Insect feeding deterrent activity of phytoalexin isoflavonoids. **Biochemical systematics and ecology**, Chicago, v. 8, n. 1, p. 73-75, 1980.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TANAKA, R.T.; MASCARENHAS, H.A. A. **Soja: nutrição, correção do solo e adubação**. Campinas: Fundação Cargill, 1992.

THOMAS, C.D.; BODSWORTH, E.J.; WILSON, R.J.; SIMMONS, A.D.; DAVIES, Z.G.; MUSCHE, M.; CONRADT, L.. Ecological and evolutionary processes at expanding range margins. **Nature**, London, v. 411, p. 577-581, 2001.

TOLEDO, A.M de. **Indução de isoflavonóides em soja por *Piezodorus guildinii* e efeito de extratos de isoflavonóides na preferência alimentar de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae)**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

TRUMBLE, J. T.; BUTLER, C. D. Climate change will exacerbate California's insect pest problems. **California Agriculture**, Berkeley, v.63, n.2, p.73-78, 2009.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBA, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: Changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 43, p. 1184-1192, 1995.

VAN DER HAVE, T. M.; DE JONG, G. Adult size in ectotherms: temperature effects on growth and differentiation. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 183, n. 3, p. 329-340, 1996.

WALTHER, G. R.; POST, E.; CONVEY, P.; MENZEL, A.; PARMESAN, C.; BEEBEE, T. J.; FROMENTIN, J.M.; HOEGH-GULDBERGI, O.; BAIRLEIN, F. Ecological responses to recent climate change. **Nature**, London, v.416, n. 6879, p. 389-395, 2002.

WATERS, James S.; HARRISON, Jon F. Insect Metabolic Rates. In: SIBLY, R. M.; BROWN, J. H.; KODRIC-BROWN, A. (Ed.). **Metabolic Ecology: a scaling approach**. Chichester: John Wiley & Sons, 2012. Cap. 16.

WEIS, E.; BERRY, J.A. Plants and high temperature stress. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 42, p. 329-346, 1988

WHITE, L.D. Survival and reproduction of Codling Moths exposed to 33° during larval and pupal development. **Entomologia experimentalis et applicata**, Dordrecht, v. 29, p. 98-102, 1981.

WILLIAMS, J.W.; SHUMAN, B.N.; WEBB III, T.; BARTLEIN, P.J.; LEDUC, P.L. Late-Quaternary vegetation dynamics in North America: scaling from taxa to biomes. **Ecological Monographs**, v. 74, n. 2, p. 309-334, 2004.

ZAVALA, J. A.; NABITY, P.I D.; DELUCIA, E. H. An Emerging Understanding of Mechanisms Governing Insect Herbivory Under Elevated CO₂. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 58, p. 79-97, 2013.

ZAVALA, J.A.; CASTEEL, C.L.; de LUCIA, E.H.; BERENBAUM, M.R. Anthropogenic increase in carbon dioxide compromises plant defense against invasive insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.105, n.13, p.5129-5133, 2008.

ZHOU Y.Y.; LUO S.H.; YI T.S.; LI C.H.; LUO Q.; HUA J.; LIU Y.; LI, S.H. Secondary Metabolites from *Glycine soja* and Their Growth Inhibitory Effect against *Spodoptera litura*. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 59, p. 6004-6010, 2011.

ZUO, W.; MOSES, M. E.; WEST, G. B.; HOU, C.; BROWN, J. H. A general model for effects of temperature on ectotherm ontogenetic growth and development. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Washington, v. 279, n. 1734, p.1840-1846, 2012.