

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

Herbivoria prévia em variedades de soja com e sem transgenia *Bt* e efeito na produção de metabolitos secundários, sobre o consumo alimentar, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Noctuidae)

Autor: Ricardo Dias Peruca
Orientadora: Dr^a. Antonia Railda Roel
Co-orientadora: Dr^a Rosemary Matias

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva Aplicada ao Agronegócio e Produção Sustentável.

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Fevereiro-2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P471h Peruca, Ricardo Dias

Herbivoria prévia em variedades de soja com e sem transgenia *Bt* e efeito na produção de metabolitos secundários, sobre o consumo alimentar, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Noctuidae) / Ricardo Dias Peruca; orientadora Antonia Railda Roel; coorientadora Rosemary Matias.-- 2019.

85 f.: il.; 30 cm

Tese (doutorado em ciências ambientais e sustentabilidade agropecuária) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2019

Inclui bibliografia

1. Soja transgênicas - Doenças e pragas. 2. *Spodoptera frugiperda*. I.Roel, Antônia Railda. II.Matias, Rosemary.

III. Título.

CDD: 595.78

Herbivoria prévia em variedades de soja com e sem transgenia Bt e efeito na produção de metabolitos secundários, sobre o consumo alimentar, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Noctuidae)

Autor: Ricardo Dias Peruca

Orientadora: Profa. Dra. Antonia Railda Roel

Coorientadora: Profa. Dra. Rosemary Matias

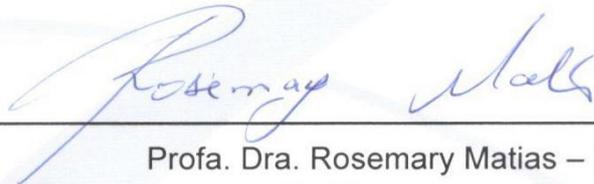
TITULAÇÃO: Doutor em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária

Área de Concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva.

APROVADO em 15 de fevereiro de 2019.



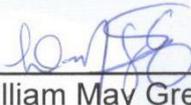
Profa. Dra. Antonia Railda Roel - UCDB



Profa. Dra. Rosemary Matias – UCDB



Prof. Dr. Denilson de Oliveira Guilherme - UCDB



Prof. Dra. Lilliam May Grespan Estodutto da Silva – UCDB



Profa. Dra. Carla Leticia Gediel Rivero Wendt – UNIDERP



Profa. Dra. Ana Cristina Araújo Ajalla- AGRAER

DEDICATÓRIA (S)

Aos meus pais, Arlindo e Judith pelo sacrifício, amor e dedicação durante toda minha vida.

A minhas irmãs Ana Cristina e Alessandra pela grande amizade e amor.

Ofereço

Com amor e carinho à minha esposa Daniela e minha filha Beatriz pelo incentivo, compreensão, paciência e companheirismo em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, que por toda a minha vida tem me acompanhado e iluminado.

A professora Dr^a Antonia Railda Roel pela oportunidade de me orientar no mestrado e doutorado, pelos ensinamentos, paciência e pelo bom exemplo de pessoa, professora-pesquisadora.

Agradeço à Prof.^a Dr^a. Rosemary Matias pela amizade, ensinamentos, correções e sugestões.

As Professoras e amigas Dr^a Karla R. A. Porto e Dr^a Deizeluci de F. P. Zanella, pelas sugestões, conversas, apoio nos momentos difíceis da elaboração desta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, pela oportunidade de cursar um doutorado e a todos os meus professores e colegas da turma pela convivência e amizade.

Aos membros da banca Dr. Denilson de O. Guilherme, Dr^a Carla Leticia G. R. Wendt, Dr^a. Lilliam May G. Estodutto da Silva e Dr^a Ana Cristina Araújo Ajalla pelas contribuições para a melhoria do trabalho.

A Dr^a. Luciana Marçal Ravaglia, Dr^a. Glaucia Braz Alcantara e Dr^a Bianca Obes Corrêa pela colaboração no trabalho com sugestões.

Aos meus colegas do laboratório de Entomologia (Mateus, Rafael, Alexandra, Priscila, Nathalie, Larissa, Danielle, Elizabete, Julia, Melissa) pela contribuição na realização do trabalho, e por tornarem a minha rotina de laboratório mais agradável e feliz.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos Programa de Suporte à Pós-graduação de Instituições de Ensino Particulares (Prosup).

A todos que colaboraram na concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pagina
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
FIGURAS DO APÊNDICE.....	xii
RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
OBJETIVOS	7
Objetivos específicos	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
Controles de pragas agrícolas	8
Variedades de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos	10
Descrição e biologia de <i>Spodoptera frugiperda</i>	12
Substâncias secundárias e resistência induzida	14
Estratégias de resistência das plantas a insetos.....	17
Comunicação entre plantas	20
Plantas de soja modificadas geneticamente para o controle de insetos	22
REFERÊNCIAS.....	24
CAPITULO I - Influência da herbivoria prévia de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep.: Noctuidae) em plantas de soja isolinhas BRS 284 e BRS 1001 IPRO no consumo alimentar e produção de flavonoides totais	33

MATERIAL E MÉTODOS.....	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	41
RESUMO	42
REFERÊNCIAS.....	42
CAPITULO II – Efeito da herbivoria na indução de mecanismos de defesa em soja isolinhas BRS 284 e BRS 1001 IPRO e no desenvolvimento biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae)	47
RESUMO	48
ABSTRACT.....	49
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
CAPITULO III – Diferenças no perfil de compostos fenólicos constitutivos de cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO via análises cromatográficas por HPLC.....	76
ABSTRACT.....	77
INTRODUÇÃO.....	78
MATERIAL E MÉTODOS.....	79
RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
CONCLUSÃO	82
RESUMO	82
REFERÊNCIAS	83
FIGURAS DO APÊNDICE.....	86

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPITULO I	
Tabela 1 - Quantificação de flavonoides (mg g^{-1} de rutina) em folíolos de cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO coletados após herbivoria por <i>Spodoptera frugiperda</i> (Noctuidae) ou injúria mecânica em plantas cultivadas em casa de vegetação (28 ± 2 °C) e coletadas em diferentes tempos. Campo Grande, MS, fevereiro de 2016.	39
CAPITULO II	
Tabela 1 - Duração (\pm erro-padrão) da fase larval de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep.: Noctuidae) alimentadas com folhas de soja das cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO (25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$, fotofase de 12 h).	59
Tabela 2 - Duração (\pm erro-padrão) da fase pupal de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep. Noctuidae) alimentadas com folhas de soja das cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO (25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$, fotofase de 12 h).	61
Tabela 3 - Peso (\pm erro-padrão) de pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep.: Noctuidae) alimentadas com folhas de soja das cultivares BRS 284 BRS e 1001 IPRO (25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$, fotofase de 12 h).	63
Tabela 4 - Número médio (\pm erro-padrão) de ovos de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep.: Noctuidae) alimentadas com folhas de soja das cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO (25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$, fotofase de 12 h).	65
Tabela 5 - Fêmeas férteis e viabilidade de ovos (\pm erro padrão) de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep.: Noctuidae) alimentadas com folhas de soja das cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO (25 ± 2 °C, U.R. $60\% \pm 10\%$, fotofase de 12 h).	66

Tabela 6 - Quantificação de compostos fenólicos em folíolos das cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO coletados após injúria mecânica e herbivoria por *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae), em plantas cultivadas em casa de vegetação (28 ± 2 °C) e coletadas em diferentes tempos. Campo Grande, MS, fevereiro de 2016. 68

CAPITULO III

Tabela 1 - Compostos identificados e quantificados em amostras de cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO por análise de HPLC, cultivadas em casa de vegetação, mantidas em Temp. de 28 °C. Jan. Fev. 2016, Campo Grande, MS81

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPITULO I	
Figura 1 - Área foliar (cm ²) consumida por lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas por 24 h com folhas de soja das cultivares isolinhas BRS 284 e BRS 1001 IPRO previamente submetidas a injúria mecânica ou herbivoria prévia. Condições: 25 ± 2 °C; umidade relativa: 60% ± 10%; fotofase de 12 h.	38
CAPITULO II	
Figura 1 - Viabilidade da fase larval (%) (eixo y) de <i>S. frugiperda</i> em tratamentos com injúria mecânica e herbivoria prévia em soja cultivares BRS 286 e BRS 1001 IPRO a 25 ± 2 °C, U.R. 60 ± 10% e fotofase de 12 horas.....	57
Figura 2 - Viabilidade da fase pupal (%) (eixo y) de <i>S. frugiperda</i> em tratamentos com injúria mecânica e herbivoria prévia em soja cultivares BRS 286 e BRS 1001 IPRO a 25 ± 2 °C, U.R. 60 ± 10% e fotofase de 12 horas.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância

Bt - *Bacillus thuringiensis*

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CV% - Coeficiente de Variação

$p >$ - Probabilidade

PVC - Policloreto de polivinila

R5 - Início do enchimento das sementes, estágio reprodutivos

R6 - Pleno enchimento das vagens, estágio reprodutivos

S - Sul

SIARCS - Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo

spp - Várias espécies do gênero

U.R. - Umidade Relativa

V6 - Estádio vegetativo da soja (Vn é o último nó, no topo da planta, com folha completamente desenvolvida).

W - Oeste

FIGURAS DO APÊNDICE

	Página
Figura 1. Tratamentos de cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO dentro da casa de vegetação	86
Figura 2. Tratamentos de cultivares de soja BRS 284 dentro da casa de vegetação com gaiolas para contenção de <i>Spodoptera frugiperda</i> no tratamento herbivoria prévia	86
Figura 3. <i>Spodoptera frugiperda</i> sendo colocadas nas gaiolas no tratamento herbivoria prévia dentro da casa de vegetação	87
Figura 4. Trifólios de soja sendo acondicionado em envelope de alumínio, previamente rotulado e submetido a atmosfera de nitrogênio, para análise química	87
Figura 5. Trifólio de <i>Glycine max</i> com injúria mecânica na casa de vegetação	88
Figura 6 Trifólio de <i>Glycine max</i> sofrendo herbivoria de <i>Spodoptera frugiperda</i> em casa de vegetação	88
Figura 7. <i>Spodoptera frugiperda</i> individualizada em caixa tipo Gerbox para início de alimentação de <i>Glycine max</i> para avaliação de parâmetros biológicos	89
Figura 8. <i>Spodoptera frugiperda</i> individualizada alimentando-se de folha de <i>Glycine max</i> em caixa tipo Gerbox para avaliação de parâmetros biológicos.....	89
Figura 9. Gaiolas com casais de <i>Spodoptera frugiperda</i> para avaliação da reprodução	89
Figura 10. Amostras sendo extraídas com solução hidrometanólica por percolação	89
Figura 11. Layout da casa de vegetação com os tratamentos.....	91

RESUMO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), praga-chave do milho, pode atacar lavouras de soja, causando prejuízos aos agricultores. Por meio de análises químicas e ensaios biológicos, buscou-se avaliar o efeito da herbivoria prévia por *S. frugiperda* em soja das isolinhas transgênica *Bt* e não transgênica no desenvolvimento de *S. frugiperda* alimentadas com folhas submetidas a herbivoria prévia pela mesma espécie. Em casa de vegetação, cultivares das isolinhas BRS 1001 IPRO transgênica e BRS 284 convencional foram plantadas em vasos e utilizadas no estágio vegetativo V6 em tratamentos de injúria mecânica e herbivoria de *S. frugiperda*, além de grupos-controle. Para a herbivoria, utilizaram-se lagartas de 10 dias que foram alimentadas em laboratório com folíolos de soja oriundos de casa de vegetação, em quatro grupos para cada cultivar semeada: injúria mecânica; herbivoria, controle mantido na mesma sala dos tratamentos e um segundo controle mantido em sala individualizada. Procedeu-se a 25 repetições nos tratamentos de avaliação de consumo foliar e 50 repetições por tratamento de avaliação do efeito biológico. Analisaram-se as seguintes variáveis: consumo foliar, mortalidade das fases de lagarta e pupa, duração larval e pupal, peso pupal, número de ovos por fêmea e viabilidade dos ovos. Nas plantas que sofreram herbivoria prévia constatou-se menor consumo foliar, maior duração larval e pupal, maior mortalidade larval e pupal, menor peso pupal, menor viabilidade de ovos e menor número de fêmeas férteis, em comparação com controles. Observou-se maior duração da fase pupal e maior número de fêmeas férteis com a cultivar BRS 1001 IPRO e maior viabilidade de ovos com a BRS 284. Em nenhuma das cultivares se observou diferenças no consumo por controles mantidos em sala individualizada e controles mantidos no mesmo ambiente que os tratamentos. Não houve diferenças entre as duas cultivares quanto a seis compostos produzidos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, quercetina e luteolina), mas a cultivar BRS 1001 IPRO produziu maior quantidade de rutina. A herbivoria prévia causou aumento de flavonoides após 24 h em ambas as cultivares e após 192 h na BRS 284, e aumento de compostos fenólicos em

24 e 192 h na cultivar BRS 284, ao passo que a injúria mecânica elevou os flavonoides após 192 h e aumento de compostos fenólicos decorridas 24 h na cultivar BRS 1001 IPRO. Os achados biológicos e químicos sugerem ocorrer maior resposta metabólica defensiva pela planta após o ataque da lagarta.

Palavras-chave: Insecta, lagarta-do-cartucho, resistência induzida, soja transgênica *Bt*.

ABSTRACT

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), a key corn pest, can attack soybean crops, causing damage to farmers. The objective of this study was to evaluate the effect of herbivory on *S. frugiperda* in soybeans from *Bt* and non-transgenic isolates in the development of *S. frugiperda* fed with leaves submitted to previous herbivory by the same species. In a greenhouse, cultivars of isolates BRS 1001 IPRO transgenic and BRS 284 conventional were planted in pots and used in vegetative stage V6 in treatments of mechanical and herbivory injury of *S. frugiperda*, in addition to control groups. For herbivory, 10 day caterpillars were used in laboratory with soybean leaflets from greenhouse, in four groups for each cultivar seeded: mechanical injury; herbivory, control maintained in the same treatment room and a second control maintained in an individualized room. Twenty-five replications were carried out in the foliar consumption evaluation treatments and 50 replicates per treatment of biological effect evaluation. The following variables were analyzed: leaf consumption, caterpillar and pupal mortality, larval and pupal duration, pupal weight, number of eggs per female and egg viability. In the plants that underwent previous herbivory was observed lower leaf consumption, larval and pupal duration, higher larval and pupal mortality, lower pupal weight, lower viability of eggs and lower number of fertile females, in comparison with controls. It was observed a longer duration of the pupal phase and a higher number of fertile females with cultivar BRS 1001 IPRO and greater viability of eggs with BRS 284. In none of the cultivars were observed differences in the consumption by controls maintained in an individualized room and controls maintained in the same environment than the treatments. There were no differences between the two cultivars for six compounds produced (gallic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, quercetin and luteolin), but the cultivar BRS 1001 IPRO produced a greater amount of rutin. The previous herbivory caused an increase

of flavonoids after 24 h in both cultivars and after 192 h in BRS 284, and increase of phenolic compounds in 24 and 192 h in cultivar BRS 284, while mechanical injury increased the flavonoids after 192 h and increased of phenolic compounds after 24 h in BRS 1001 IPRO. The biological and chemical findings suggest that the plant's greater defensive metabolic response occurs after the caterpillar attack.

Key words: *Bt* transgenic soybean, fall armyworm, induced resistance, Insecta.

.

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da soja, principal *commodity* agrícola no Brasil, com 35,139 milhões de hectares plantados na safra 2017-2018 (CONAB, 2018), está exposta ao ataque de diferentes espécies de pragas durante seu ciclo vegetativo.

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é polífaga, atacando culturas de importância econômica, como algodão, solanáceas e outras. É praga-chave da cultura do milho e seus surtos têm ocasionado perdas significativas também no cultivo de soja.

Tem-se observado diminuição de resistência do milho *Bt* ao ataque de *S. frugiperda*, possivelmente devido a manejo incorreto da implementação de áreas de refúgio. A redução na eficácia do milho *Bt* pode estar contribuindo para a migração de *S. frugiperda* para a soja, cultivada em sucessão ao milho nas principais regiões produtoras de grãos no Brasil. Conseqüentemente, *S. frugiperda* tem se tornado uma praga importante da soja, em função da acentuada exposição dessa cultura à pressão populacional do inseto.

Monitorar e controlar *S. frugiperda* são procedimentos fundamentais para que esta praga não atinja nível de dano econômico nas culturas que sofrem seu ataque. Na soja, o controle é feito com inseticidas químicos sintéticos, que podem ter efeitos negativos, como morte de inimigos naturais das pragas, resíduos químicos nos alimentos e seleção de pragas resistentes.

Entre os métodos alternativos ao controle com inseticidas químicos, o melhoramento genético, visando a obtenção de plantas com características fenotípicas resistentes a insetos-praga, proporciona um elo fundamental para o controle de pragas.

Durante sua evolução, as plantas criaram mecanismos de defesa diretos e indiretos contra o ataque de insetos. Uma das defesas contra herbívoros consiste na

produção de metabólitos secundários que ao serem ingeridos pelos insetos prejudicam seu desenvolvimento e reprodução.

Compreender o mecanismo de defesa das plantas e suas interações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas é fundamental para o desenvolvimento e melhoramento de cultivares mais resistentes a pragas e doenças. Os estudos nessa direção têm papel relevante para o aumento da produção e produtividade das culturas no agronegócio brasileiro, que faz com que o país seja um dos principais produtores mundiais de alimentos.

Por meio do presente estudo, visou-se determinar a resposta de plantas de soja (isolinhas convencional e transgênica *Bt*) submetidas a herbivoria prévia e injúria mecânica no consumo foliar, desenvolvimento e reprodução de *S. frugiperda*, comparando os perfis químicos de extratos foliares das duas cultivares de soja.

OBJETIVOS

Investigar os efeitos da herbivoria prévia e injúria mecânica em cultivares de soja isolinhas com e sem transgenia *Bt* no consumo alimentar, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) comparando os perfis químicos de extratos foliares das duas cultivares de soja.

Objetivos específicos

- Investigar se a herbivoria por *S. frugiperda* em soja com e sem transgenia *Bt* pode igualmente induzir mecanismos de defesa distintos dos suscitados por lesão mecânica.
- Avaliar se cultivares de soja das isolinhas BRS 284 e BRS 1001 IPRO (transgênica *Bt*) apresentam respostas diferentes na indução de mecanismos de defesa.
- Realizar um estudo comparativo do perfil químico de plantas de soja da cultivar BRS 284 e de sua isolinha transgênica BRS 1001 IPRO, com abordagem baseada em cromatografia líquida de alta eficiência.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Controles de pragas agrícolas

As pragas agrícolas são um dos fatores limitantes para o desenvolvimento econômico das grandes culturas do agronegócio brasileiro, reduzindo a produção agrícola e a qualidade do produto final. Na soja, as pragas desfolhadoras causam enormes prejuízos, por vezes desastrosos, caso não se proceda a controle quando se atinge nível de dano econômico.

Segundo o IBGE (2018), foram plantadas no Brasil 73,6 milhões de hectares de lavoura temporária no período de 2017. Pignati et al. (2017) analisaram 21 cultivos brasileiros no período de 2015 (71,2 milhões de hectares de lavouras), predominando entre estes a soja, com 42% de toda área plantada do país, seguida do milho, com 21%, e da cana-de-açúcar, com 13%. Estas três culturas, que perfizeram 76% de toda a área plantada em território brasileiro, foram as que mais consumiram agrotóxicos: 82% de todo o consumo do país em 2015, com estimativa de utilização de 899 milhões de litros de agrotóxicos em produtos formulados (PIGNATI et al., 2017).

Para a próxima década, as projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento apontam um aumento de 29,4% na produção de grãos e de 14,8% para a área de plantio, estimando-se que em 2025 teremos uma produtividade aproximada de 4 t/ha (SCHUMACHER et al., 2016).

No Brasil a soja foi a cultura que mais utilizou agrotóxicos, em levantamento realizado em 2015 (PIGNATI et al., 2017), representando 63% do total, seguida do milho (13%) e da cana-de-açúcar (5%). O fumo foi a cultura que usou a maior quantidade média de litros por hectare (60 l/ha), seguida do algodão (28,6 l/ha), dos cítricos (23 l/ha), do tomate (20 l/ha), da soja (17,7 l/ha), da uva (12 l/ha), da banana,

arroz, trigo e mamão (10 l/ha cada) e do milho e girassol (7,4 l/ha cada). As demais culturas agrícolas utilizaram menos 5 l/ha plantado.

Em décadas passadas buscou-se obter produtos que permanecessem no ambiente por longo tempo e fossem eficazes, de modo a afetar várias gerações do inseto-alvo. Com as mudanças de concepção, voltadas à preservação do meio ambiente, passou-se a considerar mais racional o combate aos insetos no período de maior incidência, minimizando assim o impacto sobre outros animais e o homem (VIEGAS JUNIOR, 2003).

O uso abusivo de agrotóxicos tem consequências negativas sobre o ambiente, uma das quais é o desaparecimento de algumas espécies de insetos úteis. Além disso, provocam o surgimento de populações de insetos resistentes e de novas pragas resistentes aos inseticidas, levando os produtores a usar produtos cada vez mais tóxicos.

A resistência adquirida e a poluição ambiental decorrentes da aplicação repetida de inseticidas sintéticos persistentes têm levado a um crescente interesse em novos produtos para o controle de pragas. Entretanto, inseticidas sintéticos, como os hidrocarbonetos clorados, os ésteres organofosforados, os carbamatos e os piretroides sintéticos, continuam a contribuir para a produção mundial de alimentos nas últimas décadas (VIEGAS JUNIOR, 2003).

Entre as formas de controle disponíveis para manejo integrado de pragas estão os entomopatógenos e os insetos parasitoides, que englobam diferentes segmentos do controle biológico de pragas. Conforme Pelizza et al. (2018), na Argentina, terceira maior produtora de soja, o controle biológico de insetos-praga utilizando patógenos, parasitas e predadores tem recebido atenção especial nos últimos anos.

Segundo Jaronski (2010), no entanto, uma desvantagem em usar microrganismos entomopatogênicos em programas de controle de pragas agrícolas é o longo tempo necessário para matar o inseto-alvo. A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, porém, é reconhecida por sua eficiência em controlar lagartas, ao produzir uma toxina que provoca a morte destas em alguns dias. Conforme Lacey et al. (2015), dos vários agentes de controle produzidos comercialmente, *B. thuringiensis* tem mais de 50% de participação no mercado e vem se mostrando altamente eficaz no manejo de pragas do milho e do algodão, reduzindo drasticamente

a quantidade de inseticidas químicos de amplo espectro, além de ser seguro para os consumidores e organismos não alvo.

Variedades de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos

Com o desenvolvimento da biotecnologia, o uso de genes que codificam proteínas com atividade inseticida tornou-se uma alternativa viável e importante para o controle de pragas com amplo potencial de causar prejuízos (SILVA FILHO; FALCO, 2000) nas principais culturas do agronegócio nacional, como soja, algodão e milho, entre outras.

As plantas transgênicas *Bt* foram desenvolvidas recombinando-se seu DNA entre os genes da bactéria *B. thuringiensis*, obedecendo à sequência do DNA vegetal. Dessa forma, a planta modificada expressa em seu fenótipo proteínas que intoxicam as lagartas, levando-as à morte (MARTINELLI; OMOTO, 2005). Mais de 100 genes da toxina *Bt* foram clonados e sequenciados, fornecendo uma matriz de proteínas que pode ser expressa em plantas ou em aplicações foliares de produtos *Bt* (FRUTOS; RANG; ROYER, 1999).

Segundo Betz et al. (2000), as plantas *Bt* têm mostrado vantagens sobre os biopesticidas, pois a eficiência da produção de proteínas *Cry* pelas plantas *Bt* não é afetada por fatores ambientais, como chuva após a aplicação, incidência de radiação solar e altas temperaturas. Adicionalmente, as proteínas *Cry* recombinantes tendem a se acumular nos tecidos vegetais mais homoganeamente, tornando mais eficiente o efeito tóxico aos insetos do que a aplicação (pulverização) de esporos de *Bt* sobre as plantas (BOBROWSKI et al., 2003).

Segundo Huang, Andow e Buschman (2011), embora as culturas transgênicas *Bt* tenham se tornado importantes para o manejo das principais pragas de soja, milho e algodão, o desenvolvimento de resistência continua a ser uma grande ameaça para o uso sustentável dessas culturas, sendo crucial o manejo correto dessa tecnologia para diminuição da resistência ao milho *Cry1Ab* e ao algodão *Cry1Ac* nos Estados Unidos.

No Canadá, implementou-se a estratégia denominada “alta dose/refúgio”, voltada a retardar substancialmente a evolução da resistência das pragas à tecnologia

Bt (HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011). Tabashnik (1994) sugere que a dose alta deva ser definida como 25 vezes a concentração de toxina necessária para matar as larvas sensíveis a *Bt*.

A piramidação de genes associada à alta dose/refúgio torna a evolução da resistência mais lenta. A piramidação é empregada em plantas transgênicas para produzir duas ou mais toxinas *Bt* com diferentes modos de ação sobre a mesma praga-alvo (SHELTON; ZHAO; ROUSH, 2002). Segundo Lombardo, Coppola e Zelasco (2016), a piramidação de genes resultou na chamada "segunda geração" de plantas geneticamente modificadas, que combinam características desejáveis por meio de tecnologia de DNA recombinante ou reprodução convencional, com cruzamentos entre plantas transgênicas que apresentam diferentes características biotecnológicas.

Assim, a evolução da resistência de insetos-alvo permanece como principal desafio para a implantação sustentável de cultivos que expressam proteínas *Bt* (TABASHNIK; BREVAULT; CARRIERE, 2013). Segundo Bernardi et al. (2014), a soja geneticamente modificada, que perfaz mais de 94% da cultura plantada brasileira, não apresenta eficiência contra *S. frugiperda*, que tem baixa suscetibilidade à proteína *Cry1Ac* (tecnologia GM exclusiva disponível para controle da lagarta da soja *Anticargia gemmatalis*). Requer-se avanço das pesquisas para que em futuro próximo se alcance controle eficiente de *S. frugiperda* em soja com esta tecnologia.

Os cuidados e recomendações técnicas sobre a tecnologia *Bt* devem ser seguidos, visando retardar ao máximo sua perda de eficiência. Problemas de quebra de resistência têm sido relatados. Bedin et al. (2015) avaliaram a eficiência dos eventos transgênicos em plantas de milho com a tecnologia Herculex®, VT Pro™ e Powercore™ no controle da *S. frugiperda*, concluindo que nenhum dos híbridos era resistente.

Um dos grandes benefícios da tecnologia *Bt* é a ausência de efeito sobre inimigos naturais dos insetos-praga, como parasitoides ou predadores. Estudos em laboratório e a campo revelaram pouco ou nenhum efeito sobre estes organismos (WRAIGHT et al., 2000). Os inimigos naturais são extremamente importantes, pois as pragas secundárias podem tornar-se um problema caso a população de insetos benéficos seja reduzida pelo uso de inseticidas químicos de amplo espectro (BOBROWSKI et al., 2003).

Uma abordagem para a seleção de novos inseticidas que preencham os requisitos de eficácia, segurança e seletividade consiste no estudo de mecanismos de defesa de plantas (VIEGAS JUNIOR, 2003). Novas alternativas são fundamentais para um eficiente controle de pragas, que possibilite viabilidade econômica e maior segurança para produtores e consumidores finais, não afetando inimigos naturais e tendo reduzido efeito negativo sobre o ambiente.

Segundo Shelton, Zhao e Roush (2002), nenhuma tecnologia, nova ou antiga, está isenta de apresentar dúvidas e controvérsias. Para a biotecnologia, tida como terceira maior revolução tecnológica, é apropriado que não somente as questões técnicas, mas também sociais, que envolvam diálogo, sejam discutidas.

O relato de problemas biotecnológicos mudou drasticamente a partir de 1997. A comunidade científica tem a responsabilidade de fornecer à sociedade informações sobre os aspectos positivos e negativos dessa tecnologia, de modo a reduzir o sentimento de desinformação que paira entre a maior parte da população (SHELTON; ZHAO; ROUSH, 2002).

Schumacher et al. (2016) apontam que dentre os 17.053 pedidos de patente para inseticidas depositados no mundo, 1.528 foram depositados no Brasil, grande consumidor de defensivos agrícolas. Os autores salientam, entretanto, que não se destacou nenhum pedido de origem brasileira e que a maior parte dos depósitos no país não é de origem nacional. Isso mostra ser necessário maior investimento em pesquisa e desenvolvimento, com incentivos governamentais para que o país avance em pesquisas nessa área e reduza seu déficit comercial.

Descrição e biologia de *Spodoptera frugiperda*

Conhecida como lagarta-do-cartucho do milho, *S. frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada de origem tropical, devido a seus centros de imigração se localizarem nos trópicos (LABRADOR, 1967).

De acordo com Moscardi et al. (2012), as lagartas de *Spodoptera* spp. têm grande importância econômica por sua voracidade. *Spodoptera frugiperda* tem na cultura do milho seu principal hospedeiro. O sucesso dessa espécie como praga é consequência da elevada capacidade de dispersão dos adultos ao longo da faixa de

distribuição de suas plantas hospedeiras (SPARKS, 1979). Seus surtos têm ocasionado perdas significativas em culturas como algodão, soja e solanáceas (LUGINBILL, 1928; LATORRE, 1990; CAPINERA, 2002; BASTOS; TORRES, 2004), além de utilizar hospedeiros alternativos para se manter nos agroecossistemas ao longo do ano.

Seu desenvolvimento é favorecido por tempo seco e chuvas abundantes (LUNGINBILL, 1928), sendo que a temperatura influencia diretamente todas as fases de seu ciclo biológico. Em condições de laboratório, o período de incubação é menor em temperaturas mais altas, prolongando-se nas mais baixas, mas 25 °C é a temperatura mais favorável a seu desenvolvimento.

Segundo Cruz (1995), os ovos de *S. frugiperda* são depositados em massas, geralmente em duas camadas em grupos. Inicialmente de coloração verde-clara, mostram-se escurecidos na fase de eclosão. Não há aparentemente local preferido na planta para a postura, sendo que o número varia de 9 a 593, com médias de 143 a 250 ovos por postura/fêmea.

Os ovos de *S. frugiperda* provenientes de criação de manutenção em dieta artificial apresentam período de incubação de dois dias (GIOLO et al., 2002). Em temperaturas inferiores a 22 °C, tal período pode variar de 4 a 5 dias (REVELO; RAUN, 1964).

Seu ciclo de vida se completa em 30 dias em condições de laboratório a 25 °C e o número de ovos pode variar de 100 a 200 por postura/fêmea, sendo que um total de 1.500 a 2.000 ovos pode ser colocado por uma única fêmea. Dew (1913) estudando o desenvolvimento biológico de *S. frugiperda* em folhas de milho e algodoeiro à temperatura de 25 °C, observou que as posturas perfaziam em média 160 a 170 ovos, com período de incubação de três dias, fase larval de 14 dias e fase pupal de 10 dias, com ciclo total completado em 30 dias.

As larvas de *S. frugiperda*, comumente denominadas lagartas, são eruciformes, esbranquiçadas antes de se alimentarem e esverdeadas após a alimentação. Recém-eclodidas, têm cerca de 1,0 a 1,5 mm de comprimento, apresentam coloração branco-creme, com cabeça e cerdas pretas, e alimentam-se de maneira gregária (LEIGH et al., 1996; GONDIM et al., 1999). As mais novas consomem tecidos de folha de um só lado, deixando a epiderme oposta intacta. No desenvolvimento larval, passam por seis a sete estágios, até alcançarem completo desenvolvimento, quando medem

aproximadamente 5,0 cm de comprimento e apresentam coloração que varia de pardo-escura ou verde até quase preta. São canibais, sendo comum encontrar apenas uma lagarta por cartucho de milho.

Completado o período larval, descem ao solo, a uma profundidade aproximada de 5 a 7 cm, onde se transformam em pupas de aproximadamente 1,5 a 2,0 cm de comprimento. As pupas são marrom-avermelhadas, tornando-se progressivamente mais escuras, até ficarem praticamente pretas, próximo à emergência do adulto (CRUZ, 1995). O período pupal varia de 10 a 12 dias, terminando com a emergência do adulto. Nessa fase é possível separar os sexos com base em caracteres sexuais externos. Waquil et al. (2008) e Sá et al. (2009) constataram período larval de 14 dias para *S. frugiperda* alimentadas em braquiária, sorgo e soja e de 12 dias para alimentação em milho, estendendo-se até o 17º dia no caso de dieta artificial. Em recente estudo de nosso grupo de pesquisa (PERUCA et al., 2018), observamos médias de duração larval de 19,36 dias e pupal de 10,18 dias, bem como peso pupal médio de 191,33 mg para *S. frugiperda* alimentadas em laboratório com folhas de soja da cultivar BRS 284.

O adulto de *S. frugiperda* é uma mariposa com 25 mm de comprimento e cerca de 30 a 35 mm de envergadura. Os machos apresentam asas anteriores marrom-acinzentadas, orbiculares, cobertas por uma faixa branca larga transversal que alcança o meio da asa, além de uma mancha reniforme demarcada de branco e outra apical também branca, com faixa subterminal nítida. Nas fêmeas, as asas apresentam a mesma coloração dos machos, com manchas orbiculares e reniformes delineadas de branco. As asas posteriores são esbranquiçadas e hialinas nos dois sexos (ZUCCHI et al., 1993).

Segundo Dew (1913), as mariposas ovipositam noturnamente sobre folhas de milho, algodoeiro, gramíneas e outros vegetais que sejam alimento adequado às lagartas.

Substâncias secundárias e resistência induzida

As plantas, ligadas ao solo por meio de seu sistema radicular, não podem escapar de seus estressores bióticos e abióticos, desenvolvendo métodos particulares

de proteção. A produção de produtos químicos que detêm ou matam pragas e patógenos constitui meio de autoproteção vegetal, além da proteção física e morfológica. O padrão de metabólitos secundários em uma dada planta é complexo e pode diferir conforme o tipo de tecido e órgão. Órgãos importantes para a sobrevivência e reprodução produzem os metabólitos secundários mais potentes e em maiores concentrações (WINK, 1988; 2003).

Segundo Sequeira (1983), a resistência induzida é a que depende apenas de fatores presentes depois que o hospedeiro é desafiado pelo patógeno ou herbívoro, entre outros agressores. Resistência induzida é o oposto de resistência constitutiva. De acordo com Lin e Kogan (1990), resistência induzida é o aumento quantitativo ou qualitativo dos mecanismos de defesa em resposta a estímulos intrínsecos e/ou extrínsecos, como aqueles provocados por herbivoria, patógenos e injúria mecânica, por exemplo.

As plantas não dispõem de um sistema imunológico que impeça a invasão de parasitas, nem a capacidade de construir memória de sua interação com microrganismos patogênicos encontrados em seu hábitat. No entanto, as plantas desenvolveram características únicas para proteger-se de agentes patogênicos (JONES; DANGL, 2006), tais como a cutícula (camada externa cerosa) e a periderme (tecido protetor secundário), que atuam como barreiras que reduzem a perda de água e dificultam a entrada de bactérias e fungos. Além destas barreiras há grupos de compostos vegetais, como os metabólitos secundários, voltados à defesa contra agressores como herbívoros e microrganismos patogênicos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Pichersky e Gang (2000) definem metabólito secundário como um composto cuja biossíntese é restrita a grupos de plantas selecionados. A capacidade de sintetizá-los resultou de seleção no curso de evolução das plantas e herbívoros. Há compostos que atendem a necessidades específicas, como é o caso de perfumes florais voláteis e pigmentos que atraem insetos polinizadores. Outros produtos químicos foram ganhos evolutivos desenvolvidos para afastar patógenos e herbívoros ou suprimir crescimento de plantas vizinhas. Assim, as soluções químicas para um problema comum são muitas vezes distintas em diferentes linhagens vegetais (PICHERSKY; GANG, 2000).

Taiz e Zeiger (2009) comentam que os metabólitos secundários diferem dos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e acil-lipídios) por apresentarem

distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, os metabólitos secundários específicos são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas, enquanto os primários são encontrados em todo o reino vegetal. Os metabólitos secundários vegetais podem ser divididos em três grupos principais quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados.

Alguns compostos secundários não têm ocorrência natural nas plantas, mas podem ser produzidos quando estas são injuriadas por um inseto, ou seja, no momento em que este inicia sua alimentação (resistência induzida) (LARA, 1991).

As estratégias de defesa contra a herbivoria por insetos abrangem duas categorias: respostas de defesa constitutivas e respostas de defesa induzidas. Segundo Melo e Silva-Filho (2002), as substâncias constitutivas repelem os herbívoros provocando toxicidade direta ou reduzindo a digestibilidade do tecido vegetal, ao passo que as substâncias induzidas são sintetizadas em resposta ao dano causado ao tecido pelos herbívoros.

Segundo Gatehouse (2002), muitas espécies vegetais também acumulam compostos inseticidas e proteínas como defesa "estática" ou constitutiva contra insetos herbívoros. Em determinada espécie, um mesmo produto inseticida pode participar da defesa induzida e da constitutiva. A produção de compostos defensivos pelas plantas tem um custo metabólico, e o equilíbrio entre defesas induzidas e constitutivas pode ser alterado pelo genótipo e pelo ambiente (GATEHOUSE, 2002).

Feeny (1976) desenvolveu um modelo de alocação para metabólitos secundários: o modelo de aparências (baseado em uma noção do risco enfrentado pelas plantas), que divide as plantas entre as que provavelmente serão especializadas em herbívoros (plantas que são aparentes) e aqueles que não o são: plantas "inaparentes", efêmeras em sua distribuição, mais propensas a evitar a detecção por insetos especialistas e que podem arcar com defesas que operam em baixas concentrações e são mobilizadas para reutilização.

Wink (1988), analisando dados disponíveis sobre a ecologia química de metabólitos secundários, concluiu que estes compostos podem de fato contribuir para a proteção de planta contra microrganismos e herbívoros, em combinação com outras características químicas e morfológicas.

Segundo Wenzel (1985), na seleção de variedades vegetais resistentes os metabólitos secundários são fundamentais nas pesquisas sobre a defesa contra insetos, visando o melhoramento genético de plantas.

Estratégias de resistência das plantas a insetos

Os insetos herbívoros apresentam diferentes estratégias de alimentação que conduzem a diferentes quantidades e qualidades de danos mecânicos nos tecidos vegetais. De acordo com Aguiar-Menezes e Menezes (2005), cerca de 50% das mais de 1.115.000 espécies de insetos descritas são herbívoras.

Segundo Gatehouse (2002), as estratégias empregadas pelas plantas para tentar resistir a seus herbívoros ou afastá-los são muito diversas. Algumas espécies acumulam altos níveis de compostos que funcionam como defesas bioquímicas por toxicidade ou por outras propriedades. Outras não comprometem recursos para a acumulação de compostos defensivos, mas procuram minimizar danos de herbívoros através do rápido crescimento e desenvolvimento, ou por mecanismos de dispersão ou escolha de hábitat (GATEHOUSE, 2002).

Mesmo em uma mesma espécie, diferentes genótipos adotam estratégias sutilmente diferentes para coexistir com pragas de insetos. Tais estratégias podem afetar a partição de recursos entre crescimento e defesa (JANDER et al., 2001).

Algumas espécies desenvolvem características que afetam a preferência do inseto, como a seleção de plantas hospedeiras e o comportamento alimentar, enquanto outras afetam aspectos de seu desempenho, como taxa de crescimento e desenvolvimento. Essas especificidades incluem características morfológicas para a defesa física e a produção de compostos de defesa química (FÜRSTENBERG-HÄGG et al., 2013).

McKey (1974) constatou que recursos destinados à defesa de plantas não são usados para crescimento ou reprodução. Theis e Lerchau (2003) observaram que durante a evolução a planta avalia o custo da defesa, com reprodução forçada resultante da alocação de recursos para a defesa.

Em estudo da resistência de plantas, Gatehouse (2002) observou que a resposta do ferimento é tanto local quanto sistêmica e que as respostas locais e sistêmicas

podem diferir qualitativa e quantitativamente. Assim, a resposta do ferimento difere da resposta a patógenos e da resistência sistêmica adquirida, embora alguns genes sejam ativados por ambas as vias.

A resposta ao ferimento envolve múltiplas vias e moléculas sinalizadoras, como o ácido jasmônico, hormônio relacionado ao estresse vegetal que ativa muitas respostas de defesa (TAIZ; ZEIGER, 2009) e está envolvido na proteção direta contra estresses bióticos e abióticos, desempenhando papel na sinalização que ativa a indução de defesa vegetal (GUNDLACH et al., 1992) e tendo função central na mediação de respostas locais. A resposta ao ferimento é específica entre a espécie agressora e planta, tanto pela presença de genes responsáveis pela produção de compostos secundários específicos quanto pela produção de proteínas potencialmente inseticidas, que diferem de espécie para espécie (GATEHOUSE, 2002).

Compostos químicos para a defesa de plantas são encontrados em vários tecidos vegetais. Tais compostos incluem antibióticos, alcaloides, terpenos e proteínas. Entre as proteínas estão incluídas as enzimas (como as quitinases), as lectinas e os inibidores de enzimas digestivas (RYAN, 1990). Segundo Smith (1996), há evidências de diferença na composição química de variedades de soja resistentes e suscetíveis a insetos.

Segundo Franco et al. (1999), a utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes contra o ataque de insetos é uma estratégia bastante promissora. Entretanto, tais inibidores devem ser selecionados levando-se em consideração a fisiologia e a bioquímica de sua digestão pelo inseto. Esses autores ressaltam ser importante combinar tais inibidores com outras proteínas que induzem estresse ou inibem o crescimento dos insetos a serem controlados.

Dentre as substâncias secundárias, compostos fenólicos tóxicos, como os ácidos clorogênico, cafeico e ferrúlico, são produzidos rapidamente e se acumulam após o ataque de insetos ou patógenos (BARROS et al., 2010). Hartleb et al. (1997) relatam que algumas formas de fenóis podem ser convertidas em derivados com radicais de oxigênio, extremamente reativos, tornando-se muito tóxicos.

Conforme Hammerschmidt (2003), os fenóis vegetais podem ser divididos em duas classes: (i) fenólicos pré-formados, sintetizados durante o desenvolvimento

normal dos tecidos vegetais, e (ii) fenólicos induzidos, sintetizados em resposta a lesão física, infecção ou quando o vegetal é estressado por elicitores abióticos como sais de metais pesados, radiação ultravioleta, temperatura etc. Os fenólicos induzidos também podem ser constitutivamente sintetizados, mas sua síntese é frequentemente aumentada sob estresse biótico ou abiótico (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; HAMMERSCHMIDT, 2003).

As plantas utilizam compostos fenólicos também para pigmentação, crescimento, reprodução, resistência a patógenos e muitas outras funções. Tais compostos formam uma das principais classes de metabólitos secundários (LATTANZIO et al., 2006).

Uma grande variedade de estruturas desses compostos já foi identificada, abrangendo fenólicos monoméricos, diméricos e poliméricos. Várias classes de fenólicos foram categorizadas com base em seu esqueleto básico: C₆ (fenol simples, benzoquinonas), C₆-C₁ (ácido fenólico), C₆-C₂ (acetofenona, ácido fenilacético), C₆-C₃ (ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas, fenilpropanos, cromonas), C₆-C₄ (naftoquinonas), C₆-C₁-C₆ (xantonas), C₆-C₂-C₆ (estilbenos, antraquinonas), C₆-C₃-C₆ (flavonoides, isoflavonoides), (C₆-C₃)₂ (lignanas, neolignanas), (C₆-C₃-C₆)₂ (biflavonoides), (C₆-C₃)_n (ligninas), (C₆)_n (catecolmelaninas) e (C₆-C₃-C₆)_n (taninos condensados) (HARBORNE, 1980; LATTANZIO; RUGGIERO, 2003).

As adaptações dos insetos para superar os efeitos das defesas da planta também podem ser constitutivas ou induzidas. Espécies de insetos com hospedeiros limitados tendem a utilizar mecanismos de adaptação constitutivos, que podem ser otimizados para hospedeiros específicos. Insetos herbívoros generalistas dependem mais de mecanismos induzidos para lidar com a variedade de compostos inseticidas e proteínas (GATEHOUSE, 2002).

Fernandes (1990), em seu trabalho sobre mecanismos de controle de insetos herbívoros, constatou que fragmentos de polissacarídeos da parede celular de plantas são liberados por dano mecânico ou por ação de enzimas secretadas pela planta hospedeira ou herbívoro durante a alimentação.

A liberação desses fragmentos sinaliza na planta hospedeira atacada a produção de medidas defensivas, como produtos químicos, que seriam contidos em vacúolos e tecidos vegetais não vivos ou transportados através de tecido condutor para ativar

células distantes do ponto de lesão (BERRYMAN, 1988), causando reação sistêmica, observada em algumas plantas (EDWARDS; WRATTEN, 1983; KUC, 1983).

Esse tipo de resposta é eliciado por endógenos ou endoelicitores que são produtos da própria planta (BERRYMAN, 1988). Elicitores exógenos (ou exoelicitores: enzimas ou toxinas secretadas pelos invasores) do organismo agressor ou fragmentos de sua pele externa liberada pela ação de enzimas vegetais dão origem a diferentes respostas da planta (MILLER; BERRYMAN; RYAN, 1986; BERRYMAN, 1988).

Comunicação entre plantas

As plantas liberam misturas complexas de compostos em vários de seus órgãos, com variação considerável da composição de voláteis entre espécies (KNUDSEN et al., 2006). Os compostos voláteis são comumente usados por herbívoros como sinais na escolha de plantas hospedeiras e localização de alimentos (TURLINGS; WACKERS, 2004; JONES; DANGL, 2006).

A indução e emissão de compostos orgânicos voláteis em resposta a danos causados por herbivoria por insetos é exemplo das funções ecológicas complexas dos metabólitos secundários na natureza, em resposta a dano mecânico. Todas as plantas emitem derivados de lipídios, como os voláteis das folhas verdes. Estes frequentemente atraem inimigos naturais (predadores ou parasitoides) do inseto atacante, que utilizam os voláteis como sinais para encontrar suas presas ou hospedeiros (TAIZ; ZEIGER, 2009). Certos voláteis emitidos por plantas infestadas podem atuar como sinais para que plantas vizinhas iniciem a expressão de genes relacionados à defesa. Os voláteis de folhas verdes agem como sinais potentes nesse processo (ARIMURA et al., 2000).

A literatura descreve várias funções das substâncias orgânicas voláteis de origem vegetal, cabendo destacar seu papel na defesa das plantas (RODA; BALDWIN, 2003; PARÉ et al., 2005; MATSUI, 2006; BALUSKA; NINKIVIC, 2010).

Em uma mesma espécie, a emissão de compostos voláteis pode variar de acordo com o herbívoro presente (DICKE et al., 1993). Essa variação fornece aos predadores do herbívoro informações valiosas sobre a identidade das presas ou hospedeiros disponíveis na planta (DELPHIA et al., 2007; ZHANG et al., 2009).

Os compostos voláteis induzidos após a herbivoria podem reduzir indiretamente o ataque do herbívoro mediante atração de insetos carnívoros (defesas indiretas). A descoberta e intenso estudo bioquímico das defesas induzidas (diretas e indiretas) vêm configurando uma nova geração de pesquisas para promover respostas vegetais ao ataque de insetos herbívoros (PINTO-ZEVALLOS; ZARBIN, 2013).

Presume-se que os predadores e parasitoides sejam seletivos ao procurar presas e hospedeiros. Considerando que essa procura é muitas vezes guiada por voláteis liberados por plantas sob o ataque de herbívoros, a seleção tem início na percepção desses voláteis, detectados olfativamente pelas antenas de insetos carnívoros (GOUINGUENÉ et al., 2005).

Segundo Pinto-Zevallos e Zarbin (2013), utilizar armadilhas com compostos voláteis sintéticos, induzir a preparação da planta a futuros ataques ou desenvolver plantas transgênicas que emitam constitutivamente compostos voláteis induzidos, atraindo inimigos naturais ou repelindo outros herbívoros (BEALE et al., 2006), são abordagens que já vêm sendo testadas, visando o desenvolvimento de estratégias de controle de pragas agrícolas.

Em resposta ao ferimento e/ou alimentação de insetos, o ácido linolênico é liberado dos lipídios da membrana celular vegetal e convertido enzimaticamente em ácido jasmônico, que por sua vez causa ativação transcricional de genes que codificam inibidores de proteinase e de enzimas envolvidas na produção de compostos voláteis ou de compostos secundários como a nicotina e numerosos compostos fenólicos, bem como outras substâncias relacionadas à defesa (KARBAN; BALDWIN, 1997; WASTERACK; PARTHIER, 1997; BOLAND et al., 1999).

Theis e Lerdau (2003) relatam que as mudanças evolutivas podem ocorrer simultaneamente em vários níveis de organização e que as alterações na sequência e/ou arquitetura genética podem ter profunda influência funcional. Tais mudanças podem ocorrer alterando-se as concentrações de terpenos, sem alteração direta nos genes que codificam terpenossintases, razão que está por trás da complexidade e significativo papel que os terpenoides voláteis desempenham na sinalização entre organismos. Uma das mais promissoras áreas atuais de investigação é a do uso de plantas induzidas por terpenos como sinalizadoras para atrair insetos predadores.

Plantas de soja modificadas geneticamente para o controle de insetos

De forma geral, as cultivares de soja são agrupadas em convencionais, transgênicas com tolerância ao herbicida glifosato (RR), transgênicas com tolerância ao glifosato e controle de um grupo de lagartas (Intacta RR2 PRO™) e transgênicas com tolerância a herbicidas do grupo das imidazolinonas (PIPOLO et al., 2015).

Segundo Bernardi et al. (2012), a primeira liberação de uma planta de milho transgênica no Brasil ocorreu em 2007, com o evento YieldGard®, que expressa a proteína *Cry1Ab* de *B. thuringiensis*, sendo aprovado em 2010 o primeiro evento de soja resistente a insetos: a soja MON 87701 × MON 89788 (*Bt/RR2*), *Glycine max* (L.) Merrill, com genes que codificam a expressão da proteína *Cry1Ac* de *B. thuringiensis* (*Bt*) e a proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfatossintase (EPSPS) de *Agrobacterium* sp., que confere tolerância a glifosato.

Essa tecnologia se baseia na ação de bactérias entomopatogênicas que ao serem ingeridas pelos insetos causam problemas digestivos, ocasionando a morte. Segundo Praça et al. (2004), ao ingerir cristais de *B. thuringiensis* as larvas de insetos suscetíveis sofrem ação do pH intestinal e de proteases que solubilizam esses cristais e ativam toxinas que se ligam a receptores localizados no tecido epitelial do intestino da praga, quebrando o equilíbrio osmótico da célula, que se intumescce e rompe, extravasando o conteúdo intestinal para a hemocele do inseto. Consequentemente, a larva deixa de se alimentar, entra em paralisia geral e morre por inanição ou septicemia (PRAÇA et al., 2004).

A soja Intacta RR2 PRO evento MON 89788 traz uma modificação para a expressão do gene *cp4 epsps* através do uso do promotor do vírus mosaico da escrofulária, resultando em melhor expressão do gene inserido no DNA da soja pelo uso de *Agrobacterium tumefaciens*, sendo esta cruzada convencionalmente com a soja resistente a insetos, evento MON 87701 que teve a introdução do gene *Cry1Ac* oriundo de *B. thuringiensis* em seu DNA com mediação de *A. tumefaciens*, permitindo a expressão do gene em toda a planta (CTNBio, 2010).

Segundo Bobrowski et al. (2003), além dos genes bacterianos, genes de várias outras origens têm sido introduzidos em plantas visando o aumento da resistência a danos causados por insetos. Entre os genes de resistência oriundos de plantas,

incluem-se os inibidores de proteinases, como por exemplo CII de soja (*soybean serine-proteinase inhibitor*), OC-I de arroz (*rice cysteine-proteinase inhibitor*) e Pot PT-I e II de batata (*potato proteinase inhibitor I e II*); inibidores de α -amilases obtidos a partir do feijão ou de cereais; lectinas e quitinases (SCHULER et al., 1998).

“Os trabalhos a seguir foram elaborados segundo as normas:

Capitulo I da **Revista Biologia tropical**;

Capitulo II da **Revista Ciência Rural**;

Capitulo III da **Revista Bioscience Journal**.”

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-MENEZES, E. L.; MENEZES, E. B. Bases Ecológicas das Interações entre Insetos e Plantas no Manejo Ecológico de Pragas Agrícolas. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Ed.). **Agroecologia: Princípios e técnicas para uma agricultura orgânica Sustentável**. Brasília, DF; Embrapa Informação Tecnológica, p. 323-339, 2005.
- ARIMURA, G. et al. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. **Nature**, 406 (6795): 512, 2000.
- BALUSKA, F.; NINKOVIC, V. Plant communication from an ecological perspective. In: BALUSKA, F.; N. VELEMIR (ed). **Signaling and Communication in Plants**. Springer Science and Business Media, New York, 252 p, 2010.
- BARROS, E. M.; TORRES J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, 39: 996-1001, 2010.
- BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas à fitopatógenos. **Bioscience Journal**, 26(2), 2010.
- BASTOS, C. S.; TORRES, J. B. Os perigos às escondidas. **Revista Cultivar**, 60: 10-13, 2004.
- BEALE, M. H. et al. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103 (27): 10509-10513, 2006.
- BEDIN, F. A. et al. Eficiência de eventos transgênicos de resistência a insetos em soja e milho. **Revista Cultivando o Saber**, 8: 201-214, 2015.

- BERRYMAN, A. A. Towards a unified theory of plant defense, pp. 39-55. In MATTSON, W. J.; LEVIEUX, J.; BERNARD DAGAN, C. [eds.], **Mechanisms of woody plant defenses against insects: search for pattern**. Springer-Verlag, New York, 1988.
- BERNARDI, O. et al. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701× MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, 68 (7): 1083-1091, 2012.
- BETZ, F. S.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory, Toxicology and Pharmacology**, San Diego, 32: 156-173, 2000.
- BOBROWSKI, V. L. et al. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência rural**. Santa Maria. 33 (5): 843-850, set./out., 2003.
- BOLAND, W.; KOCH, T.; KRUMM, T.; PIEL, J.; JUX, A. Induced biosynthesis of insect semiochemicals in plants. In: Chadwick DJ, Goode JA, eds. **Insect-plant interactions and induced plant defence**. Chichester, New York: Wiley, 110–131, 1999.
- CAPINERA, J. L. Handbook of vegetable pests. Academic Press. San Diego, CA, 2002.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de grãos**. Nono levantamento junho 2018. 5 (9): 136-142, 2018.
- CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Embrapa Milho e Sorgo- Circular Técnica nº 21 (INFOTECA-E), p. 7-12, 1995.
- CTNBIO - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Parecer Técnico Nº 2542/2010**. Banco de dados, Brasília, DF, 2010. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/documents/566529/686342/Extrato+de+Parecer+n%C2%BA%202542.2010.pdf/3f5030f6-c71d-4999-9504-72239fc4f9c4?version=1.0>>. Acesso em: 24 junho. 2018.
- DELPHIA, C. M.; MESCHER, M. C.; MORAES, C. M. Induction of plant volatiles by herbivores with different feeding habits and the effects of induced defenses on

- host-plant selection by thrips. **Journal of chemical ecology**, 33 (5): 997-1012, 2007.
- DEW, J. A. Fall armyworm *Laphygma frugiperda* (S. e A.). **Journal of Economic Entomology**. 6: 361-366, 1913.
- DICKE, M. et al. Herbivore-induced plant volatiles mediate plant–carnivore, plant–herbivore and plant–plant interactions: talking plants revisited. In *Plant Signals in Interactions with Other Organisms* (Schultz, J. and Raskin, I., eds), p. 182–196, **American Society of Plant Physiologists**, 1993.
- EDWARDS, P. J.; WRATTEN, D. Wound induced defenses in plants and their consequences for patterns of insect grazing. **Oecologia** (Berl.) 59: 88-93, 1983.
- FEENY, P. Plant apparency and chemical defense. Pages 1–40 in J Wallace, R Mansell, eds. **Biochemical interactions between plants and insects**. Plenum, New York, 1976.
- FERNANDES, G. W. Hypersensitivity: a neglected plant resistance mechanism against insect herbivores. **Environmental Entomology**, College Park, 19: 1173-1182, 1990.
- FRANCO, O. L. et al. Resistência de plantas a insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 10: 36-40, 1999.
- FRUTOS, R; RANG, C; ROYER, M. Managing resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology**. 19:227–76, 1999.
- FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant defense against insect herbivores. **International journal of molecular sciences**, 14(5): 10242-10297, 2013.
- GATEHOUSE, John A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New phytologist**, 156 (2): 145-169, 2002.
- GIOLO, F. et al. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. **Current Agricultural Science and Technology**, 8 (3): 220, 2002.

- GONDIM, D. M. C et al. **Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil**. Boletim Técnico 333. ed. COODETEC, Cascavel, PR, 1999.
- GOUNGUENÉ, S. et al. Antennal electrophysiological responses of three parasitic wasps to caterpillar-induced volatiles from maize (*Zea mays mays*), cotton (*Gossypium herbaceum*), and cowpea (*Vigna unguiculata*). **Journal of chemical ecology**, 31 (5): 1023-1038, 2005.
- GUNDLACH, H.; MILLER, M. J.; KUTCHAN, T. M.; ZENK, M. H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 89: 2389-2393, 1992.
- HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexin accumulation: Response or defense. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 62: 125-126, 2003.
- HARBORNE, J. B. **Secondary Plant Products**, Bell, EA and Charlwood, BW (Eds), Enciclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 8, Springer-Verlag, Berlin, 329, 1980.
- HARTLEB, H.; HEITEFUSS, R.; HOPPE, H. **Resistance of crop plants against fungi**. Stuttgart: G. Fischer, 544p, 1997.
- HUANG, F.; ANDOW, D. A.; BUSCHMAN, L. L. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of *Bt* crop use in North America. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, 140 (1): 1-16, 2011.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Produção Agrícola Municipal. [online]. Brasília, Distrito Federal, 2018. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612#resultado>>. Acesso em: 21 outubro 2018.
- JANDER, G.; CUI, J. P.; NHAN, B., PIERCE, N. E.; AUSUBEL, F. M. 2001. The TASTY locus on chromosome 1 of Arabidopsis affects feeding of the insect herbivore *Trichoplusia ni*. **Plant Physiology** 126: 890–898.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, 444 (7117): 323, 2006.

- JARONSKI, S. T. Factores ecológicos no uso inundativo de entomopatógenos fúngicos. **BioControl**, 55:159-185, 2010.
- KARBAN, R; BALDWIN, IT.1997. **Induced responses to herbivory**. Chicago and London: University of Chicago Press, 1997.
- KNUDSEN, J. T. et al. Diversity and distribution of floral scent. **The botanical review**, 72 (1): 120, 2006.
- KUC, J. Induced systemic resistance in plants to disease caused by fungi and bacteria, pp. 191-219. In: Bailey, J. A.; Deverall, B. J. [eds.], **The dynamics of host defense**. Academic, New York,1983.
- LABRADOR, S. J. R. Estudio de biología y combate del gusano cogollero del maíz *Laphygma frugiperda* S & A. Sección Entomology, Universidade de Zulia, Maracaibo, 83p. Apud: **Review Applied od Entomology**, Serie A, London, 57 (45), 1967.
- LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, 132: 1-41, 2015.
- LARA, F. M. Princípios de resistência de plantas aos insetos. Ícone, São Paulo, SP, 1991.
- LATORRE, B. A. **Plagas de las hortalizas**. FAO. Santiago, Chile, 1990.
- LATTANZIO, V. et al. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in research**, 661 (2): 23-67, 2006.
- LATTANZIO, V.; RUGGIERO, P. **Biochimica Agraria**, Scarponi, L. (Ed.), Patron Editore, Bologna, 631, 2003.
- LEIGH, T. F.; ROACH, S. H.; WATSON, T. F. Biology and ecology of important insect and mite pests of cotton. **Cotton Insects and Mites**. The Cotton Foundation Publisher, Memphis, Tennessee, p. 17-69, 1996.
- LIN, H.; KOGAN, M. Influence of induced resistance in soybean on the development and nutrition of the soybean looper and the Mexican bean beetle. **Entomologia experimentalis et applicata**, 55 (2): 131-138, 1990.

- LOMBARDO, L.; COPPOLA, G.; ZELASCO, S. New technologies for insect-resistant and herbicide-tolerant plants. **Trends in biotechnology**, 34(1): 49-57, 2016.
- LUGINBILL, P. The fall armyworm. Tech Bull US Depart Agric. 34: 1-91, 1928.
- MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 34: 67-77, 2005.
- MATSUI, K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current opinion in plant biology*, 9 (3): 274-280, 2006.
- MCKEY, Doyle. Adaptive patterns in alkaloid physiology. **The American Naturalist**, 108 (961): 305-320, 1974.
- MELO; M. O; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interaction: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 14:71-81, 2002.
- MILLER, R. A.; BERRYMAN, A. A.; RYAN, C. A. Biotic elicitors of defense reactions in lodgepole pine. *Phytochemistry* 25: 611-612, 1986.
- MOSCARDI, F. et al. Artrópodes que atacam as folhas da soja. pp. 213-309. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**, 4: 859, 2012.
- NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual review of phytopathology**, 30 (1): 369-389, 1992.
- PARE, P. W. et al. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. *Photosynthesis Research*, 85 (2): 149-159, 2005.
- PELIZZA, S. A. et al. Compatibilidade de inseticidas químicos e fungos entomopatogênicos no controle da praga de desfolha da soja, *Rachiplusia nu*. **Revista Argentina de microbiologia**, 50 (2): 189-201, 2018.
- PERUCA, R. D. et al. Impacts of soybean-induced defenses on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) development. **Arthropod-Plant Interactions**, 12 (2): 257-266, 2018.
- PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in plant science**, 5(10): 439-445, 2000.

- PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciencia & saude coletiva**, 22: 3281-3293, 2017.
- PINTO, J. D. Taxonomia de *Trichogrammatidae* (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidóptera. In: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: Fealq, 1: 13-40, 1997.
- PINTO-ZEVALLOS, D. M.; ZARBIN, P. H. G. A química na agricultura: perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. **Química Nova**, 36 (10): 1509-1513, 2013.
- PIPOLO, A. E. et al. **Cultivares de soja: macrorregiões 1, 2, e 3 Centro-Sul do Brasil**. EMBRAPA-CNPSo, Londrina, Brasil, 2015.
- PRAÇA, L. B. et al. **Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidóptera, Coleóptera e Díptera**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 2004.
- REVELO, M. A.; RAUN, E. S. Rearing the fall armyworm under greenhouse conditions. **Journal of Economic Entomology**, 57 (6): 1000, 1964.
- RODA, A. L.; BALDWIN, I. T. Molecular technology reveals how the induced direct defenses of plants work. **Basic and Applied Ecology**, 4 (1): 15-26, 2003.
- SÁ, V. G. M.; FONSECA, B. V. C.; BOREGAS, K. G. B.; WAQUIL, J. M. Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Neotropical Entomology**, Londrina, 38 (1): 108-115, 2009.
- SCHUMACHER, S. O. R.; SOUZA ANTUNES, A. M.; RODRIGUES, R. C. Panorama dos depósitos de patentes de defensivos agrícolas do Brasil. **Cadernos de Prospecção**, 9 (4): 441, 2016.
- SEQUEIRA, L. Mechanisms of Induced Resistance in Plants. **Annual Review of Microbiology**, 37(1): 51–79, 1983.

- SHELTON, A. M.; ZHAO, J.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. **Annual review of entomology**. 47: 845-881, 2002.
- SILVA-FILHO, M. C.; FALCO, M. C. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase produzidos pelas plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 2: 38-42, 2000.
- SMITH, C. J. Tansley Review No. 86 Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. **New phytologist**, 132 (1): 1-45, 1996.
- SPARKS, A. N. A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, 62: 82-87, 1979.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4. ed. Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2009.
- TABASHNIK, B. E. Evolution to resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, 39: 47-79, 1994
- TABASHNIK, B. E.; BREVAULT, T.; CARRIERE Y. Insect resistance to *Bt* crops: lessons from the first billion acres. **Nature biotechnology**, 31:510–521, 2013.
- THEIS, N.; LERDAU, M. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. **International Journal of Plant Sciences**, 164(3): 93–102, 2003.
- TURLINGS, T. C. J.; WÄCKERS, F. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. In **Advances in Insect Chemical Ecology** (Carde, R.T. and Millar, G. J., eds), p. 21–75, Cambridge University Press, 2004.
- WASTERNAK, C; PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in Plant Science**. 2: 302–307, 1997.
- WAQUIL, J. M. et al. Viabilidade do uso de hospedeiros alternativos como área de refúgio para o manejo da resistência da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no cultivo do milho-*Bt*. Embrapa Milho e Sorgo. **Comunicado técnico**, 2008.
- WENZEL, G. Strategies in unconventional breeding for disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, 23 (1): 149-172, 1985.

- WINK, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoretical and applied genetics**, 75 (2): 225-233, 1988.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, 64 (1): 3-19, 2003.
- WRAIGHT, C.L. et al. Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, 97 (14): 7700-7703, 2000.
- ZHANG, P. et al. Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106 (50): 21202-21207, 2009.
- ZUCCHI, R. A.; SILVEIRA NETO, S. S.; NAKANO, O. O. **Guia de identificação de pragas agrícolas**. FEALQ, Piracicaba, SP, 1993.

CAPITULO I - Influência da herbivoria prévia de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) em plantas de soja isolinhas BRS 284 e BRS 1001 IPRO no consumo alimentar e produção de flavonoides totais

Influence of previous herbivory of *Spodoptera frugiperda* in soybean isolines BRS 284 and BRS 1001 IPRO in food consumption and total flavonoid production.

Ricardo Dias Peruca¹, Antonia Railda Roel¹ & Rosemary Matias²

1. Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, Universidade Católica Dom Bosco - UCDB. Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário, Campo Grande - MS, 79117-900, Brasil; ricardoperuca@yahoo.com.br, arroel@ucdb.br

2. Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade Anhanguera - Uniderp, Rua Ceará, 333 - Miguel Couto, Campo Grande - MS, 79005-000. Brasil; rosematiasc@gmail.com

Abstract: As soybean is the principal commodity Brazilian agricultural activity. The action of herbivorous insects responsible for economic and productivity losses in this culture. Whereas *Spodoptera frugiperda* caterpillars (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) can cause significant damage to soybean cultivation. This work investigated whether herbivory *S. frugiperda* in soybean with and without transgenic *Bt* can induce in these plants mechanisms of defense distinct from those induced by mechanical injury. Therefore, the consumption of caterpillars was evaluated in relation to the increase of flavonoids, comparing the chemical profiles of leaf extracts of plants submitted to treatment and of control plants. Soybean isolines cultivars BRS 284 and BRS 1001 IPRO were sown in pots under greenhouse conditions. Upon reaching vegetative stage V6 were submitted to two treatments: mechanical injury and previous herbivory, in parallel to untreated controls of two varieties. For the herbivory test, 10-day stored-stock caterpillars were used, which were placed on leaflets, and the plants were then housed in cages with white *voil*. The mechanical injury consisted of a 3 cm lesion done every hour with surgical tweezers at the end of the leaflets of the third trifolium, along the 12h. The controls were divided into two groups, the first being kept in the same environment as the treated plants and the second in a separate room. Each treatment had 25 replicates. Leaves of each treatment were collected for chemical analysis and for feeding 10-day caterpillars in the laboratory. Were adopted a completely randomized statistical design. For quantification of flavonoids, the aluminum chloride method was applied to leaf discs of the two soybean varieties collected at times 0, 24 h and 192 h after treatment and maintained in methanol. The effects of previous herbivory and mechanical damage treatments, as well as the data obtained in the quantification of flavonoids in leaves of plants submitted to these treatments, indicated that the action of *S. frugiperda* caterpillars triggers plant responses to herbivory, proven in the deleterious effects manifested in the form of decreased consumption by caterpillars fed leaflets of soybean plants that suffered herbivory.

Key words: *Glycine max*, induced resistance, rutin, secondary substances, *Spodoptera frugiperda*.

Total word: 5026

O trabalho a seguir foi elaborado segundo as normas: Revista Biologia tropical.

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das mais importantes plantas cultivadas no mundo, sendo o Brasil seu segundo maior produtor, com 115.752.047 t em 2018 (CONAB, 2018). Esse panorama exige que os produtores rurais se atualizem continuamente com sistemas de produção cada vez mais eficientes, visando aumento da produtividade (BUENO et al., 2017).

A produtividade vegetal, tanto na natureza quanto em ambientes de cultivo, está intimamente relacionada aos insetos herbívoros e às interações planta-inseto. Insetos herbívoros causam danos às plantas ao se alimentarem de tecidos vegetativos, raízes, fluidos, flores ou sementes, reduzindo o desenvolvimento das culturas e acarretando perdas econômicas. Logo, é necessário conhecer as relações e interações planta-inseto para a gestão e prevenção de surtos de pragas de insetos (SHOONHOVEN et al., 2005; MICHELL et al., 2016).

Dentre as pragas que causam perdas expressivas em lavouras de soja, bem como em outras culturas, como milho, amendoim e girassol, está a lagarta de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae), praga polífaga frequentemente relacionada às gramíneas, embora sua herbivoria se estenda a mais de 80 espécies vegetais (POGUE, 2002; BARROS et al., 2010; BARROS; TORRES; BUENO, 2010; BUENO et al., 2011).

Ao reconhecer a herbivoria, as plantas podem defender-se com vários mecanismos morfológicos, bioquímicos e moleculares destinados a prejudicar os herbívoros (WAR et al., 2012; MITHÖFER; BOLAND, 2012). Quando diferentes partes de uma planta sofrem injúria, a resposta do vegetal pode ocorrer de diferentes formas (BUCHANAN et al., 2000). De acordo com Green e Ryan (1972), em plantas atacadas por insetos herbívoros a expressão de vários genes de defesa é induzida em folhas não danificadas em questão de horas

A herbivoria de insetos induz vários sinais internos dos tecidos feridos, incluindo fluxos iônicos de cálcio, cascatas de fosforilação e sinalização sistêmica e de produção de ácido jasmônico. Tais sinais são percebidos em tecidos não danificados, que depois reforçam sua defesa produzindo diferentes compostos bioativos, principalmente de baixo peso molecular, como os terpenos e outras moléculas, como fenóis. Tais compostos de defesa vegetal podem repelir ou intoxicar os insetos, enquanto as proteínas de defesa frequentemente interferem em sua digestão (FURSTENBERG-HAGG; ZAGROBELNY; BAK, 2013).

Por sua diversidade química, os compostos fenólicos são responsáveis por uma variedade de funções nos vegetais, como crescimento, reprodução, defesa (contra herbívoros, micróbios, vírus ou plantas concorrentes) e sinalização (para atrair animais polinizadores ou dispersores de sementes) (LATTANZIO et al., 2006).

Entre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides, isoflavonoides, taninos, ligninas, antocianinas, fitoalexinas, flavonas e gliceolinas (BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010). Os flavonoides constituem a maior classe de fenóis vegetais, desempenhando funções diversas, incluindo pigmentação e defesa (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Na busca de métodos eficientes de controle de pragas, os geneticistas desenvolveram plantas resistentes a lagartas, por meio de variedades transgênicas *Bt* (desenvolvidas com a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*) que produzem toxinas ocasionando a morte desses insetos. Assim, a partir da cultivar BRS 284 foi produzida a cultivar BRS 1001 IPRO, transgênica *Bt* para resistência da soja a *Anticarsida gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lep.: Noctuidae).

Entretanto, a cultivar BRS 1001 IPRO não apresenta tolerância a *S. frugiperda*, que tem baixa suscetibilidade à proteína *Cry1Ac* (tecnologia GM disponível para controle de lagartas na soja) (BERNARDI et al., 2014). No entanto, esta espécie tem altas taxas de sobrevivência em culturas hospedeiras disponíveis (SÁ et al., 2009).

Conhecer o mecanismo de defesa das plantas e suas interações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas facilita o desenvolvimento e melhoramento de cultivares resistentes a pragas e doenças, visando o aumento da produtividade no agronegócio brasileiro.

Esta pesquisa investigou se a herbivoria de *S. frugiperda* em cultivares de soja com e sem transgenia *Bt* pode igualmente induzir mecanismos de defesa distintos dos suscitados por lesão mecânica. Para tanto, avaliou-se o consumo foliar das lagartas relacionando aos teores de flavonoides nos perfis químicos de extratos de folhas de plantas tratadas e de controles.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação de *Spodoptera frugiperda*: As lagartas utilizadas nos experimentos em casa de vegetação (quantificação de flavonoides) e em laboratório (consumo foliar) provieram de criação-estoque, tendo sido mantidas em ambiente climatizado a 25 ± 2 °C, com umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h e alimentadas com dieta artificial (GREENE et al., 1976). Para os bioensaios em casa de vegetação, utilizaram-se lagartas de 10 dias de idade provenientes da geração F1 de laboratório, submetidas a jejum de 20 h.

Ensaio em casa de vegetação: As plantas utilizadas no ensaio foram produzidas em casa de vegetação instalada na Fazenda-Escola da Universidade Católica Dom Bosco ($20^{\circ}23'15,04''S$; $54^{\circ}36'24,87''W$; altitude 646 m), de janeiro a fevereiro de 2016. O ambiente foi mantido a 28 ± 2 °C, com seis regas diárias de 2 min por microaspersão, suprimindo as necessidades hídricas.

Após análise de solo, procedeu-se à adubação recomendada para a cultura, com sulfato de amônio, superfosfato simples e cloreto de potássio, além de correção com calcário dolomítico. Sementes da cultivar BRS 284 e sua parental direta na genealogia BRS 1001 IPRO foram semeadas em vasos de 3 L com solo em 14 de janeiro de 2016.

Quando as plantas estavam em estágio vegetativo V6 (FEHR; CAVINESS, 1977), cada uma recebeu no terceiro trifólio a partir do pecíolo uma gaiola de tecido *voil* branco (22 cm de comprimento; 16 cm de largura) com fecho de velcro na abertura para fixação no pecíolo. Para tratamento de herbivoria prévia, colocou-se em cada gaiola uma lagarta de 10 dias. Para ambas as cultivares, os controles 1 consistiram em plantas mantidas em sala individualizada da casa de vegetação, sem contato com grupos de tratamento. Os controles 2 consistiram em plantas mantidas no mesmo recinto que seus respectivos grupos de tratamento. Cada tratamento utilizou 80 vasos.

O experimento em casa de vegetação teve início às 7 h da manhã com a primeira coleta de folhas (tempo 0). A injúria mecânica consistiu em uma lesão de 3 cm por pinça cirúrgica no terceiro trifólio na extremidade dos folíolos a cada hora, durante 12 h. No tratamento de herbivoria prévia por *S. frugiperda*, as lagartas permaneceram nas gaiolas alimentando-se das folhas.

Coletaram-se folhas para análises químicas nos tempos 0, 24 h e 192 h após o início do experimento. As amostras foram imediatamente embaladas em papel-alumínio, refrigeradas em atmosfera de nitrogênio líquido e mantidas em *freezer* ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 15 meses.

Para os experimentos em laboratório utilizaram-se folíolos de soja coletados diariamente para cada tipo de tratamento, que foram acondicionados em sacos plásticos previamente identificados e levados ao laboratório para avaliação do consumo foliar.

Bioensaio de consumo foliar em laboratório: Procedeu-se a 25 repetições para a avaliação do consumo foliar. Cada repetição foi constituída de uma placa de Petri forrada com papel de filtro, encimado por um folíolo de soja, junto ao qual se colocou uma lagarta para que dele se alimentasse por 24 h.

Para leitura da área foliar consumida, todas as folhas, identificadas por tratamento, foram fotografadas antes e depois das 24 h de herbivoria com uma câmera Sony Alpha DSLR-A350, sob resolução máxima, de 14.2 Mpx, sem *flash*, apoiada em tripé comum, com a objetiva voltada para baixo, formando 90° com o plano da placa e a uma distância média de 30 cm desta.

À mesa foi fixada uma folha de papel A4 branco com uma moldura pontilhada impressa, à qual o foco da câmera estava ajustado e dentro da qual as folhas de soja foram posicionadas. Acima da moldura, foi impresso um retângulo de 3 cm de largura e 0,5 cm de altura, para servir de escala de conversão entre píxels e centímetros.

Para medir o consumo foliar, com base na área foliar, foi criado um sistema em linguagem Java, utilizando a biblioteca ImageJ.

Determinação do teor de flavonoides do extrato metanólico de folhas de soja: Para determinação dos teores de flavonoides, adaptou-se para a extração a metodologia de Addai, Abdullah e Mutalib (2013). Depois de mantidos em atmosfera de nitrogênio em *freezer* ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 15 meses, os folíolos foram utilizados para preparar discos foliares (2,0 cm de diâmetro) por meio de um vazador. Estes discos foliares foram pesados em balança analítica de precisão (0,0250 g) e mantidos em recipientes de vidro contendo 5 mL de solução hidrometanólica a 50%. Os recipientes foram vedados e submetidos a banho de ultrassom por 60 min, seguido de maceração estática por 24 h. A maceração foi repetida diariamente por sete dias. Na solução extratora de cada amostra, quantificaram-se os flavonoides nos tempos 0, 24 h e 192 h, utilizando-se o método de cloreto de alumínio e tendo a rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo) como padrão para construir a curva de calibração ($Y = 0,0048 + 0,03797x$, $R^2 = 0,9989$), de acordo com metodologia de Peixoto Sobrinho et al. (2008). Procedeu-se oito repetições.

Adotou-se delineamento estatístico inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Assistat 7.7 beta INPI 0004051-2 (SILVA; AZEVEDO, 2002; 2009).

RESULTADOS

As lagartas alimentadas com folhas submetidas a herbivoria prévia consumiram 57,16% menos (BRS 184) e 45,54% menos (BRS 1001 IPRO) que as do grupo-controle 1, respectivamente, e 43,34% menos (BRS 184) e 42,34% menos (BRS 1001 IPRO) que as do grupo-controle 2. As

alimentadas com folhas submetidas a injúria mecânica consumiram 56,74% menos (BRS 184) e 46,34% menos (BRS 1001 IPRO) que as do controle 1 e 42,79% (BRS 184) e 43,19% menos (BRS 1001 IPRO) que as do controle 2, respectivamente (Fig. 1). Tais diferenças foram significativas.

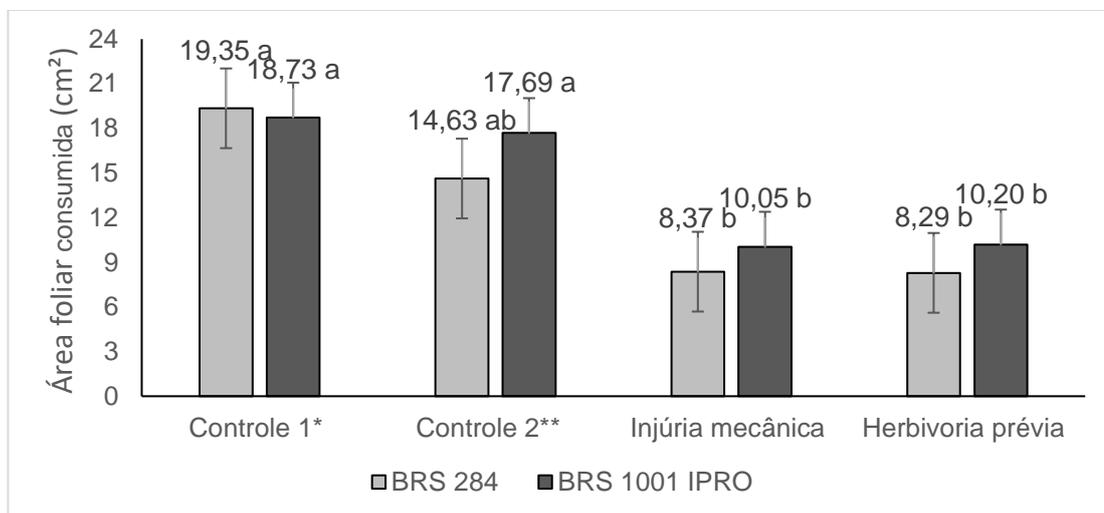


Fig. 1. Área foliar (cm²) consumida por lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas por 24 h com folhas de soja das cultivares isolinhas BRS 284 e BRS 1001 IPRO previamente submetidas a injúria mecânica ou herbivoria prévia. Condições: 25 ± 2 °C; umidade relativa: 60% ± 10%; fotofase de 12 h.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade). Repetições: 25. (CV_% = 57,60; F_{trat.} = 9,37; p = 0,001; GL = 7). As barras indicam erros-padrão.

*Em sala individualizada da casa de vegetação.

**No mesmo ambiente da casa de vegetação em que ocorreram os tratamentos de injúria mecânica ou de herbivoria prévia.

Os resultados da análise de flavonoides do extrato metanólico, das folhas de cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO, coletadas das plantas após injúria mecânica e herbivoria de *S. frugiperda*, indicam que ocorreu diferença significativa dos teores de flavonoides na soja BRS 284 dos tratamentos de 24 horas e 192 horas nos controles em relação a herbivoria prévia e injúria mecânica, com aumento de flavonoides (Tabela 1).

Em nenhuma das duas cultivares se observaram diferenças significativas entre cada um dos grupos-controle 1 (mantidos em ambientes separado dos demais tratamentos) e os respectivos grupos-controle 2 (mantidos no mesmo ambiente que os de tratamentos).

Na cultivar BRS 1001 IPRO, constatou-se aumento significativo de flavonoides em 192 h, tanto para herbivoria prévia quanto para injúria mecânica, em comparação com os controles. Entretanto, não se observou em nenhuma das cultivares diferença significativa entre os controles 1 e 2 (Tabela 1).

Para a cultivar BRS 284, observou-se diferença significativa entre os tempos 0 e 24 h, com aumento de flavonoides nesse período, elevação esta que progrediu até 192 h, tanto para os tratamentos de herbivoria prévia quanto de injúria mecânica.

Para a cultivar BRS 1001 IPRO, observou-se no tempo 0 diferença significativa em relação a 24 e 192 h, com aumento de flavonoides ao longo do tempo no tratamento herbivoria prévia. Segundo Lattanzio et al. (2006), cultivares atualmente desenvolvidas para aumentar os níveis de compostos fenólicos podem influenciar diferentes aspectos das interações planta-patógeno e

planta-inseto. Estudos sobre essas interações são necessários para melhor elucidar como o aumento da expressão de um composto fenólico endógeno ou de uma classe ou subclasse de fenólicos em plantas poderia influenciar a resistência vegetal contra patógenos e insetos fitófagos.

Tabela 1. Quantificação de flavonoides (mg g^{-1} de rutina) em folíolos de cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO coletados após herbivoria por *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) ou injúria mecânica em plantas cultivadas em casa de vegetação (28 ± 2 °C) e coletadas em diferentes tempos. Campo Grande, MS, fevereiro de 2016.

Tratamento	BRS 284				
	0 h	24 h	192 h	CV%	F _{trat.}
Controle 1***	65,75 ^{aA}	65,23 ^{bA}	65,44 ^{bA}	4,02	0,077 ^{NS}
Controle 2****	65,97 ^{aA}	64,92 ^{bA}	64,83 ^{bA}	3,84	0,511 ^{NS}
Injúria mecânica	65,51 ^{aB}	70,61 ^{aA}	72,39 ^{aA}	4,17	12,114*
Herbivoria prévia	66,08 ^{aB}	72,65 ^{aA}	73,78 ^{aA}	3,88	18,305*
CV%	4,17	3,87	3,91		
F _{trat.}	0,067**	17,160*	23,444*		
Tratamento	BRS 1001 IPRO				
	0 h	24 h	192 h	CV%	F _{trat.}
Controle 1***	67,12 ^{aA}	67,18 ^{aA}	66,74 ^{bA}	2,96	0,119 ^{NS}
Controle 2****	66,45 ^{aA}	66,87 ^{aA}	66,24 ^{bA}	4,92	0,076 ^{NS}
Injúria mecânica	66,93 ^{aB}	68,17 ^{aB}	72,69 ^{aA}	4,37	8,028*
Herbivoria prévia	66,70 ^{aB}	69,38 ^{aA}	70,24 ^{aA}	2,44	9,618*
CV%	3,78	4,31	3,26		
F _{trat.}	0,105 ^{NS}	1,197 ^{NS}	14,749*		

Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e por letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade). ^{NS}: não significativo. *Significativo a 1% de probabilidade. **Significativo a 5% de probabilidade. Repetições: 8. ***Em sala individualizada da casa de vegetação, sem contato com grupos de tratamento. ****No mesmo ambiente da casa de vegetação em que ocorreram tratamentos de injúria mecânica ou herbivoria prévia.

DISCUSSÃO

Lagartas alimentadas com folhas submetidas a herbivoria prévia por *S. frugiperda* ou a injúria mecânica consumiram significativamente menos que as de grupos-controle, o que pode indicar presença de resposta vegetal induzida por tais eventos, revelando mecanismos de defesa da planta (KOGAN; FISCHER, 1991; MORRIS et al., 1991; NEUPANE; NORRIS, 1991).

Recentemente, Peruca et al. (2018) também observaram menor consumo por lagartas de *S. frugiperda* quando alimentadas com folhas de soja danificadas por herbívoros, dano este que induziu mudanças no metabolismo da planta, com produção de substâncias fenólicas.

Não se detectaram diferenças de consumo significativas entre as cultivares, quer ao se compararem seus respectivos tratamentos ou seus controles, demonstrando que a transgenia da cultivar BRS 1001 IPRO não tem efeitos sobre *S. frugiperda*, fato também relatado por Bernardi et al. (2014), que observaram que *S. frugiperda* tem baixa suscetibilidade à proteína Cry1Ac (tecnologia GM disponível para controle de lagartas em soja), podendo não ser seletiva (BARROS et al., 2010) e apresentando altas taxas de sobrevivência em cultivos hospedeiros alternativos. Assim, *S. frugiperda* mostrou ser uma das pragas mais difíceis de manejar, dentre 31 pragas-alvo de cultivos de variedades transgênicas *Bt* na América Latina (BLANCO et al., 2016).

Embora a comunicação química de plantas com injúria para as que não a sofreram venha sendo exaustivamente investigada, o papel da comunicação química e os mecanismos de mediação, por substâncias químicas, entre estas plantas ainda não está livre de controvérsia, havendo estudos que apoiam a hipótese de transferência de informações entre plantas com injúria e sem injúria (DICKE; BRUIN, 2001; WEIR; PARK; VIVANCO, 2004; MICHEREFF et al., 2011). Em nosso estudo, especificamente quanto aos flavonoides, pode-se inferir que o consumo foliar não foi afetado por comunicações químicas entre plantas após herbivoria (Tabela 1).

Para defender-se de herbívoros, as plantas valem-se de uma diversidade de mecanismos que podem atuar diretamente ou indiretamente. Em uma mesma espécie vegetal, porém, a emissão de substâncias voláteis pode variar de acordo com o herbívoro presente (DICKE et al., 1993). Tal variação fornece aos inimigos do herbívoro informações valiosas sobre a identidade das presas ou hospedeiros disponíveis em uma área (DELPHIA et al., 2007; ZHANG et al., 2009). Neste estudo, os controles 2, que se encontravam no mesmo recinto que os grupos de tratamento, não evidenciaram alterações, se comparados com controles 1, mantidos em ambientes individualizados.

Trabalhando com extratos etanólicos, De Bortoli et al. (2012) detectaram que as concentrações de alguns compostos nas folhas dos genótipos de soja Embrapa 4 e BR 37 se alteraram em resposta a injúria prévia por lagartas de *Anticarsia gemmatalis*. Em ambas as cultivares, o incremento na concentração de isoflavonoides indicou ocorrência de defesa induzida.

Na soja, as substâncias de defesa mais prováveis são os flavonoides (HOFFMANN-CAMPO, 1995), que protegem a planta contra estresses bióticos e abióticos, incluindo radiação ultravioleta, patógenos e pragas agrícolas. Por seu potencial antioxidante e citotóxico, este

grupo químico pode influenciar o comportamento, crescimento e desenvolvimento de insetos, alterando sua capacidade de digestão (WAR et al., 2012).

A síntese de flavonoides por vegetais pode ocorrer durante o desenvolvimento normal dos tecidos e também em resposta a lesões físicas, infecções ou estresse causado por elicitores como sais de metais pesados, radiação ultravioleta e temperatura. Em geral, a síntese induzida de flavonoides é frequentemente aumentada sob condições de estresse biótico ou abiótico. O mesmo ocorre com outros polifenóis e fenóis simples (LATTANZIO et al., 2006).

Um dos flavonoides encontrados na soja é a rutina, com importante papel na defesa da planta contra lepidópteros (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001). Em *S. frugiperda*, por exemplo, a rutina prolonga o tempo de desenvolvimento larval, diminuindo o peso larval e pupal e reduzindo a viabilidade pupal. A adição de diferentes concentrações de rutina prolonga o ciclo de vida dessas larvas, provavelmente visando suprir deficiências alimentares (SILVA et al., 2016).

Hoffmann-Campo et al. (2006) constataram que a adição de rutina à dieta de lagartas de *A. gemmatalis* afetou negativamente seu crescimento, com efeitos pré-ingestivos evidenciados por redução no consumo, e pós-ingestivos, indicados por baixas taxas de conversão do alimento em biomassa e baixas taxas de assimilação alimentar.

Análise química realizada por De Bortoli et al. (2012) indicou que a desfolha por meio da herbivoria por *A. gemmatalis* altera a fisiologia das plantas, modificando a composição química das folhas. Isso se deve a resposta induzida relacionada a mecanismos de defesa, como relatado por Kitada et al. (1986), Lin e Kogan (1990), De Bortoli (1991) e Kogan e Fischer (1991).

Os efeitos que os tratamentos por herbivoria prévia e dano mecânico tiveram sobre na biologia de *S. frugiperda*, bem como os dados obtidos na quantificação de flavonoides nas folhas de plantas submetidas a esses tratamentos, indicam que a presença de lagartas de *S. frugiperda* desencadeia respostas da planta à herbivoria. Esse fato é comprovado por efeitos deletérios manifestados na forma de diminuição do consumo em lagartas alimentadas com folíolos de plantas de soja que sofreram herbivoria.

CONCLUSÃO

A herbivoria prévia e a injúria mecânica provoca diminuição no consumo foliar em ambas as cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO, com aumento de flavonoides em 24 e 192 h na cultivar BRS 284. Na cultivar BRS 1001 IPRO, observou-se aumento de flavonoides em resposta ao tratamento de herbivoria prévia, decorridas 24 h, e de injúria mecânica, decorridas 192 h.

Em nenhuma das cultivares se observou diferença no consumo foliar entre o grupo-controle mantido em sala individualizada e o grupo-controle mantido no mesmo ambiente dos demais tratamentos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradecemos também à Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural (AGRAER) e ao apoio da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB).

RESUMO

A soja é a principal *commodity* agrícola brasileira. A ação de insetos herbívoros acarreta perdas econômicas e de produtividade nessa cultura. Considerando que lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) podem causar danos expressivos ao cultivo da soja, buscou-se investigar se a herbivoria por *S. frugiperda* em sojas com e sem transgenia *Bt* pode induzir nessas plantas mecanismos de defesa distintos dos induzidos por lesão mecânica. Para tanto, avaliou-se o consumo das lagartas relacionando-o ao aumento de flavonoides, comparando-se os perfis químicos de extratos foliares de plantas submetidas a tratamento e de plantas-controle. Cultivares de soja das isolinhas BRS 284 e BRS 1001 IPRO foram semeadas em vasos em casa de vegetação. Ao alcançarem estágio vegetativo V6, foram submetidas a dois tratamentos: injúria mecânica e herbivoria prévia, paralelamente a controles não tratados das duas variedades. Para o ensaio de herbivoria, utilizaram-se lagartas de 10 dias obtidas de criação-estoque, que foram colocadas sobre folíolos, sendo as plantas então acondicionadas em gaiolas com tecido *voil* branco. A injúria mecânica consistiu em uma lesão de 3 cm feita a cada hora com pinça cirúrgica na extremidade dos folíolos do terceiro trifólio, ao longo de 12 h. Os controles foram divididos em dois grupos, mantendo-se o primeiro no mesmo ambiente das plantas tratadas e o segundo em uma sala separada. Cada tratamento teve 25 repetições. Coletaram-se folhas de cada tratamento para análise química e para alimentar lagartas de 10 dias em laboratório. Adotou-se delineamento estatístico inteiramente casualizado. Para quantificação de flavonoides, aplicou-se o método de cloreto de alumínio a discos foliares das duas variedades de soja coletados nos tempos 0, 24 h e 192 h após tratamento e mantidos em metanol. Os efeitos dos tratamentos de herbivoria prévia e de dano mecânico, bem como os dados obtidos na quantificação de flavonoides nas folhas de plantas submetidas a esses tratamentos, indicaram que a ação de lagartas de *S. frugiperda* desencadeia respostas da planta à herbivoria, comprovados nos efeitos deletérios manifestados na forma de diminuição do consumo por lagartas alimentadas com folíolos de plantas de soja que sofreram herbivoria.

Palavras-chave: *Glycine max*, lagarta-do-cartucho, resistência induzida, rutina, substâncias secundárias.

REFERÊNCIAS

Addai, Z. R., Abdullah, A., & Mutalib, S. A. (2013). Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant properties of two papaya cultivars. *African Journal of Agricultural Research*, Nairobi, 7(47), 3354-3359.

Adie, B. A., Perez-Perez, J., Perez-Perez, M. M., Godoy, M., & Solano, R. (2007). Aba is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19, 1665-81.

Barros, E. M., Torres J. B., & Bueno, A. F. (2010). Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. *Neotropical Entomology*, 39, 996-1001.

Barros, E. M., Torres, J. B., Ruberson, J. R., & Oliveira, M. D. (2010). Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 137, 237-245.

Bernardi, O., Sorgatto, R. J., Barbosa, A. D., Domingues, F. A., Dourado, P. M., Carvalho, R. A., Martinelli, S., Head, G. P., & Omoto, C. (2014). Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing *Cry1Ac* protein. *Crop protection*, 58, 33-40.

Bhattacharya, A., Sood, P., & Citovsky, V. (2010) The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular plant pathology*, 11(5), 705-719.

Blanco, C. A., Portilla, M., Jurat-Fuentes, J. L., Sánchez, J. F., Viteri, D., Vega-Aquino, P., ... & Zhu, Y. C. (2010). Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Cry1Ac* and *Cry1Fa* proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern entomologist*, 35(3), 409-415.

Buchanan, B. B., Grissem, W., & Jones, R. L. (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants* (Vol. 40). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists.

Bueno, R. C. O. F., Bueno, A. F., Moscardi, F., Postalí Parra, J. R., & Hoffmann-Campo, C. B. (2011). Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. *Pest Management Science*, 67(2), 170-174.

Bueno, R. D. F., Raetano, C., Carvalho, M., De Souza, D. M., & Bueno, A. D. F. (2017). *Impacto do arranjo de plantas na infestação e controle de insetos-praga na cultura da soja*. Londrina, PR: Embrapa Soja-Documents.

Cohen, Y. R. (2002). β -Aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens plant disease. *Plant disease*, 86, 448-457.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, (2018). *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola* - maio 2018. LSPA - Produção, por período da safra e produto (toneladas), Brasil. Recuperado de <http://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>

De Bortoli, S. A., Murata, A. T., Vacari, A. M., De Bortoli, C. P., & Ramalho, D. G. (2012). Herbivoria em soja: efeito na composição química das folhas e na biologia da lagarta da soja e do percevejo verde pequeno. *Comunicata Scientiae*, 192-198.

- Delphia, C. M., Mescher, M. C., & De Moraes, C. M. (2007). Induction of plant volatiles by herbivores with different feeding habits and the effects of induced defenses on host-plant selection by thrips. *Journal of chemical ecology*, 33(5), 997-1012.
- Deuner, C., Borges, C. T., Almeida, A. S., Meneghello, G. E., & Tunes, L. V. (2015). Ácido jasmônico como promotor de resistência em plantas. *Revista de Ciências Agrárias*, 38(3), 275-281.
- Dicke, M., Bruin, M., & Sabelis, M. W. (1993). Herbivore-induced plant volatiles mediate plant-carnivore, plant-herbivore, and plant-plant interactions: talking plants revisited. In *Plant Signals in Interactions with Other Organisms* (Schultz, J. and Raskin, I., eds) (pp 182–196). American Society Plant Physiology.
- Dicke, M., & Bruin, J. (2001). Chemical information transfer between plants: back to the future. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(10), 981-994.
- Dicke, M., & Van Loon, J. J. (2000). Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia experimentalis et applicata*, 97(3), 237-249.
- Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47- 95.
- Fehr, W. R., & Caviness, C. E. (1977). *Stages of soybean development*. Spec. 80, 1-12. Iowa State University, Ames, USA: Cooperative Extension Service, Agriculture and Home Economics Experiment Station.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., & Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 10242-10297.
- Greene, G. L., Leppla, N. C., & Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69(4), 487-488.
- Green, T. R., & Ryan, C. A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. *Science*, 175, 776–777.
- Hoffmann-Campo, C. B. (1995). *Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to Heliothis virescens (F.) and Trichoplusia ni (Hübner)*. 165p. Dissertation (Ph.D.) - The University of Reading, Reading, United Kingdom.
- Hoffmann-Campo, C. B., Harbone, J. B., & Mccaffery, A. R. (2001). Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98, 181- 194.
- Hoffmann-Campo, C. B., Ramos Neto, J. A., Oliveira, M. C. N. D., & Oliveira, L. J. (2006). Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(10), 1453-1459.
- Kitada, Y., Ueda, Y., Yamamoto, M., Ishikawa, M., Nakazawa, H., & Fujita, M. (1986). Determination of isoflavones in soy bean by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 366, 403-406.

- Kogan, M., & Fischer, D. C. (1991). Inducible defenses in soybean against herbivorous insect. In: Tallamy, W. D., Raupp, M. J. (eds.). *Phytochemical induction by herbivorous* (p. 347- 380). John Wiley, New York, USA.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661(2), 23-67.
- Lin, H., & Kogan, M. (1990). Influence of induced resistance in soybean on the development and nutrition of the soybean looper and the Mexican bean beetle. *Entomologia experimentalis et applicata*, 55(2), 131-138.
- Michereff, M. F. F., Laumann, R. A., Borges, M., Michereff-Filho, M., Diniz, I. R., Neto, A. L. F., & Moraes, M. C. B. (2011). Volatiles mediating a plant-herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. *Journal of chemical ecology*, 37(3), 273-285.
- Mitchell, C., Brennan, R. M., Graham, J., & Karley, A. J. (2016). Plant defense against herbivorous pests: exploiting resistance and tolerance traits for sustainable crop protection. *Frontiers in plant science*, 7, 1132.
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual review of plant biology*, 63, 431-450.
- Morris, P. F., Savard, M. E., & Ward, E. W. B. (1991). Identification and accumulation of isoflavonoids and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39(3), 229-244.
- Neupane, F. P., & Norris, D. M. (1991). α -Tocopherol alteration of soybean antiherbivory to *Trichoplusia ni* larvae. *Journal of chemical ecology*, 17(10), 1941-1951.
- Peixoto Sobrinho, T. J. D. S., Silva, C. H. T. P. D., Nascimento, J. E. D., Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P. D., & Amorim, E. L. C. D. (2008). Validation of spectrophotometric methodology for quantify flavonoid content in *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 44(4), 683-689.
- Peruca, R. D., Coelho, R. G., Silva, G. G., Pistori, H., Ravaglia, L. M., Roel, A. R., & Alcantara, G. B. (2018). Impacts of soybean-induced defenses on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) development. *Arthropod-Plant Interactions*, 12(2), 257-266.
- Pinto-Zevallos, D. M., & Zarbin, P. H. (2013). A química na agricultura: perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. *Química Nova*, 36(10), 1509-1513.
- Pinto-Zevallos, D. M., Martins, C. B., Pellegrino, A. C., & Zarbin, P. H. (2013). Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. *Quim Nova*, 36, 1395-1405.

- Piubelli, G. C., Hoffmann-Campo, C. B., Moscardi, F., Miyakubo, S. H., & De Oliveira, M. C. N. (2005). Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? *Journal of Chemical Ecology*, 31(7), 1509-1525.
- Pogue, M. G. (2002). A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée:(Lepidoptera: Noctuidae). *Philadelphia: American Entomological Society*, 43, 1-202.
- Ryan, C. A., & Pearce, G. (2001). Polypeptide hormones. *Plant Physiology*, 125(1), 65-68.
- Sá, V. G. M., Fonseca, B. V., Boregas, K. G. B., & Waquil, J. M. (2009). Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. *Neotropical Entomology*, 38, 108-115.
- Schoonhoven, L. M., Van Loon, B., Van Loon, J. J., & Dicke, M. (2005). *Insect-plant biology*. Oxford University Press on Demand.
- Silva, F. A. S., & Azevedo, C. A. V. (2002). Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 4(1), 71-78.
- Silva, F. A. S., & Azevedo, C. A. V. (2009). Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Assistance. In *7th World Congress on Computers in Agriculture Conference Proceedings, 22-24 June 2009, Reno, Nevada* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Silva, T. R. F. B., Almeida, A. C. D. S., Moura, T. D. L., Silva, A. R. D., Freitas, S. D. S., & Jesus, F. G. (2016). Effect of the flavonoid rutin on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 38(2), 165-170.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2009). *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre, RS: 4 ed. Artmed.
- Viegas Júnior, C. (2003). Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 390-400.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant signaling & behavior*, 7(10), 1306-1320.
- Weir, T. L., Park, S. W., & Vivanco, J. M. (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 472-479.
- Zhang, P. J., Zheng, S. J., van Loon, J. J., Boland, W., David, A., Mumm, R., & Dicke, M. (2009). Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21202-21207.

CAPITULO II – Efeito da herbivoria na indução de mecanismos de defesa em soja isolinhas BRS 284 e BRS 1001 IPRO e no desenvolvimento biológico de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae)

Efeito da herbivoria prévia de variedades de soja isolinhas BRS 284 e BRS 1001 IPRO na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae)

Effect of previous herbivory of isolates BRS 284 and BRS 1001 IPRO in the biology of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae)

Ricardo Dias Peruca^{1*}, Antonia Railda Roel¹, Rosemary Matias²

RESUMO

As plantas, ao longo da coevolução com herbívoros, desenvolveram um sistema de defesa com produção de metabólitos secundários, semelhantes dentro de uma família vegetal. Entretanto, alguns insetos conseguem se alimentar de plantas de diversas famílias vegetais, como é o caso de *Spodoptera frugiperda*, que prefere gramíneas, mas pode também causar danos à soja. Investigou-se aqui a hipótese de que plantas de soja das cultivares isolinhas BRS 284 (convencional) e BRS 1001 IPRO (transgênica *Bt*) apresentam respostas diferentes na indução de mecanismos de defesa, que se refletem na biologia das lagartas que delas se alimentam relacionando-o ao aumento de compostos fenólicos, comparando-se os perfis químicos de extratos foliares de plantas submetidas a tratamento e de plantas-controle. Utilizaram-se dois grupos-controle: um mantido na mesma sala dos tratamentos e outro em sala separada. Em casa de vegetação, as duas cultivares foram semeadas em vasos e submetidas a tratamento no estádio vegetativo V6. Para os tratamentos, as folhas foram encerradas em gaiolas de tecido, uma por planta. Para a herbivoria, utilizaram-se lagartas de 10 dias. A injúria mecânica foliar foi

^{1*} Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, Universidade Católica Dom Bosco - UCDB. Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário, Campo Grande - MS, 79117-900, Brasil. ricardoperuca@yahoo.com.br, arroel@ucdb.br, Autores para correspondência.

² Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade Anhanguera - Uniderp, Rua Ceará, 333 - Miguel Couto, Campo Grande - MS, 79005-000. Brasil. rosematiasc@gmail.com.

efetuada com pinça a cada hora. A herbivoria provocou resposta de defesa induzida na planta, causando efeitos deletérios como aumento das fases larval e pupal, diminuição do peso pupal e menores porcentagens de fêmeas férteis e de ovos viáveis em lagartas que se alimentaram da cultivar BRS 284 e aumento de compostos fenólicos em 24 e 192 h, com a cultivar BRS 1001 I PRO ocasionou aumento da fase larval, mortalidade larval e pupal, diminuição do peso pupal, de fêmeas férteis e de ovos viáveis, tendo aumento de compostos fenólicos em resposta ao tratamento de injúria mecânica, decorridas 24 h nesta cultivar. Comparando-se a cultivar BRS 284 e a BRS 1001 I PRO, constataram-se diferenças significativas, duração da fase pupal, menor porcentagem de fêmeas férteis e viabilidade de ovos no tratamento herbivoria prévia e menor peso pupal no tratamento injúria mecânica na cultivar BRS 284. A cultivar BRS 1001 I PRO provocou efeitos deletérios mais pronunciados na biologia de *S. frugiperda* que sua isolinha BRS 284.

Palavras-chave: Interação inseto-plantas, lagarta-do-cartucho, pragas da soja, resistência induzida, soja transgênica *Bt*.

ABSTRACT

The plants, along the coevolution with herbivores, developed a defense system with the production of similar secondary metabolites within a plant family. However, some insects can feed on plants of various plant families, such as *Spodoptera frugiperda*, which prefers grasses, but can also cause damage to soybeans. We investigated the hypothesis that soybean plants of isolates BRS 284 (conventional) and BRS 1001 I PRO (*Bt* transgenic) present different responses in the induction of defense mechanisms, which are reflected in the biology of the caterpillars that feed on them, and to the increase of phenolic compounds, comparing the chemical profiles of leaf extracts of plants submitted to treatment and of control plants. Two control groups were used: one kept in the same treatment room and the other in a separate room.

In greenhouse, the two cultivars were planted in pots and submitted to treatment in the V6 vegetative stage. For the treatments, the leaves were enclosed in tissue cages, one per plant. For herbivory, 10 day caterpillars were used, after 20 h of fasting. The follicular mechanical injury was performed with tweezers every hour. The herbivory induced an induced defense response in the plant, causing deleterious effects such as increased larval and pupal phases, decrease in pupal weight and lower percentages of viable eggs and fertile females in caterpillars fed on BRS 284 cultivar and increase in phenolic compounds in 24 and 192 h, with cultivar BRS 1001 I PRO caused increase of the larval phase, larval and pupal mortality, reduction of pupal weight, of fertile females and viable eggs, with increase of phenolic compounds in response to the treatment of mechanical injury, after 24 h in this cultivar. Comparing cultivars BRS 284 and BRS 1001 I PRO, significant differences were observed, duration of the pupal phase, lower percentage of fertile females and viability of eggs in previous herbivory treatment and higher lower pupal weight in the mechanical injury treatment in cultivar BRS 1001 I PRO. The cultivar BRS 1001 I PRO caused more pronounced deleterious effects in the biology of *S. frugiperda* than its isolinha BRS 284.

KEY WORDS: fall armyworm, induced resistance, plant-insect interaction, soybean pests, transgenic soybean *Bt*.

Este trabalho foi elaborado segundo as normas: Revista Ciência Rural.

INTRODUÇÃO

Em soja, os ataques de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) são mais frequentes em plântulas, devido à presença de lagartas na palhada do cultivo anterior. Os ataques mais intensos a essa cultura têm ocorrido em áreas no Cerrado, geralmente associados a períodos ou anos mais secos e/ou épocas de menor precipitação. A presença de gramíneas

invasoras, como papuã (*Brachiaria* spp.) e milhã (*Digitaria* spp.), no cultivo de soja pode fazer surgir elevadas populações de *S. frugiperda* (BERNARDI, 2012).

A tentativa de diminuir perdas econômicas causadas por altas taxas de infestação de *S. frugiperda* levou à dependência de inseticidas químicos aplicados intensivamente, que podem levar à seleção de populações resistentes (CARVALHO et al., 2013). Para reduzir tal dependência, procedeu-se o desenvolvimento de plantas de soja que produzem proteínas inseticidas codificadas por genes da bactéria comum *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (SANAHUJA et al., 2011).

Dentre as *Bt* temos a BRS 1001 que além do gene cp4-epsps possui o gene *cryIAc* que assegura tolerância às principais espécies de lagarta que afetam a cultura da soja, o que veio revolucionar a agricultura tornando-se importante para os programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (SHELTON et al., 2008), uma vez que a toxina é produzida pela própria planta, e com isto as cultivares transformadas com genes *cry*, possuem propriedades tóxicas produzidas após a ingestão por insetos.

No caso de insetos-alvos suscetíveis ao material vegetal transformados com genes *cry*, depois de ingeridos os cristais são solubilizados no intestino médio liberando as protoxinas, as quais são ativadas pelas enzimas digestivas formando pequenos fragmentos protéicos tóxicos que atravessam a membrana peritrófica ligando-se a receptores específicos das membranas apicais das células intestinais, causando destruição das microvilosidades, hipertrofia das células epiteliais seguida de vacuolização do citoplasma e rompimento celular, resultando na morte do inseto (FIUZA, 2009)

Embora nas piores circunstâncias as pragas possam desenvolver resistência a toxinas em culturas *Bt* em apenas dois anos, o manejo adequado dessa tecnologia permite sustentar sua eficácia por 15 anos ou mais (TABASHNIK et al., 2013).

Cultivares transformadas com genes *cry* apresentam vantagens em relação aos formulados de *B. thuringiensis*, não necessitando de pulverização foliar para o controle dos insetos, sendo que a toxina é produzida pela própria planta e reduzindo o custo de aplicação desse produto químico (JAMES, 2017).

Marti et al. (2013) apontam que a herbivoria foliar induz uma variedade de mudanças locais e sistêmicas no metaboloma, o conjunto de metabólitos da planta. Essas alterações podem ter efeitos contrastantes sobre a resistência dos herbívoros e podem afetar outros organismos que estão direta ou indiretamente conectados à planta. A metabolômica não alvo pode, portanto, não apenas levar à descoberta de novos metabolismos dinamicamente regulados, mas também ajudar a criar novas hipóteses sobre como os insetos herbívoros influenciam as interações planta-ambiente por meio de respostas induzidas.

Alguns compostos secundários não ocorrem de forma natural nas plantas, mas podem ser produzidas quando estas são injuriadas pelo inseto, ou seja, no momento em que este inicia sua alimentação (LARA, 1991). Os sinais defensivos ativados por sinais translocados dos tecidos expostos ao estresse alcançam partes sistêmicas, aumentando a capacidade da planta de responder a ataques subsequentes (HEIL & TON, 2008).

Segundo Hoffmann-Campo (2012), a resistência induzida se desenvolve por meio de mecanismos de proteção ativados durante o contato, e vários metabólitos secundários são envolvidos nas interações das plantas com esses agentes. As folhas de soja apresentam constitutivamente uma variedade de isoflavonas (como a genistina) e flavonóis glicosídicos (como a rutina), que interferem negativamente na biologia de lagartas desfolhadoras da família Noctuidae (Fabricius, 1777).

O presente estudo investigou a hipótese de que cultivares de soja das isolinhas BRS 284 e BRS 1001 IPRO (transgênica *Bt*) apresentam respostas diferentes na indução de mecanismos de defesa. Para isso avaliou-se o desenvolvimento de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de

soja previamente submetidas a herbivoria pela mesma espécie de lagarta ou a injúria mecânica, relacionando-o ao aumento de compostos fenólicos, comparando-se os perfis químicos de extratos foliares de plantas submetidas a tratamento e de plantas-controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação de *Spodoptera frugiperda*

As lagartas utilizadas no experimento provieram de criação-estoque em ambiente mantido a 25 ± 2 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h. As lagartas foram alimentadas com a dieta artificial descrita por Greene et al. (1976) e adaptada por Parra (1986); os adultos, com solução aquosa de mel a 10%. Os bioensaios utilizaram lagartas da geração F1 de laboratório, com 10 dias de idade.

Procedimentos em casa de vegetação

O cultivo da soja ocorreu em casa de vegetação, Universidade Católica Dom Bosco ($20^{\circ}23'15,04''S$; $54^{\circ}36'24,87''W$; altitude: 646 m) de janeiro a fevereiro de 2016. O ambiente foi mantido a 28 ± 2 °C, com seis regas diárias de 2 min por microaspersão, suprimindo as necessidades hídricas.

Após análise de solo, procedeu-se à adubação recomendada para a cultura, com sulfato de amônio, superfosfato simples e cloreto de potássio, além de correção com calcário dolomítico. Sementes da cultivar BRS 284 e de sua parental genealógica direta BRS 1001 IPRO foram semeadas em vasos de 3 L com solo em 14 de janeiro de 2016.

Os tratamentos na casa de vegetação abrangeram os seguintes grupos: plantas submetidas a herbivoria por *S. frugiperda* e plantas submetidas a injúria mecânica, além de grupos-controle. Quando as plantas estavam em estágio vegetativo V6 (FEHR & CAVINESS, 1977), cada uma recebeu no terceiro trifólio a partir do pecíolo uma gaiola de tecido *voil* branco (22 cm de comprimento; 16 cm de largura) com fecho de velcro na abertura para fixação no pecíolo. Para tratamento de herbivoria, colocou-se em cada gaiola uma lagarta de 10 dias. Para ambas as

cultivares, os controles 1 consistiram em plantas mantidas em sala individualizada da casa de vegetação, sem contato com grupos de tratamento. Os controles 2 consistiram em plantas mantidas no mesmo recinto que seus respectivos grupos de tratamento. Cada tratamento consistiu em 80 repetições (vasos).

O experimento em casa de vegetação teve início às 7 h da manhã com a primeira coleta de folhas (tempo 0). A injúria mecânica consistiu em uma lesão de 3 cm por pinça cirúrgica no terceiro trifólio na extremidade dos folíolos a cada hora, durante 12 h. No tratamento de herbivoria prévia por *S. frugiperda*, as lagartas permaneceram nas gaiolas alimentando-se das folhas.

Coletaram-se folhas para análises químicas nos tempos 0, 24 h e 192 h após o início do experimento. As amostras foram imediatamente embaladas em papel-alumínio, refrigeradas em atmosfera de nitrogênio líquido e mantidas em *freezer* (-80°C) por 15 meses.

Para os experimentos em laboratório utilizaram-se folíolos de soja coletados diariamente para cada tipo de tratamento, que foram acondicionados em sacos plásticos previamente identificados e levados ao laboratório para avaliação do consumo foliar.

Determinação dos fenois totais

Os folíolos na fase de pré-florescimento, foram mantidos em atmosfera de nitrogênio em *freezer* (-80°C) por 15 meses, nos tempos 0, 24 h e 192 h, e para a extração dos constituintes químicos a metodologia empregada foi adaptada de Addai, Abdullah e Mutalib (2013).

Para extração, foram preparados discos foliares (2,0 cm de diâmetro) por meio de um vazador, os discos foram pesados em balança analítica de precisão (0,0250 g) e transferidos para recipientes de vidro, rotulados, contendo 5 mL de solução hidrometanólica (PA, 100%) a 50% e vedados, com tampa de rosca. A extração ocorreu banho de ultrassom por 60 min, seguido de maceração estática por 24 h, a sequência deste procedimento foi repetida diariamente por sete dias, em sequência o solvente de cada amostra foi evaporado e o extrato bruto utilizado para

determinação de fenois totais, pelo Método Folin-Ciocalteu's, com as absorvâncias medidas em espectrofotômetro na região de 750 nm, em cubetas de quartzo. A análise foi executada por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração ($y = 0,1350x - 185,00$; $R^2 = 0,99$), construída com padrões de ácido gálico (GAE 10 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico (mg/g) (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2008). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições.

Avaliação da mortalidade e biologia de *S. frugiperda*

Os efeitos biológicos dos tratamentos foram avaliados em 50 repetições, com uma lagarta por repetição. Os parâmetros biológicos avaliados foram mortalidade das diferentes fases de desenvolvimento, peso pupal, duração da fase larval e da pupal, número de ovos por fêmea e viabilidade de ovos.

As lagartas de 3 a 4 ínstaes, com 10 dias de idade, obtidas de criação-estoque foram colocadas em caixas do tipo Gerbox forradas com papel-filtro (uma por caixa). Na lateral da caixa, junto à base da folha, inseriu-se uma porção de algodão umedecido em água para evitar perda de turgescência foliar.

Os folíolos para alimentar as lagartas foram coletados diariamente na casa de vegetação, separadamente para cada tratamento, e colocados abertos nas caixas Gerbox. Os excrementos foram eliminados diariamente, para evitar contaminações. Quando as lagartas pararam de se alimentar, indicando o início da fase pré-pupal, a alimentação foi suspensa e as caixas permaneceram fechadas até a pupação. As pupas com 24 h foram sexadas e pesadas em balança eletrônica de precisão.

Para cada tratamento, as pupas foram separadas em 10 casais, colocados em gaiolas de PVC forradas nas laterais com papel-filtro, cobertas na parte superior com tecido do tipo organza preso por liga de borracha e com a parte inferior apoiada em prato plástico forrado com papel-filtro. Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10% renovada a cada dois

dias, fornecida em vidros com 4,5 cm de altura e 2,0 cm de diâmetro, de cujo interior emergia um filete de algodão ao longo do qual a solução se movia por capilaridade.

As massas de ovos foram recortadas diariamente do papel-filtro, identificadas e colocadas em placas de Petri com 1,8 cm de altura e 6,0 cm de diâmetro, contendo algodão umedecido. Os ovos foram contados utilizando-se microscópio estereoscópico. Diariamente, contou-se o número de lagartas eclodidas para determinar a viabilidade de ovos por tratamento.

Adotou-se delineamento estatístico inteiramente casualizado. Os dados relativos aos parâmetros avaliados foram submetidos a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste *t* de Student no nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Assistat 7.7 beta INPI 0004051-2 (SILVA & AZEVEDO, 2002; 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos de herbivoria prévia provocaram as menores médias de viabilidade larval (90%), tanto na cultivar convencional como na transgênica *Bt*. No controle 1, que consistiu de plantas mantidas isoladas dos tratamentos, observaram-se viabilidades de 96% e 98%, respectivamente, para BRS 284 e BRS 1001 IPRO. No controle 2, mantido no mesmo ambiente que os demais tratamentos, observaram-se viabilidades de 100% e 96%, respectivamente. No tratamento de injúria mecânica, as viabilidades observadas para a cultivar convencional e a transgênica *Bt* foram respectivamente de 94% e 96% (Figura 1).

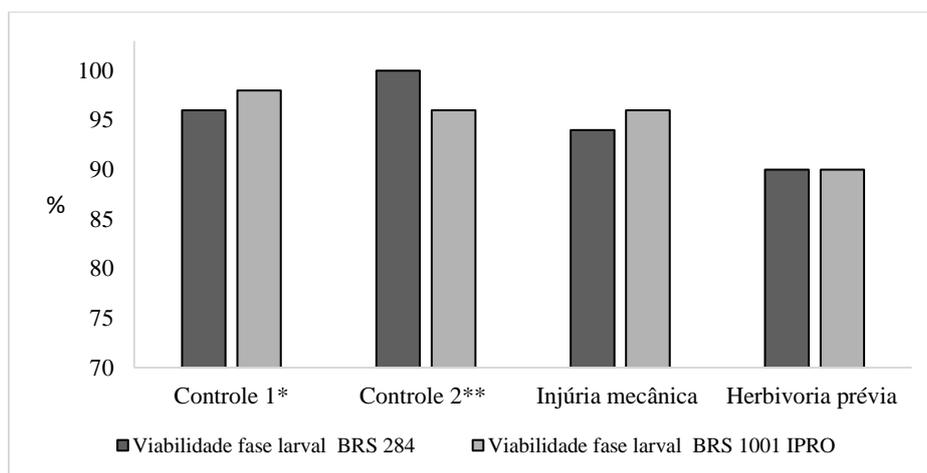


Figura 1 - Viabilidade da fase larval (%) (eixo y) de *S. frugiperda* em tratamentos com injúria mecânica e herbivoria prévia em soja cultivares BRS 286 e BRS 1001 IPRO a 25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. *Em sala individualizada da casa de vegetação. **Em casa de vegetação com os tratamentos Injúria Mecânica e Herbivoria Prévia

O percentual de sobrevivência de formas jovens de insetos constitui importante parâmetro para a avaliação da resistência de plantas (LARA, 1991). No presente estudo, entretanto, em todos os tratamentos e nos controles 1 e 2 a viabilidade larval foi sempre de ao menos 90%.

Constatou-se menor viabilidade em pupas que, quando lagartas, se alimentaram de folhas submetidas a herbivoria prévia: 96% para a cultivar BRS 284 e 90% para BRS 1001 IPRO. Nos controles 1 esses valores foram de 100 e 98%, respectivamente, e nos controles 2, de 100% para ambas as cultivares. No tratamento de injúria mecânica observou-se baixa mortalidade pupal, com 98% e 96% de sobrevivência, respectivamente, para a cultivar convencional e a transgênica *Bt* (Figura 2).

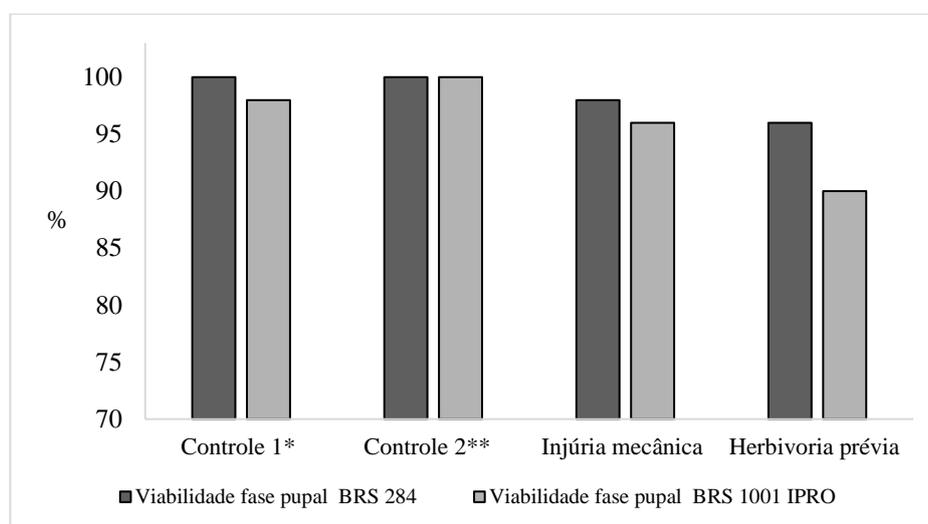


Figura 2 - Viabilidade da fase pupal (%) (eixo y) de *S. frugiperda* em tratamentos com injúria mecânica e herbivoria prévia em soja cultivares BRS 286 e BRS 1001 IPRO a 25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. *Em sala individualizada da casa de vegetação. **Em casa de vegetação com os tratamentos injúria mecânica e herbivoria prévia.

Em lagartas alimentadas com folhas previamente submetidas a herbivoria, as durações da fase larval, de 20,55 dias para a cultivar BRS 284 e de 20,40 para BRS 1001 IPRO, foram significativamente maiores que nos demais grupos: 19,17 (BRS 284) e 19,17 dias (BRS 1001 IPRO) para injúria mecânica, 19,55 (BRS 284) e 19,10 dias (BRS 1001 IPRO) para o grupo-controle 1 e 19,48 (BRS 284) e 18,91 dias (BRS 1001 IPRO) para o grupo-controle 2 (Tabela 1). Tal prolongamento da fase larval possivelmente indica que folhas de soja submetidas a herbivoria prévia dificultam o desenvolvimento de *S. frugiperda*, sugerindo menor adequação do substrato alimentar e, conseqüentemente, presença de algum nível de resistência (SILVEIRA et al., 1997).

Comparando-se a duração da fase larval entre as cultivares, notou-se diferença entre os grupos-controle 2, com períodos de 19,48 (BRS 284) e 18,91 dias (BRS 1001 IPRO). Não se observaram diferenças entre as cultivares nos demais grupos (Tabela 1).

O prolongamento da fase larval pode estar associado a redução na eficiência de conversão do alimento ingerido (TANZUBIL & MCCAFFERY, 1990). Em estudos anteriores com a variedade BRS 284, Peruca et al. (2018) observaram aumento do período larval quando a alimentação consistiu de folhas submetidas a herbivoria prévia, indicando que plantas de soja danificadas por herbívoros dificultaram o desenvolvimento de *S. frugiperda*.

Tabela 1 - Duração (\pm erro-padrão) da fase larval de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) alimentadas com folhas de soja das cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO (25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$, fotofase de 12 h).

Tratamento	Duração fase larval (dias)			
	BRS 284	BRS 1001 IPRO	CV%	F _{trat}
Controle 01*	19.55 \pm 0.26 bA*** [49]	19.10 \pm 0.17 bA [49]	13.80	0.00 ¹
Controle 02**	19.48 \pm 0.21 bA [50]	18.91 \pm 0.20 bB [48]	6.68	4.72 ²
Injúria mecânica	19.17 \pm 0.22 bA [47]	19.17 \pm 0.17 bA [46]	6.45	0.002 ²
Herbivoria prévia	20.55 \pm 0.17 aA [45]	20.40 \pm 0.28 aA [45]	7.32	0.24 ^{ns}
CV%	7.21	7.79		
F _{trat} .	8.20 ¹	9.19 ¹		

*Em sala distinta daquela em que se conduziram os tratamentos. **Na mesma sala em que ocorreram os tratamentos. ***Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna ou por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si (teste *t* de Student no nível de 5% de probabilidade). Valores entre colchetes expressam o número de observações. ¹Significativo a 1% de probabilidade. ²Significativo a 5% de probabilidade. ^{ns}Não significativo.

Observou-se no controle 1 diferença significativa na duração da fase pupal, menor para a cultivar BRS 284 (9,39 dias) que para a BRS 1001 IPRO (10,06 dias). A herbivoria prévia aumentou significativamente a duração pupal para a cultivar BRS 284 (10,58 dias), em comparação com a BRS 1001 IPRO (9,58 dias) (Tabela 2). Embora *S. frugiperda* tenha baixa susceptibilidade à proteína *Cry1Ac* (tecnologia exclusiva GM disponível para controle de lagartas *A. gemmatilis* na soja) (BERNARDI et al., 2014), constatou-se no presente estudo a ocorrência de efeito da transgenia na duração pupal.

Lagartas alimentadas com folhas da cultivar convencional tiveram aumento significativo no período pupal com os tratamentos de herbivoria prévia e injúria mecânica em relação aos controles (Tabela 2). As alterações observadas no período de pupa e na fase adulta estão provavelmente associadas a efeitos das substâncias presentes nos vegetais que são ingeridos durante o estágio larval.

As cultivares desenvolvidas para resistir a pragas têm diferentes efeitos na biologia dos insetos que delas se alimentam. Veloso (2010), estudando pupas de *S. frugiperda* que na fase larval se alimentaram de folhas de diferentes cultivares de soja, constatou variações na duração pupal de 7,38 dias para a cultivar FMT-Tucunaré a 7,95 dias para a BRSMT Uirapuru, períodos estes diferentes dos observados na presente pesquisa.

Tabela 2 - Duração (\pm erro-padrão) da fase pupal de *Spodoptera frugiperda* (Lep. Noctuidae) alimentadas com folhas de soja das cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO (25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$. fotofase de 12 h).

Tratamento	Duração fase pupal (dias)			
	BRS 284	BRS 1001 IPRO	CV%	F _{trat.}
Controle 01*	9,39 \pm 0,13 bB [48]	10,06 \pm 0,25 abA [48]	13,67	6,03 ²
Controle 02**	9,62 \pm 0,26 bA [50]	9,87 \pm 0,22 abA [47]	14,25	0,80 ^{ns}
Injúria mecânica	10,61 \pm 0,15 aA [46]	10,37 \pm 0,17 aA [46]	9,83	1,24 ^{ns}
Herbivoria prévia	10,58 \pm 0,18 aA [43]	9,58 \pm 0,32 bB [40]	16,11	7,93 ¹
CV%	11,20	15,59		
F _{trat.}	14,86 ¹	1,98 ^{ns}		

*Em sala distinta daquela em que se conduziram os tratamentos. **Na mesma sala em que ocorreram os tratamentos. ***Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna ou por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si (teste *t* de Student no nível de 5% de probabilidade). Valores entre colchetes expressam o número de observações. ¹Significativo a 1% de probabilidade. ²Significativo a 5% de probabilidade. ^{ns}Não significativo.

Na variedade convencional, o peso pupal não diferiu significativamente entre os controles 1 e 2 (185,22 e 190,37 mg, respectivamente), sendo estes diferentes dos valores dos tratamentos de injúria mecânica e herbivoria prévia (174,31 e 168,57 mg, respectivamente), que por sua vez não diferiram significativamente entre si. Para a variedade transgênica *Bt*, os pesos pupais dos controles 1 e 2 tampouco diferiram significativamente entre si (189,40 e 188,16 mg, respectivamente) ou em relação ao tratamento de injúria mecânica (189,50 mg), mas diferiram do tratamento de herbivoria prévia (165,15 mg) (Tabela 3).

O menor peso pupal observado nos grupos de herbivoria prévia em relação aos controles indica a presença de efeitos deletérios da alimentação da fase larval, provavelmente decorrentes da indução de substâncias secundárias após a herbivoria prévia. No entanto, se observou diferenças significativas no peso pupal entre a cultivar convencional e a transgênica *Bt* apenas no tratamento injúria mecânica.

Tanto os controles 1 quanto os controles 2 não diferiram significativamente quanto ao peso pupal ao se compararem as duas cultivares, com valores entre 185,22 e 189,40 mg para os controles 1 e entre 190,37 e 188,16 mg para os controles 2. Para o tratamento de herbivoria prévia tampouco houve diferenças significativas entre as cultivares. Para o tratamento de injúria mecânica, o peso pupal foi menor para a cultivar convencional que na transgênica (174,31 e 189,50 mg, respectivamente) (Tabela 3).

A redução do peso pupal observada no presente estudo indica problemas no desenvolvimento larval. O peso da biomassa pupal é importante, pois segundo Penco & Martin (1982) há em *S. frugiperda* correlação direta entre a biomassa da pupa e a fecundidade do adulto. Segundo Bogorni & Vendramim (2005), os estudos de biologia de insetos frequentemente apontam que o baixo peso de lagartas pode decorrer da alimentação, atrasando seu desenvolvimento.

Tabela 3 - Peso (\pm erro-padrão) de pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) alimentadas com folhas de soja das cultivares BRS 284 BRS e 1001 IPRO (25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$, fotofase de 12 h).

Tratamento	Peso pupal (mg)			
	BRS 284	BRS 1001 IPRO	CV%	F _{trat.}
Controle 01*	185.22 \pm 3.62 aA ^{***} [48]	189.40 \pm 2.62 aA [48]	11.34	0.93 ^{ns}
Controle 02**	190.37 \pm 3.92 aA [50]	188.16 \pm 3.36 aA [47]	12.07	0.23 ^{ns}
Injúria mecânica	174.31 \pm 4.09 bB [45]	189.50 \pm 3.80 aA [46]	13.94	8.16 ¹
Herbivoria prévia	168.57 \pm 3.95 bA [43]	165.15 \pm 4.89 bA [40]	17.65	0.28 ^{ns}
CV%	13.89	13.30		
F _{trat.}	7.33 ¹	9.94 ¹		

*Em sala distinta daquela em que se conduziram os tratamentos. **Na mesma sala em que ocorreram os tratamentos. ***Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna ou por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si (teste *t* de Student no nível de 5% de probabilidade). Valores entre colchetes expressam o número de observações. ¹Significativo a 1% de probabilidade. ^{ns}Não significativo.

Chown & Nicolson (2004) relatam que a reduzida absorção de nutrientes na fase larval de insetos culmina em pupas de baixo peso, desencadeando na conversão de nutrientes absorvidos uma troca para a reprodução, com aumento da massa ovariana em relação ao tamanho do indivíduo, em detrimento de outros sistemas corporais. Como consequência, pupas de menor peso darão origem a adultos pequenos, e possivelmente haverá problemas na cópula destes com indivíduos normais. Além disso, as fêmeas serão menos fecundas (RODRÍGUEZ & VENDRAMIM, 1996). Tais informações são corroboradas por dados do presente trabalho,

em que as pupas mais leves tornaram-se adultos com menor capacidade reprodutiva que pupas de tamanho normal (controles).

Os números médios de ovos por fêmea foram de 1.006,0, 986,0, 1014,0 e 480,0, respectivamente, nos controles 1 e 2 e nos grupos de injúria mecânica e de herbivoria prévia, para a cultivar BRS 284. Entretanto, ocorreu diferença significativa no tratamento de herbivoria prévia para a cultivar BRS 284 em relação aos tratamentos controle 1 e injúria mecânica, com diminuição do número de ovos para 480. Não se observaram diferenças significativas entre os demais tratamentos (Tabela 4).

Para a cultivar BRS 1001 IPRO, as fêmeas puseram em média 777,8, 1.117,4, 899,8 e 616,0 ovos, respectivamente, nos controles 1 e 2 e grupos de injúria mecânica e de herbivoria prévia. A herbivoria prévia provocou postura significativamente menor que nos tratamentos controle 2.

Ao se compararem as duas cultivares, não se observou diferença significativa no número médio de ovos, em qualquer dos tratamentos e controles (Tabela 4).

Tabela 4 - Número médio (\pm erro-padrão) de ovos de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) alimentadas com folhas de soja das cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO (25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$, fotofase de 12 h).

Tratamento	Número médio de ovos			
	BRS 284	BRS 1001 IPRO	CV%	F _{trat.}
Controle 01*	1006.0 \pm 111.5 aA ² [10]	777.8 \pm 236.71 abA [10]	69.31	0.68 ^{ns}
Controle 02**	986.0 \pm 142.3 abA [10]	1117.4 \pm 122.03 aA [10]	50.50	0.31 ^{ns}
Injúria mecânica	1014.0 \pm 109.5 aA [10]	899.8 \pm 174.83 abA [10]	61.66	0.19 ^{ns}
Herbivoria prévia	480.0 \pm 76.2 bA [10]	616.0 \pm 230.89 bA [10]	85.80	0.42 ^{ns}
CV%	64.07	64.76		
F _{trat.}	2.19 ^{ns}	1.46 ^{ns}		

*Em sala distinta daquela em que se conduziram os tratamentos. **Na mesma sala em que ocorreram os tratamentos. ¹Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna ou por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si (teste *t* de Student no nível de 5% de probabilidade). Valores entre colchetes expressam o número de observações. ^{ns}Não significativo.

Quanto à fertilidade de fêmeas, os menores índices ocorreram com os tratamentos de herbivoria prévia, com 50% para a cultivar BRS 1001 IPRO e 60% para a BRS 284. Os maiores índices foram encontrados nos controles 2, com 90% e 100% para as cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO, respectivamente.

A baixa viabilidade de ovos observada nos tratamentos de herbivoria prévia e de injúria mecânica influenciou diretamente a reprodução de *S. frugiperda*, diminuindo a capacidade de multiplicação da espécie, em relação aos controles.

Observou-se ainda efeito na viabilidade dos ovos de fêmeas que na fase larval foram alimentadas com folhas submetidas a herbivoria prévia. As porcentagens de ovos viáveis foram de 47%, 60%, 37% e 42%, respectivamente, nos controles 1 e 2 e grupos de injúria mecânica e herbivoria prévia para a cultivar BRS 284 e de 35%, 40%, 35% e 27%, respectivamente, para a BRS 1001 IPRO (Tabela 5).

Ao se compararem as duas cultivares quanto à viabilidade dos ovos, nota-se menor índice na cultivar transgênica, em todos os grupos (tratamentos e controles). Como observado nos demais parâmetros, embora a cultivar não tenha sido desenvolvida para controle de *S. frugiperda*, provoca danos na biologia e reprodução desta. A menor viabilidade de ovos para a cultivar BRS 1001 IPRO pode decorrer de influência da transgenia na reprodução do inseto, em relação à cultivar convencional.

Tabela 5 - Fêmeas férteis e viabilidade de ovos (\pm erro padrão) de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) alimentadas com folhas de soja das cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO (25 ± 2 °C, U.R. $60\% \pm 10\%$, fotofase de 12 h).

Tratamento	Fêmeas férteis %		Viabilidade de ovos %	
	BRS 284	BRS1001 IPRO	BRS 284	BRS1001 IPRO
Controle 01*	80	70	47	35
Controle 02**	90	100	60	40
Injúria mecânica	80	70	37	35
Herbivoria prévia	60	50	42	27

*Em sala distinta daquela em que se conduziram os tratamentos. **Na mesma sala em que ocorreram os tratamentos. Repetições: 10.

A menor viabilidade dos ovos e o menor número de fêmeas férteis no tratamento de herbivoria prévia confirmam o efeito deletério deste tratamento, que ocasionou diminuição na taxa reprodutiva (Tabela 5).

Segundo Peruca et al. (2018), tanto danos provocados por herbívoros como a injúria mecânica induzem mudanças no metabolismo da soja, com produção de substâncias fenólicas. Resultados semelhantes ao desse estudo foram obtidos na presente pesquisa, em que plantas previamente danificadas por herbivoria causaram efeitos prejudiciais na biologia de *S. frugiperda*, podendo indicar resposta de defesa induzida pelo ataque de lagartas.

Segundo Hammerschmidt (2014), as defesas induzidas são produzidas principalmente no local de injúria por herbívoros ou nas proximidades (resposta local), podendo em seguida ocorrer também em tecidos distantes, não diretamente injuriados (resposta sistêmica). Os efeitos induzidos pela injúria de lagartas de *S. frugiperda* com fatores intrínsecos às plantas de soja, como o genótipo transgênico BRS 1001 IPRO, oriundo da base genética da cultivar BRS 284, diferiram entre essas cultivares quanto à duração da fase pupal, às porcentagens de fêmeas férteis e à viabilidade de ovos. Os dados obtidos contribuem para a compreensão de mecanismos de defesa das plantas de soja em relação a *S. frugiperda* e herbívoros-pragas desta cultura.

Os resultados dos teores de compostos fenólicos das folhas de cultivares de soja BRS 284, foram estatisticamente diferentes nas amostras coletadas das plantas após 24 e 192 horas de injúria mecânica e herbivoria prévia, com um aumento progressivo de compostos fenólicos entre os tempos (Tabela 6). Entre os grupos ocorreu diferença significativa no tempo de 24 e 192 horas, com aumento de compostos fenólicos em relação aos controles (Tabela 6).

Tabela 6 - Quantificação de compostos fenólicos em folíolos das cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO coletados após injúria mecânica e herbivoria por *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae), em plantas cultivadas em casa de vegetação (28 ± 2 °C) e coletadas em diferentes tempos. Campo Grande, MS, fevereiro de 2016.

BRS 284					
Tratamento	0 h	24 h	192 h	CV%	F_{trat.}
Controle 01 ^{***}	116.35 abA	116.81 cA	116.61 dA	0.25	3.11 ^{ns}
Controle 02 ^{****}	116.93 aA	117.03 cA	117.23 cA	0.23	1.64 ^{ns}
Injúria. mecânica	115.61 bC	123.43 aB	124.66 bA	0.16	3019.58 [*]
Herbivoria. prévia	116.15 abC	121.96 bB	127.44 aA	0.58	324.48 [*]
CV%	0.58	0.14	0.15		
F _{trat.}	3.27 ^{**}	2006.85 [*]	4144.00 [*]		
BRS 1001 IPRO					
Tratamento	0 h	24 h	192 h	CV%	F_{trat.}
Controle 01 ^{***}	115.65 aB	116.12 bA	116.22 bcA	0.23	6.22 ^{**}
Controle 02 ^{****}	115.87 aA	115.67 bA	115.72 cA	0.88	0.06 ^{ns}
Injúria. mecânica	116.57 aB	145.13 aA	145.02 aA	0.41	4321.30 [*]
Herbivoria. prévia	116.92 aA	116.58 bA	116.60 bA	0.38	0.88 ^{ns}
CV%	0.62	0.55	0.39		
F _{trat.}	3.35 ^{**}	2263.73 [*]	4415.81 [*]		

Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Repetições: 5. ^{ns}: não significativo. ^{*}Significativo a 1% de probabilidade. ^{**}Significativo a 5% de probabilidade. Número de repetições: 5. ^{***}Em sala individualizada da casa de vegetação.

^{****}Em casa de vegetação com tratamentos de injúria mecânica e herbivoria prévia.

Para os resultados dos teores de compostos fenólicos do extrato metanólico, das folhas de cultivares de soja BRS 1001 IPRO, ocorreu diferenças estatísticas das amostras coletadas das plantas no tempo 24 e 192 horas de injúria mecânica em relação aos controles. Após 24 horas no tratamento injúria mecânica houve um aumento significativo de compostos fenólicos, com estabilização até 192 horas. A concentração dos compostos fenólicos tóxicos na planta é um fator importante na dissuasão e o acúmulo de fenóis em partes específicas da planta representam uma barreira na alimentação de herbívoros (SIMMONDS et al. 2001), o que observado para a BRS 284 neste trabalho.

Em relação a soja neste estudo foi constatado a relação de injúria mecânica e herbivoria prévia com os teores de compostos fenólicos. No trabalho Nautiyal et al. (2016), ao analisarem os teores de fenóis e flavonoides totais no extrato metanólico, obtidos das folhas de trinta e três genótipos de soja, observaram que a herbivoria causa aumento de compostos fenólicos e resistência à *Spodoptera litura*. Bi & Felton (1995).

Com base nestas informações e com os resultados obtidos é possível inferir que a soja BRS 284, respondeu por meio de defesa química a injúria mecânica e a herbivoria prévia. Segundo Lattanzio et al. (2006), cultivares atualmente desenvolvidas para aumentar os níveis de compostos fenólicos podem influenciar diferentes aspectos das interações planta-patógeno e planta-inseto. Estudos sobre essas interações são necessários para melhor elucidar como o aumento da expressão de um composto fenólico endógeno ou de uma classe ou subclasse de fenólicos em plantas poderia influenciar a resistência vegetal contra patógenos e insetos fitófagos. A identificação destes compostos que são produzidos em maior ou menor quantidades durante a resposta da planta ao ataque de herbívoros, e que podem conferir resistência aos herbívoros, pode ser uma ferramenta importante para o melhoramento genético de plantas.

Por outro lado, a BRS 1001 IPRO, que possui os genes *cp4-epsps* e *cryIAc* o que assegura tolerância às principais espécies de lagarta que afetam a cultura da soja, foi possível

constatar que nesta cultivar por apresentar toxinas específicas contra seus insetos-alvo, a herbivoria não foi um gatilho para impulsionar a produção significativa de compostos fenólicos, por outro lado foi suscetível à injúria mecânica.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que a presença de lagartas de *S. frugiperda* na soja provoca resposta dos mecanismos de defesa da planta, ocasionando maior mortalidade larval e pupal, aumento das fases larval e pupal e diminuição do peso pupal, bem como redução nas porcentagens de fêmeas férteis e de ovos viáveis, com aumento de compostos fenólicos em 24 e 192 h na cultivar BRS 284, ocorrendo aumento de compostos fenólicos em 24 e 192 h no tratamento injúria mecânica. Na cultivar BRS 1001 IPRO observou-se aumento da fase larval, diminuição do peso pupal e maior mortalidade larval e pupal, bem como menores porcentagens de fêmeas férteis e de ovos viáveis no tratamento herbivoria prévia e aumento de compostos fenólicos em resposta ao tratamento de injúria mecânica, decorridas 24 h nesta cultivar.

Comparando-se a cultivar convencional BRS 284 e a transgênica BRS 1001 IPRO, observaram-se diferenças significativas, com menor duração da fase pupal, porcentagem de fêmeas férteis e viabilidade de ovos no tratamento herbivoria prévia e maior peso pupal no tratamento injúria mecânica na cultivar BRS 1001 IPRO.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradecemos também à Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural (AGRAER) e pelo apoio recebido da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB).

DECLARAÇÃO DE INTERESSES CONFLITANTES

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

REFERÊNCIAS

ADDAI, Z. R., et al. Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant properties of two papaya cultivars. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 7, n. 47, p. 3354-3359, 2013. Disponível em: <<https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-abstract/E8B39F742162>>. Acesso em: 10 Ago. 2018. doi: 10.5897/JMPR2013.5116.

BERNARDI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 x MON 89788 no Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2012.

BERNARDI, O. et al. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop protection**, v. 58, p. 33-40, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219414000040>>. Acesso em: 8 Ago. 2018. doi: 10.1016/j.cropro.2014.01.001.

BI, J. L.; FELTON, G. W. Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 10, p. 1511-1530, 1995. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02035149>>. Acesso em: 20 Dez. 2018. doi: 10.1007/BF02035149.

BOGORNI, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 2, p. 311-317, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-566X2005000200020&script=sci_arttext>.

Acesso em: 2 Ago. 2018. doi:10.1590/S1519-566X2005000200020.

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p.

e62268, 2013. Disponível em: <<https://journals.plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0062268>> Acesso em: 15 Ago. 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0062268.

CHOWN, S. L.; NICOLSON, S. W. **Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns**. New York, Oxford University Press, 2004, 243p.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Spec., v. 80, p. 1-12. Cooperative Extension Service, Agriculture and Home Economics Experiment Station. Iowa State University, Ames, USA, 1977.

FIUZA, L. M. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia. Ciência & Desenvolvimento**, n. 38, p. 32-35, 2009. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/124666-Biotecnologia-ciencia-desenvolvimento-no-38-1.html>> Acesso em: 05 Jan. 2019.

GREENE, G. L. et al. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jee/article-abstract/69/4/487/2212175>> Acesso em: 20 Ago. 2018. doi: 10.1093/jee/69.4.487.

HAMMERSCHMIDT, R. Introduction: Definitions and Some History. In: WALTERS, D. R.; NEWTON, A. C; LYON, G. D. (Ed). **Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection**, 2. ed. John Wiley and Sons, New Jersey, p. 1-10, 2014.

HEIL, M.; TON, J. Long-distance signalling in plant defence. **Trends in plant science**, v.13, n. 6, p. 264-272, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138508001271>> Acesso em: 28 Set. 2018. doi: 10.1016/j.plants.2008.03.005.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. Resistencia constitutiva e induzida em plantas a insetos e a metabólica. Embrapa Soja. In: **Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia**, Curitiba-PR, 2012.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM Crops**. Ithaca: ISAAA, 2017. n. 52.

LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas aos insetos**. Ícone, São Paulo, SP, 1991. 336p.

LATTANZIO, V. et al. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in research**, v. 661, n. 2, p. 23-67, 2006. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/6f2b/7077f3ec10ee38bcb504eece06d67e914f5b.pdf>> Acesso em: 28 Nov. 2018.

MARTI, G. et al. Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, n. 3, p. 621-639, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pce.12002>> Acesso em: 28 Jul. 2018. doi: 10.1111/pce.12002.

NAUTIYAL, A. et al. Effect of soybean plant phenols and flavonoid on the mean leaf area consumed by *Spodoptera litura* and *Spilosoma obliqua* larvae. **Journal of Applied and Natural**, v. 8, n. 4, p. 1931-1936, 2016. Disponível em: <<http://journals.ansfoundation.org/index.php/jans/article/view/1065>>. Acesso em: 28 Nov. 2018. doi: 10.31018/jans.v8i4.1065.

PARRA, J. R. P. **Criação de insetos para estudos com patógenos**. Controle microbiano de insetos. São Paulo: Manole, 1986, p. 348-373.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S., et al. Validation of spectrophotometric methodology for quantify flavonoid content in *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 44, no 4, p. 683-689, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322008000400015&script=sci_arttext&lng=pt> Acesso em: 10 Ago. 2018. doi: 10.1590/S1516-93322008000400015.

PENCOE, N. L.; MARTIN, P. B. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval development and adult fecundity on five grass hosts. **Environmental entomology**, v.11, n. 3, p. 720-723, 1982. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ee/article-abstract/11/3/720/2393019>> Acesso em: 10 Ago. 2018. doi: 10.1093/ee/11.3.720.

PERUCA, R. D. et al. Impacts of soybean-induced defenses on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) development. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 12, n. 2, p. 257-266, 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11829-017-9565-x>> Acesso em: 5 Ago. 2018. doi: 10.1007/s11829-017-9565-x.

SHELTON, A. M. et al. IPM and insect-protected transgenic plants: thoughts for the future. In: Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops Within IPM programs. **Springer, Dordrecht**, v. 5, p. 419-429, 2008. <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-8373-0_14> Acesso em: 05 Jan. 2019. doi:10.1007/978-1-4020-8373-0_14.

SANAHUJA, G. et al. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**. v. 9, p. 283–300, 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x>>. Acesso em: 10 jun. 2018. doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, p. 71-78, 2002. Disponível em: <<http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev41/Art410.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Assistance**. In: 7 th World Congress on Computers in Agriculture Conference Proceedings, p. 22-24, Jun. 2009, Reno, Nevada. American Society of Agricultural and Biological Engineers, p. 1, 2009. Disponível em: <https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=29066>>. Acesso em: 13 jun. 2018. doi: 10.13031/2013.29066.

SILVEIRA, L. C. et al. Efeito de genótipos de milho no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 2, p. 291-298, 1997. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/aseb/v26n2/v26n2a10.pdf>>. Acesso em: 12 Abr. 2018.

SIMMONDS, M. S. J. et al. Insect Antifeedant Activity of Three New Tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 8, p. 1117-1120, 2001. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np010197o>>. Acesso em: 20 Dez. 2018. doi: 10.1021/np010197o.

RODRÍGUEZ H., C.; VENDRAMIM, J. D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Pragas**, 1996. v. 42, p. 14-22.

TABASHNIK, B. E. et al. Insect resistance to *Bt* crops: lessons from the first billion acres. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510, 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nbt.2597>>. Acesso em: 20 Abr. 2018. doi: 10.1038/nbt.2597.

TANZUBIL, P. B.; MCCAFFERY, A. R. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*. **Crop Protection**, v. 9, n. 5, p. 383-386, 1990. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/026121949090012V>. Acesso em: 22 Abr. 2018. doi: 10.1016/0261-2194(90)90012-V.

VELOSO, E. S. **Resistência de cultivares de soja a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração: Sistemas de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/98824>>. Acesso em: 25 Abr. 2018.

CAPITULO III – Diferenças no perfil de compostos fenólicos constitutivos de cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO via análises cromatográficas por HPLC

Diferenças no perfil de compostos fenólicos constitutivos de cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO via análises cromatográficas por HPLC

Differences in the profile of phenolic compounds constitutive of soybean cultivars BRS 284 and BRS 1001 IPRO through HPLC chromatographic analysis

Ricardo Dias PERUCA¹; Antonia Railda ROEL¹; Rosemary MATIAS²; Claudia Andrea Lima CARDOSO³; Deizeluci de Fátima Pereira ZANELLA⁴

1. Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, Universidade Católica Dom Bosco - UCDB. Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário, Campo Grande - MS, 79117-900, Brasil; ricardoperuca@yahoo.com.br, arroel@ucdb.br; 2. Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade Anhanguera - Uniderp, Rua Ceará, 333 - Miguel Couto, Campo Grande - MS, 79005-000. Brasil; rosematiasc@gmail.com; 3. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Curso de Química, Caixa Postal 351, 79804-970, Dourados/MS, Brazil; claudia@uems.br; 4. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Campus Aquidauana, Aquidauana - MS, Brasil, deizelucipz@hotmail.com

ABSTRACT

In Brazil, there is a greater presence of genetically modified cultivars in soybean crop, approaching 100% of cultivated areas, where large investments in research and development were responsible for the expansion of these transgenic cultivars resistant to glyphosate herbicide and specific insect pests. The objective of this study was to conduct a comparative study of the chemical profile of soybean cultivar BRS 284 and its transgenic isolate *Bt* BRS 1001 IPRO. For this, the chemical composition of soybean leaf isolates, BRS 284 and BRS 1001 IPRO was evaluated by high performance liquid chromatography. In greenhouse the soybean cultivars were sown in pots, when the plants reached V6 vegetative stage, the leaves were collected for chemical analysis. A completely randomized statistical design was used, data were submitted to analysis of variance. The two cultivars BRS 284 and BRS 1001 IPRO did not present differences in six analyzed compounds (gallic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, quercetin and luteolin), producing the same amounts, only the rutin showed higher amounts in the transgenic cultivar BRS 1001 IPRO an important metabolite responsible for plant defense against insects, which may be an ally in the control of *S. frugiperda* due to the negative effect that this exerts on its development.

KEY WORDS: Phenolic compounds, flavonoids, *Glycine max*, HPLC.

Este trabalho foi elaborado segundo as normas: Revista Bioscience Journal.

INTRODUÇÃO

A soja está entre as culturas mais importantes do agronegócio brasileiro com uma produção de aproximadamente 115 milhões de toneladas em 2018 conforme CONAB (2018), sendo que o complexo soja respondeu por US\$ 31,7 bilhões das exportações do Brasil em 2017 segundo Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços - MDIC (2018).

Nas últimas décadas a biotecnologia tem sido fundamental para o melhoramento genético da soja e outros produtos agrícolas no Brasil, visando melhorar a qualidade de plantas e aumentar a produtividade agrícola de forma sustentável, conforme Costa e Queiroz (2015) com a seleção e inserção de genes que expressão proteínas capazes de conferir resistência a insetos-praga.

Segundo Costa e Queiroz (2015) plantas como a soja tiveram melhoramento genético por meio da combinação de genes da bactéria *B. thuringiensis*, com o intuito de reduzir o uso de inseticidas químicos, reduzir a infestação de insetos pragas, melhorar a qualidade da planta e tornar o cultivo um processo econômico ao agricultor.

No Brasil 94% da soja plantada no ano de 2015 eram transgênicas (CUNHA; ESPÍNOLA, 2016), o que mostra a grande expansão da soja transgênica no nosso país (LEITÃO et al., 2018).

As especificidades regionais das cultivares transgênicas são as mesmas existentes nas convencionais, a diferença marcante sempre fica por conta de um detalhe que é conseguido a partir da modificação no material genético da variedade obtida, as demais características desejáveis das cultivares convencionais, acabam sendo transferidas, também, para as cultivares transgênicas (ROESSING; LAZZAROTTO, 2005).

Em 2010 foi aprovado no Brasil o primeiro evento de soja resistente a insetos, a soja MON 87701 × MON 89788 (*Bt/RR2*), *Glycine max* (L.) Merrill que possui genes que codificam a expressão da proteína *Cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e a proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) de *Agrobacterium* sp. que confere tolerância ao herbicida glifosato (BERNARDI, 2012).

O mecanismo de ação das proteínas *Cry* só é possível mediante a ligação nos receptores específicos de insetos alvos, esse fato comprova que os riscos de atingir insetos não alvos é quase zero, assim como as chances de causar alguma patogenicidade em organismos de humanos é também considerada baixa, uma vez que, para manifestar os seus efeitos tóxicos o meio deve ser alcalino, caso contrário, a proteína é facilmente degradada (COSTA; QUEIROZ, 2015).

A soja transgênica BRS 1001 IPRO possui tecnologia Intacta RR2 PRO com tolerância ao glifosato (N-(fosfonometil) glicina) e o auxílio no manejo de um complexo específico de lagartas pragas, proporcionam diminuição no uso de defensivos agrícolas e aliado a isso, há o ganho genético em produtividade das novas cultivares (PIPOLO et al., 2015).

Silva e Brogin (2017) analisaram custo de produção e estimativas de receita das áreas de cultivo de soja convencional e transgênica, nas principais regiões produtoras de soja em Mato Grosso, em um cenário agrícola projetado para a safra 2016/17 o cultivo de soja convencional foi mais viável economicamente aos produtores de soja de todas regiões avaliadas, a receita líquida excedente movimentada pelos produtores de soja convencional torna seu cultivo um nicho de mercado de forte impacto na economia do Estado de Mato Grosso.

Apesar do avanço tecnológico de produção de novas cultivares convencionais e transgênicas, pouco ainda se tem investigado sobre a resposta metabólica de defesa destas plantas especificamente comparando cultivares convencionais e suas respectivas versões isolinha transgênica derivadas. Se faz necessário conhecer os principais metabólitos de defesa

de plantas desta espécie para entender os mecanismos de defesa de ambas e com isto fornecer informações concretas a respeito destes metabólitos.

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo do perfil químico de plantas de soja cultivar BRS 284 e sua isolinha transgênica BRS 1001 IPRO, com abordagem baseada no uso de cromatografia líquida de alta eficiência.

MATERIAL E MÉTODOS

Em casa de vegetação

O cultivo da soja ocorreu em casa de vegetação, Universidade Católica Dom Bosco (20°23'15,04"S; 54°36'24,87"W; altitude: 646 m) de janeiro a fevereiro de 2016. O ambiente foi mantido a 28 ± 2 °C, com seis regas diárias de 2 min por microaspersão, suprimindo as necessidades hídricas.

Após análise de solo, procedeu-se à adubação recomendada para a cultura, com sulfato de amônio, superfosfato simples e cloreto de potássio, além de correção com calcário dolomítico. Sementes da cultivar BRS 284 e de sua parental genealógica direta BRS 1001 IPRO foram semeadas em vasos de 3 L com solo em 14 de janeiro de 2016.

Quando as cultivares BRS 284 e sua isolinha transgênica BRS 1001 IPRO estavam em estágio vegetativo V6, foram coletados cinco trifólios de cada cultivar de plantas diferentes. O material coletado de cada cultivar, separadamente, foi acondicionado em envelope de alumínio, rotulado e submetido a nitrogênio líquido, posteriormente embalado a vácuo em saco polietileno, atóxicos, e armazenado em freezer (-80 °C) por 15 meses.

Extrato Hidrometanólico e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As amostras de cada cultivar, mantidas em freezer (-80 °C) por 15 meses, foram trituradas por turbolize, durante dois minutos, e extraídas exaustivamente com uma solução hidrometanólica (1:4), por percolação, por 7 dias em temperatura entre 26 °C a 30 °C \pm 1 °C. O solvente foi eliminado em rotaevaporador (Tecnal®, MA120), e o extrato bruto hidrometanólico foi submetido a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD).

As amostras foram analisadas em um sistema analítico LC (LC-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) com um detector de arranjo de diodos (DAD) monitorado em $\lambda = 200 - 600$ nm. Foi utilizada uma coluna C-18 (25 cm x 4,6 mm; tamanho de partícula, 5 μ m;), com uma pequena pré-coluna (2,5 cm x 3 mm) contendo o mesmo empacotamento, usada para proteger a coluna analítica. Em cada análise, a taxa de fluxo e o volume injetado foram definidos como 1,0 μ L/min e 20 μ L, respectivamente. Todas as análises cromatográficas foram realizadas a 22 °C.

A eluição foi realizada utilizando uma fase móvel binária de água com 6% de ácido acético e 2 mM de acetato de sódio (eluente A) e acetronitrila (eluente B). O gradiente aplicado foi: 5% B (0 min), 15% B (30 min), 50% B (35 min) e 100% B (45 min). Os padrões de ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, rutina, quercetina e luteolina (Sigma, ~ 97%) foram preparados na concentração inicial de 1000 μ g/mL. As concentrações dos compostos foram determinadas por calibração externa após diluições apropriadas no intervalo de 0,01-10 μ g/mL.

Adotou-se delineamento estatístico inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Assistat 7.7 beta INPI 0004051-2 (SILVA; AZEVEDO, 2002; 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos compostos utilizados como padrão, ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, rutina, quercetina e luteolina, detectados nas folhas das cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO (Tabela 01) apenas para a rutina observou-se diferença significativa entre os tratamentos, sendo superior para BRS 1001 IPRO em relação a cultivar convencional.

A rutina, um flavonoide glicosilado, pertencente à subclasse dos flavonóis, foi descrita para as folhas de soja de várias cultivares. Os trabalhos apontam a importância deste polifenol como defesa da planta contra insetos, especialmente os lepidópteros, devido aos seus efeitos antinutricionais (SALVADOR et al., 2010) este composto foi detectado no genótipo de soja 227687 e 274454 que tem sido indicado na utilização em programas de criação como fonte de resistência contra os insectos desfolhantes (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; PIUBELLI et al., 2005).

Para a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae), a rutina, o ácido clorogênico (ácido fenólico) e a alfa-tomatina (glicoalcaloides que ocorre na cultura de tomates), quando acrescentados à dieta alimentar, de forma independente, afetaram negativamente o desenvolvimento da lagarta (STAMP; ORSIER, 1998). Em outro trabalho, também com *S. frugiperda* utilizando a rutina e o ácido clorogênico, na dieta alimentar, foi observado um significativo atraso no desenvolvimento larval (RIBEIRO et al., 2012). Com estas informações fica evidente que a rutina tem a capacidade de afetar a biologia do inseto. Estudos mostram que a rutina, pode afetar negativamente a biologia de *S. frugiperda* com aumento do período larval e redução do peso das larvas e das pupas e a sobrevivência das pupas (SILVA et al., 2016).

Avaliação do efeito de extratos de folha de tomateiro sobre o desenvolvimento e sobrevivência larval de *S. frugiperda*, dois semioquímicos (Rutina e ácido clorogênico), presentes também em tecidos de outras espécies vegetais, já foram relatados por outros autores como ativos sobre o comportamento de diversas pragas (RIBEIRO et al., 2013)

Dos demais compostos identificados e quantificados estão os quatro compostos fenólicos simples (ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico), (Tabela 1), os quais são comuns em diversas espécies vegetais e em geral atuam na defesa da planta. Os compostos fenólicos simples, são formados por duas rotas metabólicas básicas, a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico, a rota do ácido chiquímico participa na biossíntese da maioria dos fenólicos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009), no caso dos flavonoides tem biossíntese mista, pelas duas rotas metabólicas (TOMBA et al., 2012).

Tabela 1. Compostos identificados e quantificados em amostras de cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO por análise de HPLC, cultivadas em casa de vegetação, mantidas em Temp. de 28 °C. Jan. Fev. 2016, Campo Grande, MS

Picos	Tempo de	Compostos	BRS 284	BRS 1001 IPRO	CV%
	retenção (min) M±DP		µg/g M±DP	µg/g M±DP	
1	3,68±0,03	Ácido Gálico	12,01±0,04 a	12,61±0,02 a	6,81
2	8,64±0,02	Ácido cafeico	13,71±0,16 a	12,50±0,04 a	10,58
3	13,48±0,04	Ácido <i>p</i> - cumárico	29,37±0,03 a	29,77±0,03 a	3,57
4	17,28±0,02	Ácido ferúlico	55,96±0,06 a	54,29±0,03 a	4,48
5	25,10±0,03	Rutina	16,57±0,02 b	17,46±0,02 a	1,33
6	35,33±0,02	Quercetina	6,24±0,02 a	6,40±0,01 a	3,72
7	36,68±0,02	Luteolina	13,99±0,02 a	14,43±0,02 a	2,52

M=média DP= Desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade)

Os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade de funções nos vegetais, o ácido caféico tem como propriedade a ligação entre si e outros compostos e o ácido ferúlico podem ser liberados no solo e inibir o crescimento das plantas adjacentes (TAIZ; ZEIGER, 2009). Para outros autores, os compostos fenólicos são as únicas moléculas defensivas supostamente presentes em todas plantas, eles desempenharam um papel central nas teorias das interações planta-herbívoros (FEENY, 1976; RHOADES; CATES, 1976; WAR et al., 2012).

Pode-se constatar que o conteúdo total de compostos fenólicos simples da BRS 284, 111,05 µg/g, foi superior a BRS 1001 IPRO, 109,17 µg/g, já para o conteúdo total de flavonoides não seguiu o mesmo perfil, a BRS 1001 IPRO, 38,29 µg/g, foi superior em relação a BRS 284, 36,8 µg/g.

Dentre os compostos fenólicos simples quantificados o ácido ferúlico, um fenilpropanoide, é o majoritário, mesmo em relação aos flavonoides. Segundo Garcia e Carril (2011), os ácidos *trans*-cinâmico e *p*-cumárico são metabolizados para formar ácido ferúlico e ácido cafeico cuja função principal é ser precursor de outros derivados complexos como: cumarinas, ligninas, taninos, flavonoides e isoflavonoides. Báidez et al. (2007) observaram a modificação estrutural do xilema e possível participação de compostos fenólicos na defesa natural ou mecanismos de resistência de plantas olivícolas infectadas com *Verticillium dahliae* e sugerem fortemente que eles estão envolvidos em mecanismos naturais de defesa ou resistência neste material vegetal, sendo os mais ativos, quercetina e agliconas de luteolina, seguidos por rutina, oleuropeína, luteolina-7-glicosídeo, tirosol, ácido *p*-oceaírico e catequina.

Já é conhecida a resposta das plantas quando expostas a herbivoria. Para plantas de algodão infestada com *Helicoverpa zea*, foi constatado um aumento nos níveis de ácido gálico, ácido siríngico, clorogênico, e ácido ferúlico (BI et al., 1997). Esta elevação pode ser explicada como um mecanismo de defesa que atua como barreira a alimentação de insetos.

As cultivares investigadas BRS 284 e sua isolinha BRS 1001 IPRO com modificação de resistência para herbicida glifosato e insetos pragas específicos, tal como Bernardi et al. (2014) (*A. gemmatilis*, *Chrysodeixis includens*, *Heliothis virescens*, *Epinotia aporema*), apresentaram aumento neste trabalho de flavonoide específico, a rutina um importante metabólito responsável pela defesa da planta contra insetos, que poderia ser um aliado no controle de *S. frugiperda* devido efeito negativo que este exerce no seu desenvolvimento. porém há necessidade de uma melhor elucidação dos constituintes majoritários em comparação a soja convencional.

CONCLUSÃO

As duas cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO não apresentaram diferenças na quantidade dos seis compostos analisados, exceto para a rutina, com maiores quantidades na cultivar transgênica BRS 1001 IPRO.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradecemos também à Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural (AGRAER) e ao apoio da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB).

RESUMO

No Brasil observa-se a maior presença de cultivares geneticamente modificadas na cultura da soja, se aproximando de 100% das áreas cultivadas, onde os grandes investimentos em pesquisa e desenvolvimento foram responsáveis pela expansão destas cultivares transgênicas resistentes ao herbicida glifosato e insetos pragas específicos. Objetivou-se realizar um estudo comparativo do perfil químico de soja cultivar BRS 284 e sua isolinha transgênica *Bt* BRS 1001 IPRO. Para tanto, avaliou-se a composição química de folhas de soja cultivares isolinhas, BRS 284 e BRS 1001 IPRO por cromatografia líquida de alta eficiência. Em casa de vegetação as cultivares de soja, foram semeadas em vasos, quando as plantas atingiram estágio vegetativo V6, as folhas foram coletadas para análises químicas. Adotou-se delineamento estatístico inteiramente casualizado, os dados obtidos foram submetidos a análise de variância. As duas cultivares BRS 284 e BRS 1001 IPRO não apresentaram diferenças em seis compostos analisados (ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, quercetina e luteolina), produzindo as mesmas quantidades, apenas a rutina apresentou maiores quantidades na cultivar transgênica BRS 1001 IPRO importante metabólito responsável pela defesa da planta contra insetos, que pode ser um aliado no controle de *S. frugiperda* devido ao efeito negativo que este exerce no seu desenvolvimento.

PALAVRAS-CHAVE: Composto fenólicos, flavonoides, *Glycine max*, HPLC.

REFERÊNCIAS

BÁIDEZ, A. G.; GÓMEZ, P.; DEL RÍO, J. A.; ORTUÑO, A. Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3373-3377, mar. 2007. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf063166d>

BERNARDI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 x MON 89788 no Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BERNARDI, O.; SORGATTO, R. J.; BARBOSA, A. D.; DOMINGUES, F. A.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop protection**, v. 58, p. 33-40, abr. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.01.001>

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - maio 2018**. LSPA - Produção, por período da safra e produto (toneladas), Brasil, maio 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

CUNHA, R. C. C.; ESPÍNDOLA, C. J. A Relevância do Progresso Técnico na Consolidação da Cadeia Produtiva da Soja no Sul do Estado do Maranhão (Brasil). **Geografia (Londrina)**, v. 25, n. 1, p. 87-106, jan/jun. 2016. <http://dx.doi.org/10.5433/2447-1747.2016v25n1p87>

COSTA, L. E. C.; QUEIROZ, E. S. M. Plantas geneticamente modificadas com toxinas de *Bacillus thuringiensis*: uma ferramenta para conferir resistência contra insetos praga. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 99-106, jul./dez. 2015. <http://dx.doi.org/10.5102/ucs.v12i2.2806>

FEENY, P. Plant apparency and chemical defense. In: **Biochemical interaction between plants and insects**. Springer, Boston, MA, 1976. p. 1-40. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2646-5_1

GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2011. Disponível em: <<http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>>. Acesso em: 15 jul. 2018.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; HARBORNE, J. B.; MCCAFFERY, A. R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 98, n. 2, p. 181-194, out. 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00773.x>

LEITÃO, F. O.; SILVA, W. H.; GRANEMANN, S. R.; RIBEIRO, J. G. B. L. Mudanças Organizacionais no Sistema Agroindustrial (Sag) da Soja Pós Inovação Tecnológica dos Transgênicos. **Revista Brasileira de Gestão e Inovação (Brazilian Journal of Management and Innovation)**, v. 5, n. 3, p. 145-171, mai/ago. 2018. <https://doi.org/10.18226/23190639.v5n3.07>

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, ago. 2012. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>

MDIC - Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. Séries Históricas, **Grupos de Produtos: Exportação**. 2018. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/index.php/comercio-exterior/estatisticas-de-comercio-exterior/series-historicas>>. Acesso em: 10 jul. 2018.

PIPOLO, A. E.; CARNEIRO, G. E. S.; MELO, C. L. P.; LIMA, D.; FOLONI, J. S. S.; MIRANDA, L. C.; PETEK, M. R.; BORGES, R. S.; GOMIDE, F. B.; DALBOSCO, M.; DENGLER, R. U. **Cultivares de soja: macrorregiões 1, 2, e 3 Centro-Sul** do Brasil. EMBRAPA-CNPSO, Londrina, Brasil, ago. 2015. 56 p. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1022804>

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 7, p. 1509-1525, jul. 2005. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-5794-z>

RIBEIRO, P. E. A.; VIANA, P. A.; GUIMARAES, P. E. O.; FERRARI, D. B. V. P.; GONÇALVES, I. S.; DOS ANJOS, L. M.; TAKAHASHI, J. A. Efeito da rutina e do ácido clorogênico sobre a mortalidade e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). In: **Embrapa Milho e Sorgo-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 24., 2012, Curitiba. Anais web. Curitiba: SEB: UFPR, 2012. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/936637/1/Efeitorutina.pdf>

RIBEIRO, P. E. A.; MENDES, S. M.; VIANA, P. A.; DIAS, A. S.; SANTOS, C. A.; BATISTA, C. S.; REZENDE, E.; HEBACH, F. C.; RODRIGUES, G. T.; BARBOSA, T. A. N. **Avaliação do efeito de extratos de folha de tomateiro sobre o desenvolvimento e sobrevivência larval de *Spodoptera frugiperda***. Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 93 (INFOTECA-E), dez. 2013. 32 p. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/982963/1/bol93.pdf>

RHOADES, D. F.; CATES, R. G. Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. In: **Biochemical interaction between plants and insects**. Springer, Boston, MA, v. 10, p. 168-213, 1976.

ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J. **Soja transgênica no Brasil: situação atual e perspectivas para os próximos anos**. Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, v. 1, 2005. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/2/186.pdf>>. Acesso em: 10 agost. 2018.

SALVADOR, M. C.; BOIÇA JR, A. L.; De OLIVEIRA, M. C.N.; DA GRAÇA, J. P.; SILVA, D. M.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)? **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 774-783, set./out. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2010000500017>

SILVA, T. R. F. B.; AMEIDA, A. C. S.; MOURA, T. L.; SILVA, A. R.; FREITAS, S. S.; GONÇALVES JESUS, F. Effect of the flavonoid rutin on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, p. 165–170, 2016. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v38i2.27956>

SILVA, W. M.; BROGIN, R. L. Soja convencional versus transgênica: custo de produção e estimativas de receitas para o Estado de Mato Grosso. In: **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA, 36., 2017, Londrina, PR. Editado por BALBINOT JUNIOR; A. A.; HENNING, F. A.; CAMPOS LEITE, R. M. V. B. Resumos expandidos... Londrina: Embrapa Soja, Documentos, 388, 2017. p. 286-289.

STAMP, N. E.; OSIER, T. L. Response of five insect herbivores to multiple allelochemicals under fluctuating temperatures. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 88, n. 1, p. 81-96, out. 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00349.x>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2009. 848 p.
WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling and behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, ago. 2012. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>

TOMBA, A. C. B.; REZENDE, F. M.; MEYER, J. M.; SOARES, S. A. Metabolismo Secundário. p.57-63. In: **Botânica no Inverno 2012** / Org. de Righi, A. A. et al. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2012. 183 p.

FIGURAS DO APÊNDICE



Figura 1. Tratamentos de cultivares de soja BRS 284 e BRS 1001 IPRO dentro da casa de vegetação



Figura 2. Tratamentos de cultivares de soja BRS 284 dentro da casa de vegetação com gaiolas para contenção de *Spodoptera frugiperda* no tratamento herbivoria prévia



Figura 3. *Spodoptera frugiperda* sendo colocadas nas gaiolas no tratamento herbivoria prévia dentro da casa de vegetação



Figura 4. Trifólios de soja sendo acondicionado em envelope de alumínio, previamente rotulado e submetido a atmosfera de nitrogênio, para análise química



Figura 5. Trifólio de *Glycine max* com injúria mecânica na casa de vegetação



Figura 6 Trifólio de *Glycine max* sofrendo herbivoria de *Spodoptera frugiperda* em casa de vegetação



Figura 7. *Spodoptera frugiperda* individualizada em caixa tipo Gerbox para início de alimentação de *Glycine max* para avaliação de parâmetros biológicos



Figura 8. *Spodoptera frugiperda* individualizada alimentando-se de folha de *Glycine max* em caixa tipo Gerbox para avaliação de parâmetros biológicos



Figura 9. Gaiolas com casais de *Spodoptera frugiperda* para avaliação da reprodução



Figura 10. Amostras sendo extraídas com solução hidrometanólica por percolação

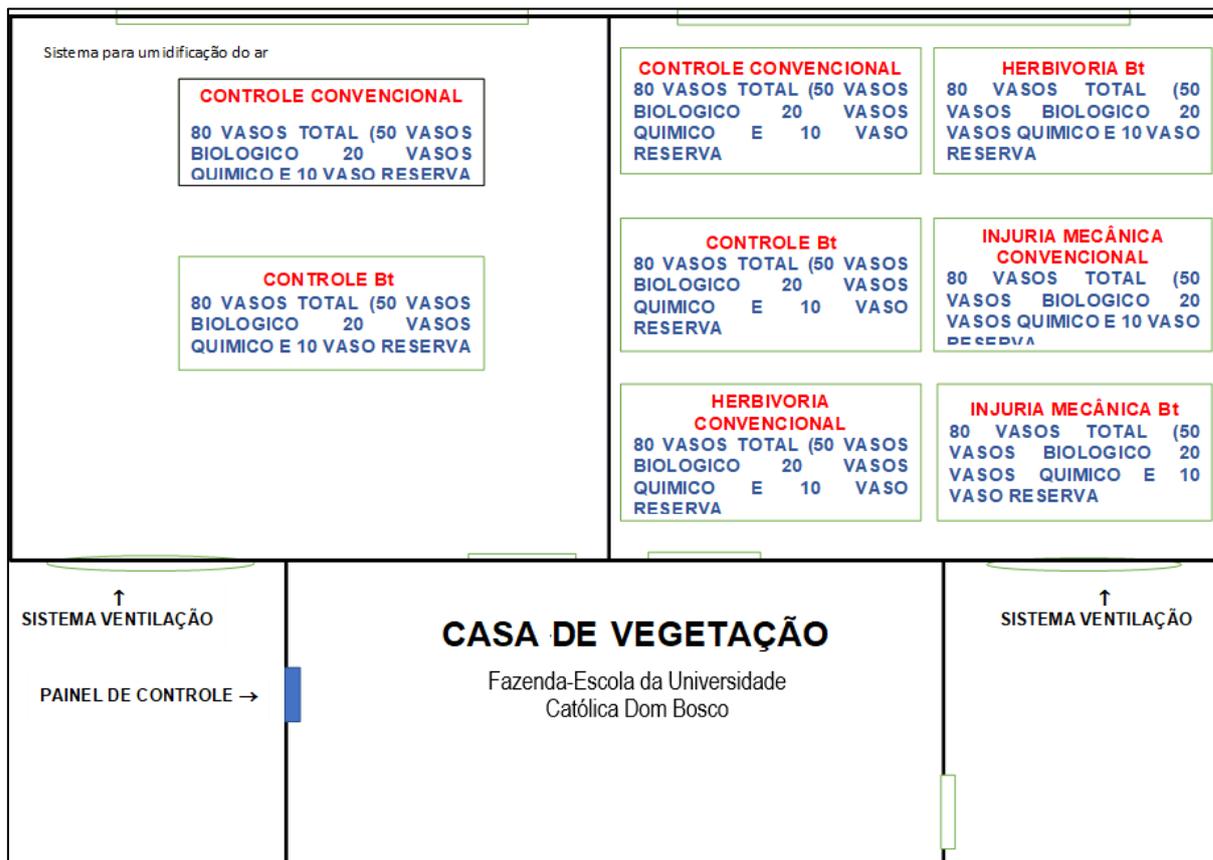


Figura 11. Layout da casa de vegetação com os tratamentos

Normas para publicação Revista Biologia Tropical

Siga a estrutura padrão de um artigo científico (não mescle resultados com discussão).

Aplique um corretor ortográfico automático e forneça o número total de palavras ao pé da primeira página.

Coloque fotografias nítidas a 300 DPI e ilustrações a 600 DPI (aceitamos JPG, TIFF, PNG e Photoshop). Etiquetas: Helvetica 10 pontos.(Confira nosso Guia de Figuras)

Faça o upload do seu manuscrito e anexe uma carta escaneada assinada por todos os co-autores, indicando: a- o documento é original e todos os co-autores concordam com sua publicação; b- os nossos requisitos éticos são cumpridos, c- os autores aceitam pagar a taxa de excesso de páginas, se necessário, e d- nomes e endereços de e-mail de três possíveis avaliadores objetivos. O sistema de submissão confirmará a recepção de arquivos após a conclusão do processo de envio, se nenhuma mensagem for recebida dentro de 24 horas, entre em contato biologia.tropical@ucr.ac.cr

Características do manuscrito

Apresenta informação original sobre biologia e / ou conservação de organismos tropicais

Estudo de campo detalhado (normalmente realizado durante um período de um ano ou mais) ou um estudo de laboratório em profundidade

Seção introdutória

No título, use letras maiúsculas para começar nomes próprios e nomes próprios. O título é curto e inclui, entre parênteses, Ordem e Família (artigos botânicos: somente Família).

A autoridade taxonômica (Autor, ano) para cada táxon aparece apenas na primeira vez em que cada táxon é mencionado no texto (nunca no título). Gênero em nomes binomial são escritos em apenas o primeiro tempo inteiro eles são usados no resumo, texto principal, *Resumen* e palavras-chave.

O endereço para correspondência é curto, mas completo; se houver vários, eles devem ser numerados. Inclua e-mails válidos para todos os co-autores. Não inclua números de telefone / fax.

O resumo (350-450 palavras) deve descrever a importância do problema a ser abordado, o tamanho da amostra, as datas das amostras, como o estudo foi realizado, os resultados mais relevantes e o que os autores concluíram. Deve ser um único parágrafo.

As palavras chave (cinco a sete) são separadas por vírgulas e devem ser mais gerais do que o título ou resumo.

A Introdução resume as descobertas recentes e termina com o objetivo do estudo

Seção de material e Métodos

Apresentar apenas as informações necessárias para repetir o estudo. Métodos previamente publicados são referenciados e brevemente descritos.

Não inclua um mapa apenas para um local de estudo; em vez disso, forneça suas coordenadas geográficas. Um mapa é apropriado para estudos com vários locais de amostragem.

Se amostras foram coletadas, elas devem ser depositadas em pelo menos uma instituição (liste seu respectivo número de catálogo na seção Materiais e métodos).

Quando relevante para os resultados, as especificações do equipamento devem incluir o número do modelo e o fabricante. Para produtos químicos, especifique apenas o fabricante.

As fórmulas matemáticas incluem uma descrição de cada componente.

O significado das siglas é explicado integralmente na primeira vez (mas evite siglas, se possível).

Use o Sistema Internacional de Unidades e suas abreviações, exceto que as decimais são indicadas com um período, milhares e milhões com um espaço, por exemplo. 12 523 235,15

Quando não são seguidas por unidades, números inteiros de zero a dez são gravados na íntegra (um, dois etc., não 1, 2 etc.).

Resultados

Os dados quantitativos são avaliados com testes estatísticos apropriados, que são reportados após cada resultado e entre parênteses. Exemplo: “Altura e velocidade foram positivamente correlacionadas (Spearman, $p < 0,05$)”.

Tabelas e Figuras

Evite figuras isoladas agrupando fotografias e ilustrações relacionadas (consulte o Guia de figuras no nosso site). Símbolos e escalas aparecem dentro da figura (nunca como nota de rodapé). **Etiquetas:** Helvetica 10 pontos.

Evite mesas muito longas ou muito curtas (meia página é um bom tamanho) e o uso de linhas verticais e horizontais nelas. Todos os símbolos e abreviaturas aparecem apenas nas notas de rodapé. Nenhuma fonte em negrito ou palavras totalmente escritas em maiúsculas.

Discussão

Esta seção compara seus resultados com dados publicados anteriormente. Nenhuma tabela ou figuras estão incluídas aqui.

Agradecimentos

Somente pessoas que deram uma assistência muito significativa são mencionadas. “Dr.”, “Prof.”, “Sra”, entre outros, não são usados, apenas nomes.

Resumo e palavras Chaves

O Resumen começa com o título do artigo em espanhol. O Resumen contém as mesmas informações e seções do Resumo em espanhol.

A palabra clave corresponde às palavras-chave, mas escritas em espanhol.

A equipe da Revista de Biología Tropical traduzirá o resumo e as palavras-chave para autores que não falam espanhol. Por favor, envie uma nota para o Editor.

Referências

Apresentar a lista de referências e citações dentro do texto no formato APA 6th Edition. Recomendamos o uso dos seguintes gerenciadores de referência gratuitos: zotero.org ou mendeley.com

Exemplos de referências:

Artigo de jornal

Torres, Jr., Infante-Mata, D., Sánchez, AJ, Espinoza-Tenório, A. & Barba, E. (2017). Atributos estructurales, productividad (hojarasca) e fenologia do manglar na Laguna Mecoacán, Golfo de México. *Revista de Biología Tropical*, 65(4), 1592-1608.

Livro

Hanson, PE & Nishida, K. (2016). *Insetos e outros artrópodes da América tropical*. Ithaca, NY: Imprensa da Universidade de Cornell.

Capítulo de livro

Pardini, R., da Rocha, PLB, El-Hani, C. e Pardini, F. (2013). Desafios e Oportunidades para Preencher a Lacuna de Pesquisa-Implementação em Ciência e Gestão Ecológica no Brasil. Em PH Raven, NS Sodhi e L. Gibson (Eds.), *Biologia da Conservação: Vozes dos Trópicos* (pp. 75-85). Oxford, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd.

Apenas publicações citadas aparecem em Referências e vice-versa. Os artigos não publicados são mencionados no texto como neste exemplo: (J. Smith, não publicado).

Diretrizes do autor

Antes de enviar um manuscrito para a *Revista de Biología Tropical*, é altamente recomendado que você leia sobre o nosso escopo e verifique se todos os **detalhes de formato e estilo** do seu documento estão de acordo com os requisitos do periódico. Isso evitará atrasos desnecessários causados por correções de formato e estilo solicitadas pela revista no início do processo de avaliação.

Nossa revista publica apenas em **inglês e espanhol**.

Para preparar o seu trabalho, leia atentamente os seguintes documentos:

- Guia de formato e estilo
- Guia de figuras

- Amostra de formato
- Carta de submissão de formulário

Depois de enviar seu manuscrito, considere o seguinte:

Uma mensagem automática será enviada para o seu email confirmando a recepção do seu manuscrito

Para verificar o status de seu manuscrito submetido, por favor entre em nosso sistema. Para consultas ou ajuda, contate: biologia.tropical@ucr.ac.cr

Quanto custa publicar um artigo na RBT?

Nosso periódico trabalha desde 1953 para publicar documentos valiosos sem ônus para os autores, uma política que ainda continua até hoje para manuscritos que, uma vez impressos, não **excedam 10 páginas** e não incluam **chapas coloridas**. Páginas adicionais custam US \$ 50 cada. Qualquer outra coisa será publicada como apêndices digitais, gratuitamente.

No entanto, se você puder ajudar a cobrir o custo de impressão de sua publicação (por exemplo, por meio de fundos de pesquisa), nós o incentivamos a fazê-lo. Você não apenas **ajudará a disseminar o conhecimento biológico**, mas também **apoiará outros colegas** que, especialmente em países menos industrializados, têm em nossa revista um meio acessível para distribuir suas descobertas no mundo científico.

Normas para publicação Revista Ciência Rural

CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados preferencialmente em idioma Inglês. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1^o rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso não traduzidos nesta etapa e se aprovados para publicação, terão que ser obrigatoriamente traduzidos para o Inglês por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

Empresas credenciadas:

- American Journal Experts (<http://www.journalexerts.com/>)
- Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
- BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)
- Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
- Editage (<http://www.editage.com.br/>) 10% discount for CR clients. Please inform Crural10 code.
- Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for special rates.
- GlobalEdico (<http://www.globaledico.com/>)
- JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)
- Liberty Medical Communications (<http://libertymedcom.com/>)
- Paulo Boschcov (paulo@bridgetextos.com.br, bridge.textecn@gmail.com)
- Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)
- Readytopub (<https://www.readytopub.com/home>)

O trabalho após tradução e o respectivo certificado devem ser enviados para: rudiweiblen@gmail.com

As despesas de tradução serão por conta dos autores. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.

Tendo em vista o formato de publicação eletrônica estaremos considerando manuscritos com páginas adicionais além dos limites acima. No entanto, os trabalhos aprovados que possuírem páginas além do estipulado terão um custo adicional para a publicação (vide taxa).

O artigo científico

(Modelo .doc, .pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

O preenchimento do campo "cover letter"

Deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, exceto para artigos submetidos em português (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- b) The question your research answers?
- c) Your major experimental results and overall findings?
- d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
- e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte tutorial.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

Nesse link é disponibilizado o arquivo de estilo para uso com o software EndNote (o EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos). Também é disponibilizado nesse link o arquivo de estilo para uso com o software Mendeley.

As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

Citação de livro:

JENNINGS, P.B. The practice of large animal surgery. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros. Manaus : INPA, 1979. 95p.

Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. The thyroid. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. Sampling techniques. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Stored Product Research, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. Ciência Rural , Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008 . Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-

84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. 'Sertanejo'. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150705 (Artigo publicado eletronicamente).

Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. Anais... Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad). 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

Boletim:

ROGIK, F.A. Indústria da lactose. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20). (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. Proceedings... Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online. Available from: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Accessed: Mar. 18, 2005 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

UFRGS. Transgênicos. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Online. Available from: <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001(OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. Maturitas, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Online. Available from: <[http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)>. Accessed: Mar. 18, 2007.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. Anais... Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre

em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

Todos os artigos encaminhados devem pagar a taxa de tramitação. Artigos reencaminhados (com decisão de Reject and Resubmit) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por decurso de prazo não terão a taxa de tramitação reembolsada.

Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa “Cross Check”.

Contribuição dos autores

Para se qualificar para a autoria do manuscrito submetido, todos os autores listados deveriam ter contribuições intelectuais substanciais tanto para a pesquisa quanto para sua preparação. Por favor, use um dos exemplos abaixo ou faça o seu.

Exemplo um

RW, RA e RCNO conceberam e projetaram experimentos. WC, LM e AA realizaram os experimentos, BB realizou as análises laboratoriais. BB supervisionou e coordenou os experimentos com animais e forneceu dados clínicos. BB realizou análises estatísticas de dados experimentais. WC, MB e NO prepararam o rascunho

do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

Exemplo dois

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

Exemplo três

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

Normas para publicação Bioscience Journal

A redação deve primar pela clareza, brevidade e concisão. O texto deve ser digitado em fonte Times New Roman, tamanho 11, espaço simples e com margem de, no mínimo, 2 cm. Todas as linhas deverão ser numeradas. Os trabalhos deverão ser apresentados sem identificação de autores. Os nomes dos autores, titulação e endereço de trabalho deverão ser apresentados nos metadados da submissão e, na carta de encaminhamento. Figuras e tabelas deverão ser inseridas no texto, o mais próximo possível de sua citação.

O artigo será encaminhado a três (03) revisores da área, no menor tempo possível, sem a identificação dos autores e, será considerado aprovado com 02 pareceres favoráveis.

Serão aceitos somente trabalhos redigidos em inglês, com apresentação de certificado de revisão feito por um expert na lingua inglesa.

A revista se reserva o direito de efetuar alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical nos originais, com vistas a manter o padrão culto da língua, respeitando, porém, o estilo dos autores. As provas finais serão enviadas aos autores, juntamente com o boleto para pagamento da publicação.

Os trabalhos publicados passarão a ser propriedade da revista Bioscience Journal, ficando sua reimpressão, total ou parcial, sujeita à autorização expressa da direção da revista. Deve ser consignada a fonte de publicação original.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis para impressão, no formato PDF, no endereço eletrônico da revista.

Será cobrada taxa de publicação, no valor de R\$ 40,00 (quarenta reais) por página publicada, dos trabalhos aprovados, para autores nacionais e \$ 40 (quarenta dólares) para autores estrangeiros. (A forma de pagamento será informada posteriormente).

Após a avaliação e aprovação do artigo, a revista classificará as colaborações de acordo com as seguintes categorias:

1. Artigos originais - Artigos que apresentem contribuição inteiramente nova ao conhecimento e permitam que outros investigadores, baseados no texto escrito, possam julgar as conclusões, verificar a exatidão das análises e deduções do autor e repetir a investigação se assim o desejarem. Devem conter: Título, Resumo (com 200 a 400 palavras) e Palavras-chave em Inglês, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão) e Conclusão (opcional), Agradecimentos (se couber). Título, Resumo (com 200 a 400 palavras) e Palavras-chaves em português e Referências. Os trabalhos não devem exceder a 20 páginas (incluindo texto, referências, figuras e anexos).

Apresentação dos Trabalhos

Formato: Todas as colaborações devem ser enviadas por meio do Sistema Eletrônico de Editoração de Revista – SEER, endereço: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions#onlineSubmissions>

O texto deve estar gravado em extensão RTF (Rich Text Format) ou em formato Microsoft Word (2010). Os metadados deverão ser obrigatoriamente preenchidos com o título do trabalho, nome(s) do(s) autor(es), último grau acadêmico, instituição que trabalha, endereço postal, telefone, fax e e-mail.

O texto será escrito cordialmente, com intercalação de tabelas e figuras, já inseridas no texto, em quantidade mínima necessária para a sua compreensão.

No corpo do trabalho não deverá constar os nomes dos autores, que deverão ser encaminhados separadamente, com dados pessoais (títulos, endereço para correspondência, e-mail e Instituição a que está ligado), como medida de sigilo.

Título do trabalho: O título deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo as palavras-chave que representem o conteúdo do texto separadas por ponto, ambos acompanhados de sua tradução para o português.

Resumo: Deve ser elaborado um resumo informativo com cerca de 200 a 400 palavras, incluindo objetivo, método, resultado, conclusão, acompanhado de sua tradução para o português. Ambos devem ter, no máximo, 800 palavras.

Palavras-chave: As palavras-chave e keywords não devem repetir palavras do título, devendo-se incluir o nome científico das espécies estudadas. As palavras devem ser separadas por ponto e iniciadas com letra maiúscula. Os autores devem

apresentar de 3 a 6 termos, considerando que um termo pode ser composto de duas ou mais palavras.

Agradecimentos: Agradecimentos a auxílios recebidos para a elaboração do trabalho deverão ser mencionados no final do artigo, antes das referências.

Notas: Notas contidas no artigo devem ser indicadas com um asterisco imediatamente depois da frase a que diz respeito. As notas deverão vir no rodapé da página correspondente. Excepcionalmente poderão ser adotados números para as notas junto com asteriscos em uma mesma página, e nesse caso as notas com asteriscos antecedem as notas com número, não importando a ordem dessas notas no texto. Apêndices: Apêndices podem ser empregados no caso de listagens extensivas, estatísticas e outros elementos de suporte.

Figuras e tabelas: Fotografias nítidas (preto e branco ou em cores), gráficos e tabelas em preto e branco (estritamente indispensáveis à clareza do texto) serão aceitos, e deverão ser assinalados, no texto, pelo seu número de ordem, nos locais onde devem ser intercalados. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte. (vide normas para elaboração de figuras, na próxima seção).

Os manuscritos, ainda que apresentem relevância científica e estejam metodologicamente corretos, poderão ser recusados se não apresentarem a devida organização e se estiverem fora das normas da Bioscience Journal.

NORMAS PARA ELABORAÇÃO DE FIGURAS

1. As figuras podem ser feitas em softwares de preferência dos autores (Excel, Sigma Plot, etc.), devendo ser inseridas e enviadas em formato TIFF ou JPG com resolução mínima de 300 dpi.

2. As figuras deverão ter largura máxima de 8,0 cm ou 16,0 cm.

3. Os títulos e a escala dos eixos x e y deverão ser em Times New Roman tamanho 11. As linhas dos eixos e demais linhas (e.g., curvas de regressão) deverão ter espessura de 0,3 mm. Todas as informações contidas no interior da figura (e.g., equações, legendas) deverão ser em Times New Roman tamanho 10 ou no mínimo 8. São dispensáveis as bordas, direita e superior, em gráficos.

4. Todas as figuras deverão ser inseridas convenientemente no texto logo após a sua chamada, consecutivamente e em números arábicos. As figuras deverão ser inseridas no texto por meio do comando "Inserir→Imagem/Figura→Arquivo".

5. As figuras podem ser constituídas por múltiplos gráficos, tanto na horizontal como na vertical, respeitando a largura máxima de 16,0 cm e 8,0 cm, respectivamente. Quando se tratar de figuras com vários gráficos, os mesmos deverão ser identificados por letras (A, B, C, D) em maiúsculo entre parênteses, fonte Times New Roman tamanho 11. Trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto são da responsabilidade do autor.

Informação oriunda de comunicação pessoal, trabalhos em andamento e os não-publicados não devem ser incluídos na lista de referências, mas indicados em nota de rodapé da página em que forem citados.

Referências: NBR 6023/2002. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto são da responsabilidade do autor. Informação oriunda de comunicação pessoal, trabalhos em andamento e os não publicados não devem ser incluídos na lista de referências, mas indicados em nota de rodapé da página onde forem citados.

As referências incluídas no final de cada artigo devem ser escritas em páginas separadas do texto principal, em ordem alfabética de acordo com as normas da ABNT NBR-6023, ago. 2002. Na lista de Referências, no final do artigo, todos os autores devem ser mencionados. Não é permitido o uso da expressão et al.

Observar os exemplos das referências abaixo:

Livro no todo:

GRAZIANI, Mário. Cirurgia buco-maxilo-facial. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. 676 p.

Capítulo de livro sem autoria própria:

PERRINS, C. M. Social systems. In: _____. Avian ecology. Glasgow: Blackie, 1983. cap. 2, p. 7-32.

Capítulo de livro com autoria própria:

GETTY, R. The Gross and microscopic occurrence and distribution of spontaneous atherosclerosis in the arteries of swine. In: ROBERT JUNIOR.; A., ATRAUSS, R. (Ed.). Comparative atherosclerosis. New York: Harper & Row, 1965. p. 11-20.

Monografias, Dissertações e Teses:

CORRALES, Edith Alba Lua Segovia. Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. 1997. 84 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997.

Trabalhos apresentados em eventos: Congressos, Seminários, Reuniões...

NOVIS, Jorge Augusto. Extensão das ações de saúde na área rural. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 7., 1980, Brasília. Anais... Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1980. p. 37-43.

Artigos de periódicos:

COHEN, B. I.; CONDOS, S.; DEUTSCH, A. S.; MUSIKANT, B. L. La fuerza de fractura de tres tipos de materiales para el muñon en combinacion com tres espigas endodontiacales distintas. R. Cent. C. Biomed. Univ. Fed. Uberlândia, Uberlândia, v. 13, n. 1, p. 69-76, dez. 1997.

Obs.: Quanto ao título de periódicos, deve-se adotar um único padrão. Na lista de Referências todos os títulos de periódicos devem vir abreviados ou todos por extenso e, em negrito.

Nota:

Quando se tratar de documento eletrônico, deve-se fazer a referência normal, acrescentando-se ao final informações sobre a descrição do meio ou suporte.

Exemplo:

Capítulo de livro com autoria própria disponível em CD-ROM:

FAUSTO, A. I. da F.; CERVINI, R. (Org.). O trabalho e a rua. In: BIBLIOTECA nacional dos direitos da criança. Porto Alegre: Associação dos Juizes do Rio Grande do Sul, 1995. 1 CD-ROM.

Artigo de periódicos em meio eletrônico:

ROCHA-BARREIRA, C. A. Caracterização da gônada e ciclo reprodutivo da *Collisella subrugosa* (Gastropoda: Acmaeidae) no Nordeste do Brasil. Brazilian Journal of Biology, São Carlos, v. 62, n. 4b, nov. 2002. Disponível em: Acesso em: 20 abr. 2003.

Recomendações: Recomenda-se que se observem as normas da ABNT referentes à apresentação de artigos em publicações periódicas (NBR 6023/2002),

apresentação de citações em documentos (NBR 10.520/2002), apresentação de originais (NBR 12256), norma para datar (NBR 5892), numeração progressiva das seções de um documento (6024/2003) e resumos (NBR 6028/2003), bem como a norma de apresentação tabular do IBGE.

Transferência de Direitos Autorais:

Todas as pessoas relacionadas como autores devem assinar a Transferência de Direitos Autorais:

“Declaro que, em caso de aceitação do artigo, a Bioscience Journal passa a ter os direitos autorais a ele referentes, que se tornarão propriedade exclusiva da Revista, vedado a qualquer reprodução, total ou parcial, em qualquer outra parte ou meio de divulgação, impressa ou eletrônica, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e, se obtida, farei constar o competente agradecimento à Revista.

Assinaturas do(s) autor(es) Data ___/___/___

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Declaração de Responsabilidade:

Todas as pessoas relacionadas como autores devem assinar a declaração de responsabilidade nos termos abaixo:

- Certifico que participei da concepção do trabalho para tornar pública minha responsabilidade pelo seu conteúdo, não omitindo quaisquer ligações ou acordos de financiamento entre os autores e companhias que possam ter interesse na publicação deste artigo;

- Certifico que o manuscrito é original e que o trabalho, em parte ou na íntegra, ou qualquer outro trabalho com conteúdo substancialmente similar, de minha autoria, não foi enviado a outra Revista e não o será, enquanto sua publicação estiver sendo considerada pela Bioscience Journal, quer seja no formato impresso ou no eletrônico.

Endereço para envio de trabalhos:

<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions#onlineSubmissions>

Condições Para Submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. Serão aceitos somente trabalhos redigidos em inglês.
A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; não sendo o caso, justificar em "Comentários ao Editor". _____
2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word (2010), RTF ou WordPerfect.
3. O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 11-pontos; emprega *itálico* ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.
4. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo (word) e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista. O texto cumpre com as normas de formatação da revista citados em "Diretrizes para os autores" na seção "Sobre".
5. No momento da submissão on line, o autor principal deverá enviar um ofício assinado por todos os autores, solicitando a submissão do artigo e a sua possível publicação, exclusivamente nesta revista. O ofício deverá ser digitalizado e transferido em "documentos suplementares".
6. Todos os endereços "URL" no texto (ex.:<http://pkp.ubc.ca>) estão ativos.
7. O artigo está sendo submetido corretamente na seção correspondente, de acordo com a sua área.
8. Os manuscritos mesmo apresentando relevância científica e estando metodologicamente corretos poderão ser recusados se apresentados de forma desorganizada e fora das normas da Bioscience Journal. Manuscritos bem escritos e apresentados de acordo com as normas são revisados com maior rapidez e, também, exigindo menor esforço dos revisores.
9. Será cobrada taxa de publicação, no valor de R\$ 40,00 (quarenta reais) por página publicada, dos trabalhos aprovados, para autores nacionais e \$ 30

(trinta dólares ou 30 euros) para autores estrangeiros(A forma de pagamento será informada posteriormente).

10. Todos os itens acima são requisitos básicos para a submissão de um artigo e, caso não estejam de acordo com as normas da revista, ou os metadados não estejam preenchidos corretamente, o referido artigo NÃO SERÁ considerado para avaliação.

Declaração de Direito Autoral

Os direitos autorais para artigos publicados nesta revista são do autor, com direitos de primeira publicação para a revista. Em virtude de aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços de email neste site serão usados exclusivamente para os propósitos da revista, não estando disponíveis para outros fins.

Taxas para Autores

Este periódico cobra as seguintes taxas aos autores.

Taxa para publicação: 40,00 (BRL),Será cobrada taxa de publicação, no valor de R\$ 40,00 (quarenta reais) por página publicada, dos trabalhos aprovados, para autores nacionais e \$ 40 (40 dólares ou 40 euros) para autores estrangeiros. (A forma de pagamento será informada posteriormente).

Bioscience Journal ISSN 1981-3163 - Versão Online

Universidade Federal de Uberlândia, Av. Para, 1720 Bloco 8C - Sala 108
Campus Umuarama B., Umuarama, 38400-902 - Uberlândia, MG, Brasil Fone: +55-34-3225-8688, biosciencej@ufu.br