



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANA EMIKO UEDA

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA SOJA COMO
INDICADORES DE ALIMENTAÇÃO NA FASE LARVAL DE
SPODOPTERA FRUGIPERDA E *CHRYSODEIXIS
INCLUDENS***

Londrina
2015

TATIANA EMIKO UEDA

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA SOJA COMO
INDICADORES DE ALIMENTAÇÃO NA FASE LARVAL DE
SPODOPTERA FRUGIPERDA E *CHRYSODEIXIS*
*INCLUDENS***

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

Orientador: Prof. Dr. Maurício Ursi Ventura

Co-orientadora: Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

U22m Ueda, Tatiana Emiko.

Metabólitos secundários da soja como indicadores de alimentação na fase larval de *Spodoptera frugiperda* e *Chrysodeixis includens* / Tatiana Emiko Ueda. – Londrina, 2015.

100 f. : il.

Orientador: Mauricio Ursi Ventura.

Coorientador: Clara Beatriz Hoffmann-Campo.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2015. Inclui bibliografia.

1. Lagarta da soja – Teses. 2. Soja – Teses. 3. Isoflavonas – Teses. 4. Insetos – Plantas hospedeiras – Teses. 5. Plantas – Resistência a insetos – Teses. I. Ventura, Mauricio Ursi. II. Hoffmann-Campo, Clara Beatriz. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 632.7:633.34

TATIANA EMIKO UEDA

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA SOJA COMO INDICADORES DE
ALIMENTAÇÃO NA FASE LARVAL DE *Spodoptera frugiperda* e
*Chrysodeixis includens***

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Maurício Ursi Ventura
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Co-orientadora: Dra. Clara Beatriz
Hoffmann-Campo
Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária – Embrapa Soja

Prof. Dr. Amarildo Pasini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Renato Assis de Carvalho
Monsanto do Brasil

Londrina, 27 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais, Rose e Hélio, e à minha avó Cecília, que me apoiaram desde o início, e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Sou eternamente grata a vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Maurício Ursi Ventura pela orientação, paciência e pela confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo, pela orientação, ensinamentos prestados e acima de tudo, pela amizade. Foi uma honra ser sua orientada durante todos esses anos. Minha admiração por você só aumenta com o decorrer do tempo.

Ao curso de Pós-graduação em Entomologia, da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realização do curso, e a todo corpo docente, especialmente ao Prof. Pedro Neves, Prof. Amarildo Pasini e Prof. Ayres Menezes.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Soja, por disponibilizar a estrutura necessária para realização dos experimentos.

Às pesquisadoras Dra. Maria Cristina Neves de Oliveira e Dra. Ivani Negrão e aos funcionários do Departamento de Estatística da Embrapa Soja, Tânia e Gilson pela importante colaboração nas análises estatísticas.

Aos funcionários do laboratório de Ecologia Química, Neiva, Giovani, João em especial ao Moisés pelo suporte técnico, auxílio na condução e avaliação dos experimentos.

Aos funcionários da Área Técnica de Entomologia da Embrapa Soja, Ivanilda, Jovenil, Fábio Paro, Miguel e Sérgio pela amizade, e também o auxílio fornecendo os insetos fundamentais para a realização dos experimentos.

Aos colegas do curso de Pós-graduação, Karla Lopes, Thiago Campos, Thiago Oro, Ronan Colombo, Camila Iossaqui, André Luis, Fernando por

terem tornado as aulas de estatística e seminários mais divertidas.

Aos alunos de pós-graduação e estagiários do laboratório de Ecologia Química, Mariana Closs, José Perez, Mayara Gois, Pamela Luski, Bárbara Dias, Paulo Ghizoni, Arthur Abelha pela imensa colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos que conquistei na Embrapa, em especial, Mariana Closs e José Perez que auxiliaram durante todas as fases deste trabalho.

À minha avó Cecília e aos meus avós Aparecida e Paulo, que sempre estiveram orando e torcendo por mim.

Às minhas amigas Thayanne Galdino, Pamela Luski, Larissa Gonçalves, Mariana Closs e Mayara Gois pela amizade tão especial.

Ao Italo Blanco, por estar presente em todos os momentos, sejam eles de bonança ou dificuldades. Pelo apoio nas horas de cansaço, estímulo nos momentos de indecisão, pela paciência, e por todo amor.

Aos meus pais, Rose e Hélio, por estarem sempre ao meu lado. A vocês, meu eterno amor e gratidão.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

UEDA, Tatiana Emiko. **Metabólitos secundários da soja como indicadores de alimentação na fase larval de *Spodoptera frugiperda* e *Chrysodeixis includens***. 2015. 100f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar os metabólitos secundários em extratos foliares das cultivares de soja mais semeadas no Brasil e a possibilidade de ocorrer sequestro destes compostos por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae). Os genótipos selecionados foram V. Max RR, BMX Apollo RR, BMX Potência RR, BRS 284, BRS 360 RR, NA 5909 RR, ANTA 82 RR, TMG 115 RR, M9144 RR, 98Y30, TMG 132 RR e Intacta RR2 PRO variedade DONMARIO 6458. As cultivares foram semeadas em casa-de-vegetação nas condições de 28 °C ± 2 e 70% UR. Para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos das folhas, amostras das cultivares foram coletadas no estágio V6, moídas, submetidas à extração em MeOH (90%), secas em vácuo, ressolubilizadas e analisadas em HPLC. No desenvolvimento das lagartas, estas foram mantidas em câmaras B.O.D. e alimentadas com as mesmas cultivares até a fase adulta. Após a emergência, o corpo dos adultos foi armazenado em ultrafreezer, numa temperatura de – 80 °C e liofilizados. Para a análise dos metabólitos secundários sequestrados pelas duas espécies de insetos, as asas e pernas foram removidas sendo o restante do corpo pesado, moído, extraído, hidrolisado e analisado no LC-MS/MS. Nos extratos foliares brutos (não hidrolisado), foram identificados os isoflavonoides daidzina, glicitina, genistina, malonil-daidzina, malonil-glicitina, malonil-genistina, acetil-daidzina, daidzeína, genisteína, coumestrol e o flavonól rutina. Na análise dos extratos hidrolizados do corpo de *S. frugiperda*, foi possível observar as agliconas genisteína (91%), daidzeína (72%) e gliciteína (9%), enquanto em *C. includens*, foram realizadas análises para a identificação apenas de daidzeína. Essa aglicona foi identificada em apenas 48% dos adultos de *C. includens* analisados, o que representa uma redução de 24% desta, quando comparado com o observado nos extratos de *S. frugiperda*. A possibilidade de identificar em insetos adultos, metabólitos secundários oriundos das plantas hospedeiras utilizadas pelo inseto na fase larval, apresenta-se como uma ferramenta importante para monitoramento da paisagem agrícola, principalmente para as tecnologias que podem gerar pressão de seleção, como no caso de cultivares *Bt*. Dessa forma, diante do percentual de isoflavonoides identificados em extratos do corpo de *S. frugiperda*, sugere-se que genisteína pode ser considerada o indicador mais adequado para a espécie. Para *C. includens*, daidzeína não se mostrou um indicador adequado, considerando que mais da metade dos adultos não a sequestraram. Assim, estudos adicionais são necessários para verificar a assimilação de genisteína e gliciteína nessa espécie.

Palavras-chave: Isoflavonoides. *Glycine max*. Pressão de seleção. Sequestro de metabólitos secundários. Resistência de plantas.

UEDA, Tatiana Emiko. **Secondary metabolites as powerful indicator in the larval stage of *Spodoptera frugiperda* and *Chrysodeixis includens***. 2015. 100p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

This study was carried out to identify secondary metabolites on the extracts of the most sowed soybean genotypes, in Brazil, as well as assess the possibility *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) sequester such compounds. The selected genotypes were V. Max RR, BMX Apollo RR, BMX Potência RR, BRS 284, BRS 360 RR, NA 5909 RR, ANTA 82 RR, TMG 115 RR, M9144 RR, 98Y30, TMG 132 RR and Intacta RR2 PRO DONMARIO 6458. The cultivars were sowed at greenhouse and the leaves were offered to the larvae since hatching. These were maintained in cameras B.O.D. and fed with the same cultivars from hatching to adulthood. After emergence, the adult bodies were stored in Ultrafreezer (- 80 °C) and lyophilized. For identifying and quantifying phenolic compounds in leaves of soybean cultivars were collected, at the V6 stage, and immediately kept in liquid nitrogen, ground, extracted in 90% MeOH, dried under vacuum, resolubilized in 80% MeOH and analyzed by HPLC. For the analysis of secondary metabolites sequestered, wings and legs *S. frugiperda* e *C. includens* were removed and the remainings of the body, ground, extracted, hydrolyzed and analyzed in LC-MS/MS. The isoflavones daidzin, genistin, glycitin, malonyl-daidzin, malonyl-genistin, malonyl-glycitin, acetil-daidzina, daidzein, genistein, coumestrol and the flavonol rutin were identified in soybean genotypes crude extracts. In the analysis of hydrolyzed extracts from *S. frugiperda* body, aglycones genistein (91%), daidzein (72%) and glycitein (9%) were detected. However, from *C. includens* body extracts only, daidzein LC-MS/MS analyses were performed where 48% of the *C. includens* adult samples, the aglycone daidzein was identified, representing a reduction of 24% in relation to extracts of *S. frugiperda*. The ability to identify in adult insect bodies the secondary metabolites from the host plants used by insects in larval stage, represented an important tool for monitoring the succession of crops, especially from technologies able to generate selection pressure as *Bt* crops. Thus, considering the percentage of isoflavones identified in *S. frugiperda* extracts, it is possible to suggest that genistein is the most appropriated feeding indicators. For *C. includens*, daidzein was not an appropriate indicator, considering that more than half of adults do not sequestered the aglycone. Thus, further studies are needed to verify the assimilation of genistein and glycitein by *C. includens*.

Keywords: Isoflavones. *Glycine max*. Selection pressure. Assimilation of secondary metabolites. Plant resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Equipamento HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizado para identificação e quantificação de compostos secundários de extratos vegetais obtidos da folha da soja43
- Figura 2** – Equipamento Liotop L101 utilizado para liofilizar o corpo do inseto.....46
- Figura 3** – Equipamento LC-MS/MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) utilizado para identificação e quantificação das agliconas obtidas do corpo do inseto48
- Figura 4** – Concentração ($\mu\text{g/g}$) do glicosídeo daidzina nos diferentes genótipos de soja Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....50
- Figura 5** – Concentração ($\mu\text{g/g}$) do glicosídeo genistina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....51
- Figura 6** – Concentração ($\mu\text{g/g}$) do glicosídeo glicitina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....51
- Figura 7** – Concentração ($\mu\text{g/g}$) da malonil daidzina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....52
- Figura 8** – Concentração ($\mu\text{g/g}$) da malonil genistina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....53
- Figura 9** – Concentração ($\mu\text{g/g}$) da malonil glicitina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade53
- Figura 10** – Concentração ($\mu\text{g/g}$) da acetil daidzina nos diferentes genótipos de soja com média transformada $\sqrt{x}+1$. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....54
- Figura 11** – Concentração ($\mu\text{g/g}$) da aglicona daidzeína nos diferentes

	genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	55
Figura 12	– Concentração (µg/g) da aglicona genisteína nos diferentes genótipos de soja com média transformada $\sqrt{x+0.5}$. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	56
Figura 13	– Concentração (µg/g) do coumestrol nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	56
Figura 14	– Concentração (µg/g) de rutina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	58
Figura 15	– Concentração (µg/g) total de cada isoflavonoide na sua forma aglicona nos diferentes genótipos de soja.	59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Número de insetos onde houve presença das agliconas genisteína, daidzeína e gliciteína em adultos de *Spodoptera frugiperda* alimentados na fase larval nas diferentes cultivares62
- Tabela 2** – Número de insetos onde houve presença da aglicona daidzeína em adultos de *Chrysodeixis includens* alimentados na fase larval nas diferentes cultivares64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD	Biochemical Oxygen Demand
ESI	Eletro Spray Ionization
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	A CULTURA DA SOJA.....	15
2.1.2	Metabólitos Secundários	19
2.1.3	A Resistência de Plantas Geneticamente Modificadas Usando Bt.....	21
2.2	LAGARTAS DESFOLHADORAS DA SOJA.....	26
2.2.1	<i>Spodoptera Frugiperda</i>	26
2.2.2	<i>Chrysodeixis Includens</i>	29
2.3	ASSIMILAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR INSETOS	31
3	ARTIGO - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COMO INDICADORES DE ALIMENTAÇÃO NA FASE LARVAL DE <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Chrysodeixis includens</i>	38
	RESUMO	38
	ABSTRACT	39
3.1	INTRODUÇÃO	40
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.2.1	Cultivo da Soja	41
3.2.2	Extração dos Isoflavonoides	42
3.2.3	Identificação e Quantificação de Metabólitos de Defesa por HPLC	43
3.2.4	Os Insetos	44
3.2.5	Análise Química dos Compostos Sequestrados pelos Insetos	44
3.2.6	Identificação e Quantificação por LC-MS/MS	47
3.2.7	Análise Estatística	48
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.3.1	Análises Cromatográficas dos Extratos Foliares	49
3.3.2	Análises dos Extratos do Corpo do Inseto	60
3.4	CONCLUSÃO.....	66
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é responsável por grande parte da produção agrícola mundial, com terras aptas para plantio, disponibilidade hídrica, condições climáticas favoráveis, domínio de tecnologias e uma agroindústria avançada, se destacando como líder em produção e produtividade em algumas das principais culturas como soja, milho, trigo, algodão, entre outras. A soja constitui em um dos produtos agrícolas de maior importância para o Brasil, ocupando a segunda posição no *ranking* mundial de produção, perdendo apenas para os EUA (MAPA, 2013). Na safra 2013/2014 foi estimada uma produção de aproximadamente 86 milhões de toneladas, representando um acréscimo de 5,1% quando comparada com a safra anterior (CONAB, 2014).

Durante todo o ciclo, as espécies vegetais estão vulneráveis ao ataque de diversos insetos e patógenos. Na cultura da soja, estimativas de perda são da ordem de 37% da produção, das quais aproximadamente 13% são causadas por insetos (SILVA-FILHO; FALCO, 2000). Assim, os insetos representam um importante fator de redução da produção agrícola e são favorecidos pelo aumento da área de plantio, e outros fatores como falhas na adoção de medidas de controle.

Em áreas de cultivo, onde é comum a sucessão de culturas (milho, soja e algodão), ocorre uma oferta contínua de alimento que favorece as populações de alguns insetos, principalmente, a dos polípagos. Isso tem gerado sérios problemas ao sistema produtivo devido à migração de pragas entre culturas próximas, ou logo a seguir em sistema de plantio direto, observando-se um aumento anual das infestações das pragas (BUSOLI et al., 2011). Associada a essa condição, e a práticas inadequadas de manejo, como a aplicação excessiva de inseticidas e fungicidas, assim como a expansão da área de cultivo, podem favorecer surtos de pragas antes consideradas secundárias (YORINORI, 2002; SANTOS; NEVES; MENEGUIM, 2005; SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012).

As pragas vêm ganhando maior importância devido ao seu ataque constante em culturas, com ocorrência regular e ampla distribuição geográfica. Dentre elas, destaca-se *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) pela ampla gama de plantas hospedeiras (PANIZZI et al., 2012), podendo se alimentar em mais de 80 espécies, incluindo o algodoeiro, milho e soja (POGUE, 2002; CAPINERA, 2008). Como esses sistemas agrícolas são comumente

atacados pela espécie, ocorre oferta contínua de alimento, favorecendo o desenvolvimento e reprodução desses insetos polípagos (SANTOS, 2001).

Anteriormente considerada praga secundária, *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000) nos últimos anos tem representado um dos problemas fitossanitários mais sérios da cultura da soja (MOSCARDI et al., 2012). Conhecida popularmente como “falsa-medideira”, essa lagarta é extremamente polífaga, e pode se desenvolver em 73 espécies de plantas hospedeiras no Brasil, pertencentes a 29 famílias (BERNARDI, 2012). Começou a despertar cuidados nas principais regiões de cultivo a partir da safra 2000/2001 (BUENO et al., 2007), quando surtos populacionais causaram danos expressivos a culturas como soja e algodão, nos principais Estados produtores como Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, entre outros (MOSCARDI et al., 2012). Conseqüentemente, esse aumento populacional acarretou em um incremento no número de aplicações de agrotóxicos (BUENO et al., 2009), ocasionando um grande desequilíbrio no agroecossistema (MOSCARDI et al., 2012).

Dentre as estratégias de controle disponíveis, a utilização de cultivares com resistência a insetos, pode ser considerada um método ideal para redução de populações abaixo do nível de dano econômico, sem necessidade de controle químico (LARA, 1991). Os mecanismos de defesa das plantas envolvem uma série de características morfológicas e também, um complexo de substâncias químicas repelentes ou tóxicas (PIUBELLI et al., 2003a). Tais compostos de defesa são chamados de aleloquímicos, e são definidos como metabólitos secundários, podendo atuar na defesa contra herbívoros, patógenos, entre outros. Na cultura da soja, os compostos secundários mais prováveis são os flavonoides (HOFFMANN-CAMPO, 1995) que, em geral, são mais abundantes nos genótipos resistentes.

Muitos metabólitos secundários são relativamente limitados em sua distribuição entre as espécies vegetais e, devido a sua toxicidade, podem ser sequestrados pelos insetos herbívoros na fase larval (ORTH; HEAD; MIEROW, 2007), permanecendo em diferentes células do seu organismo até a fase adulta. Desde o século XIX, já foi observado que lepidópteros sequestram substâncias químicas responsáveis pela defesa das plantas. Um exemplo clássico de utilização dessa proteção química, é a borboleta monarca, *Danaus plexippus* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Danaidae), cuja larva sequestra cardenólídeos de sua planta

hospedeira (*Asclepias syriaca*) e as transfere para os adultos, tornando-as imalatáveis para pássaros (BROWER; EDMUNDS; MOFFITT, 1975).

A utilização de plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes a lagartas têm sido uma das técnicas de controle utilizada em diversos agroecossistemas em sucessão. Dessa forma, monitorar a evolução da resistência nas populações de insetos pragas alvo da tecnologia é de extrema importância para o seu manejo, devido à pressão de seleção exercida pela expressão contínua das proteínas nas plantas *Bt*. Considerando que tanto *S. frugiperda* quanto *C. includens* são insetos polípagos, a possibilidade de identificar nos adultos, quais foram as plantas consumidas durante a fase larval pode ser uma estratégia importante no monitoramento de insetos resistentes à proteína *Bt*, fornecendo informações da contribuição de cada hospedeiro na formação das populações, a fim de se evitar que essa resistência se propague para outras populações.

O presente trabalho teve por objetivo identificar os metabólitos secundários produzidos nas cultivares de soja mais plantadas no país e, analisar os compostos extraídos dos tecidos do corpo dos insetos, visando determinar uma substância sequestrada por *S. frugiperda* e *C. includens* que possa ser utilizada como marcador bioquímico de alimentação. Essa informação e a de outros estudos que deverão ser realizados com outras culturas do sistema de produção, fornecerão pistas das plantas consumidas pelos insetos praga coletados em campo, conseqüentemente, possibilitando o monitoramento da paisagem agrícola.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA SOJA

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é uma leguminosa da família Fabaceae, originária da China onde é conhecida desde aproximadamente 2000 a.C, sendo um grão de grande importância para a alimentação na Ásia, especialmente na China, Japão e Coréia. Estabeleceu-se no Brasil no início do século XX, e a partir das décadas de 1960/1970 é que foi observado um maior impulso, devido ao estabelecimento no Sul do país como uma planta de grande importância econômica. Desde então, transformou-se na cultura de maior interesse econômico em diversas

regiões produtoras do Brasil, como Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país (MISSÃO, 2006).

Na atualizadade, a soja é o principal produto de exportação brasileiro. E, segundo Vilela e Moreira (2007), é um dos produtos agrícolas mais comercializados em todo o mundo. Na safra 2013/2014 atingiu uma área de cultivo de 30 milhões de hectares, representando um aumento de 8,7%, ou seja, 2,4 milhões de hectares a mais em relação à safra 2012/2013. Na safra 2014/2015 que está em andamento, estima-se que a produção nacional será de aproximadamente 86 milhões de toneladas, com ganho de 5,1% em relação à safra anterior (CONAB, 2014). Além de ser uma “commodity” mundial, a importância econômica também esta associada à produção de uma diversidade de subprodutos, para os mais variados fins, constituindo em um dos principais ingredientes na alimentação de gado, suínos e aves domésticas (ZAMBOM et al., 2001). O complexo soja, é formado por soja em grãos, óleo de soja bruto, óleo de soja refinado, farelo de soja e demais óleos e derivados. E devido a persceptiva de ampliação, produção e utilização do biodiesel no Brasil, pesquisas vêm sendo realizadas com essa cultura para o uso na fabricação de biocombustível (COSTA NETO et al., 2000; FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005).

Assim como outras monoculturas, a soja apresenta severas perdas na produtividade em função de diferentes fatores abióticos (temperatura, CO₂, estresse hídrico, etc) e bióticos (insetos, fungos, nematoides). Dentre os fatores bióticos que podem afetar o desenvolvimento das plantas, o ataque de insetos merece grande atenção em função do número de espécies que atacam a cultura e que podem comprometer a sua produtividade. Existem cerca de 70 espécies de insetos e ácaros que podem ocorrer na soja (MOSCARDI et al., 2012) causando grandes prejuízos econômicos. Essas pragas podem ocasionar danos desde a germinação das sementes e emergência das plantas, até a fase de maturação fisiológica (HOFFMANN-CAMPO et al., 2012; ÁVILA; GRIGOLLI, 2014).

Os insetos sugadores e desfolhadores são considerados os principais grupos de pragas da cultura da soja (DEGRANDE; VIVAN, 2007). Dentre os insetos sugadores, podemos destacar os percevejos da ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, pertencentes as espécies *Euschistus heros* (Fabricius, 1798), *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) e *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758), que podem ocorrer na fase reprodutiva da soja, reduzindo a qualidade e

produtividade dos grãos. Como atacam diretamente o produto final, ou seja, grãos ou sementes, são considerados o principal problema entomológico da cultura (PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012). Perdas significativas no rendimento, são devido à redução do peso dos grãos, abortamento dos legumes, perdas na qualidade e no potencial germinativo da soja (GAZZONI, 1998; CORRÊA-FERREIRA; AZEVEDO, 2002; PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012). Outras espécies de percevejos considerados menos comuns como *Dichelops furcatus* (Fabricius, 1775), *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851), *Edessa meditabunda* (Fabricius, 1794), *Chinavia* spp. e *Thyanta perditor* (Fabricius, 1794) e o alidídeo, *Neomegalotomus parvus* (Westwood, 1842), também podem atacar a cultura da soja (MOSCARDI et al., 2012), sendo os aumentos populacionais, determinados por alterações climáticas ou outros fatores, como os sistemas de produção específicos de cada região (PANIZZI, 1997).

Além dos percevejos, há ainda um complexo de lepidópteros de grande importância econômica para a cultura que também podem danificar os grãos e reduzir a produtividade da cultura (PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012). Dentre esses insetos, estão principalmente as lagartas-das-vagens, *Spodoptera* spp. e a lagarta *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) (Lepidoptera: Noctuidae) que além das vagens, podem também atacar folhas e outras partes das plantas (PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012).

Lagartas do gênero *Spodoptera* apresentam distribuição principalmente tropical e subtropical, mas algumas espécies podem ainda, ocorrer em regiões temperadas. Na região neotropical o gênero é representado por 16 espécies. Pelo menos metade dessas espécies são pragas agrícolas, apresentando alto grau de polifagia, alimentando-se de diversas culturas de interesse econômico como cereais, pastagens (POGUE, 2002), hortaliças (SILVA et al., 1968), eucalipto (SANTOS; COSENZA; ALBINO, 1980), entre outras. *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae) pode apresentar alta densidade populacional com níveis de desfolha ultrapassando os níveis de controle, ou seja, 30% na fase vegetativa e 15% na fase reprodutiva da cultura da soja, tornando-se uma das pragas agrícolas mais importantes nas regiões do cerrado e várzeas (FRAGOSO; SILVA, 2007). Essa praga, além de folhas, também ataca vagens da soja, tornando-se juntamente com a lagarta *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1898) (Lepidoptera: Noctuidae), pragas de importância a partir do início da fase reprodutiva da cultura (GAZZONI; YORINORI, 1995; PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012). Outras espécies

como *S. frugiperda* têm se destacado economicamente em soja (VIVAN, 2010). Esse inseto polígrafo, se destaca por se alimentar em mais de 80 espécies de plantas (POGUE, 2002; CAPINERA, 2008), incluindo arroz (PEREIRA; CALAFIORI, 1989; BOTTON et al., 1998), amendoim (ISIDRO; ALMEIDA; PEREIRA, 1997), sorgo (CORTEZ; WAQUIL, 1997) e trigo (TAKAHASHI; NAKANO; ORSI, 1980), além de algodão, milho e soja (POGUE, 2002; CAPINERA, 2008). Essas três últimas culturas têm sido muito utilizadas em sucessão, principalmente, na região Centro-Oeste brasileira onde é praticada em grandes áreas fornecendo à lagarta uma contínua oferta de alimento (SANTOS et al., 2009). Assim, essa espécie tem potencial de se tornar uma praga ainda mais importante no sistema de cultura que incluem soja em função da intensa exposição da cultura à pressão populacional do inseto (SÁ et al., 2009).

Dentre os insetos desfolhadores, podemos destacar também a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Eribidae), devido a sua alta capacidade de desfolhamento e ampla distribuição geográfica (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000), ocorrendo desde os Estados Unidos até a Argentina (TURNIPSSSED; KOGAN, 1976). Cada lagarta, para completar seu desenvolvimento, consome, aproximadamente, 110 cm² de folhas (WALKER et al., 2000). Dependendo do nível de desfolha e do estágio fenológico da planta, altas infestações dessa praga podem comprometer o rendimento da soja (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005). É um importante inseto desfolhador, no entanto, por atacar preferencialmente as folhas do terço superior da cultura, e a disponibilidade de vários inseticidas e outras táticas de controle, atualmente não tem sido mais considerada a principal lagarta da soja. Por outro lado, diversos desfolhadores da ordem Lepidoptera tem aumentado a sua importância nessa cultura.

A lagarta-falsa-medideira, *C. includens* é abundante na cultura da soja, e por muito tempo foi considerada praga secundária dessa cultura (MOSCARDI et al., 2012). Entretanto, a ocorrência de surtos dessa praga têm sido frequentes em todas as regiões produtoras do país. Além disso, mais de 70% das lagartas de Plusiinae têm ocorrido no terço médio, inferior das plantas e na face abaxial de suas folhas, estando menos exposto aos inseticidas, dificultando o seu controle (WISCH, 2011). Em algumas regiões, *C. includens* vem superando as populações de *A. gemmatilis* (WISCH, 2011), que era considerada o principal inseto desfolhador da soja até o início da década de 2000 (GALLO et al., 2002).

O uso de inseticidas químicos é a tática mais utilizada para o controle de artrópodes pragas quando a densidade populacional se aproxima do nível de dano econômico, principalmente devido à sua rápida ação (PAPA, 2002). No entanto, o seu uso indiscriminado é ecologicamente nocivo, podendo ter como consequência o desenvolvimento da resistência dos insetos a diversos produtos químicos, aumento da população de pragas secundárias, efeitos adversos em organismos benéficos, resíduos indesejáveis em alimentos, danos aos aplicadores dos produtos (PIUBELLI et al., 2005), além de aumentar os custos de produção. Com a finalidade de reduzir o uso de produtos químicos, técnicas alternativas vêm sendo utilizadas. Dentre essas estratégias de controle disponíveis, a utilização de plantas resistentes, transgênicas ou não, é considerada uma das bases do manejo integrado de pragas.

2.1.2 Metabólitos Secundários

Em condições naturais, as plantas estão expostas a inúmeros inimigos que podem afetar seu desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 2010). Entretanto, essas apresentam mecanismos de defesa, representados por uma série de características morfológicas e também, um complexo de substâncias químicas repelentes ou tóxicas, que podem torná-las impróprias para os insetos praga (PIUBELLI et al., 2003a). Tais substâncias de defesa são chamadas de aleloquímicos e são definidos como metabólitos secundários, ou seja, substâncias não nutritivas, produzidas por uma espécie, e que afetam a sobrevivência, crescimento, comportamento, fecundidade ou fertilidade de indivíduos de outra espécie (KOGAN, 1986). Em geral, a sua distribuição é restrita a algumas plantas, e alguns metabólitos secundários são encontrados apenas em algumas ou em uma única espécie vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Algumas dessas substâncias podem ser constitutivas, expressas constantemente, sendo característico de cada genótipo sem depender da presença de nenhum fator elicitador (STOUT, 2013). No entanto, os processos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem nas plantas podem sofrer alterações após injúria mecânica, herbivoria, infecção por patógenos e radiação ultravioleta (BALDWIN; SCHULTZ, 1983; LIN; KOGAN, 1990; CONCOMI et al., 1996), que resultam em mudanças na qualidade dos tecidos vegetais que servem de alimento para fitófagos (COLEMAN;

JONES, 1991). Denominada resistência induzida, esta pode ter suas rotas metabólicas alteradas por algum desses estresses bióticos e/ou abióticos, sendo manifestada na planta como uma resposta em função à injúrias (STOUT, 2013). Assim, a expressão da resistência deve ser o resultado conjunto da complexa ação de enzimas oxidativas e dos compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas (STOUT; WORKMAN; DUFFEY, 1994). Presume-se que as diferenças nas respostas induzidas pelos tipos de injúria são devido aos distintos sinais gerados no local do dano, e podem ser desencadeados por fragmentos da parede celular da planta (RYAN et al., 1985), fatores da saliva dos insetos (LIN; KOGAN; FISCHER, 1990; STOUT; WORKMAN; DUFFEY, 1994), ou microrganismos associados ao seu aparelho bucal (GRISHAM et al., 1987).

Os compostos secundários pertencem a diferentes grupos químicos como flavonoides, alcaloides, acetogeninas, glicosídeos, isoprenoides e lignina (HOFFMANN-CAMPO, 1995). Vários desses metabólitos secundários estão envolvidos na interação inseto-planta e são estudados devido aos efeitos negativos que podem desempenhar nos insetos praga. Na cultura da soja, os componentes de defesa mais prováveis são os flavonoides (HOFFMANN-CAMPO, 1995), que em geral são mais abundantes nos genótipos resistentes, e podem desempenhar as mais variadas funções como proteção à radiação ultravioleta, insetos, doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, atraentes para a polinização (pétalas coloridas), dispersantes de sementes (frutas vermelhas), controladores de hormônios, estimulantes à produção de nódulos pelos rizóbios, inibidores enzimáticos, antioxidantes e agentes alelopáticos (MARKHAM, 1989). Podem ser divididos em flavonas, flavonois, antocianina, isoflavona, flavanonas, diidroflavonois, biflavonoides (MARKHAM, 1982).

As isoflavonas são compostos fenólicos, pertencentes a uma classe distinta de flavonoides, com importantes propriedades biológicas, como atividades estrogênicas, antifúngicas e bactericidas das fitoalexinas (WILLIAMS; HARBORNE, 1989). Exercem diversas funções na interação entre as plantas e o ambiente, onde atuam como indutores de genes de nodulação durante simbiose entre leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium* (FERGUSON; MATHESIUS, 2003). Podem atuar também como moléculas precursoras para a produção de fitoalexinas durante as interações planta-patógeno ou planta-inseto (AOKI; AKASHI; AYABE, 2000; DIXON; FERREIRA, 2002), ou ainda inibir o crescimento de plantas invasoras (PEDERSEN;

KUDSK; FOMSGAARD, 2015).

De maneira geral, os isoflavonoides glicosídicos mais encontrados na soja, compreendem os compostos genistina, glicitina e daidzina, bem como suas correspondentes agliconas genisteína, gliciteína e daidzeína (MACLEOD; AMES, 1988). Outros compostos derivados destes glicosídeos são as formas acetil e malonil (OHTA et al., 1979; KUDOU et al., 1991a). O efeito destes compostos fenólicos depende de sua concentração, que podem ter função atrativa, deterrente, repelente, ou tóxica às pragas que atacam a cultura da soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001).

2.1.3 A Resistência de Plantas Geneticamente Modificadas Usando Bt

Estima-se que a área destinada ao plantio de culturas biotecnológicas em todo o mundo alcançou 170 milhões de hectares em 2012 (JAMES, 2012). Em muitos sistemas de produção, plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos têm sido utilizadas como tática para o manejo de populações de lagartas desfolhadoras. Como essa prática tem se mostrado eficiente no controle de pragas, vem sendo empregada em escala significativa na agricultura (BERNARDI et al., 2011). Atualmente, a disponibilidade de culturas transgênicas expressando diferentes toxinas do *Bt*, as proteínas Cry ou proteínas inseticidas da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (1911), têm sido utilizadas para reduzir populações de lagartas desde os seus primeiros instares. São altamente específicas em sua atividade contra lepidópteros (VAECK et al., 1987), devido às ligações das toxinas ocorrerem em locais específicos, ocasionando o rompimento das membranas intestinais do inseto (SCHNEPF et al., 1998), levando-os à morte. Essas técnicas também são empregadas para aumentar a rentabilidade agrícola (HUTCHISON et al., 2010), manter a conservação dos inimigos naturais, além de reduzir a poluição ambiental (GOULD, 1998). A utilização de milho transgênico (*Bt*), pode reduzir perdas causadas por vários lepidópteros pragas, equivalentes a aproximadamente 500 milhões de dólares anuais (WAQUIL; VILELLA; FOSTER, 2010). E, como os genes são introduzidos nos genomas dos vegetais, a expressão das proteínas ocorre em todos os tecidos da planta, atingindo apenas os insetos que se alimentam desses tecidos (MAAGD et al., 1999).

No Brasil, a soja *Bt* possui apenas a proteína Cry1Ac

(ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS, 2015). E os principais alvos dessa tecnologia são as lagartas *H. virescens*, *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) e *C. includens* (STEWART et al., 1996) que são pragas amplamente distribuídas em lavouras de soja no país, o que aumenta a possibilidade de desenvolvimento de resistência. Já o milho *Bt* contém a proteína Cry1Ab, direcionado para o controle de lepidópteros como *S. frugiperda* (WAQUIL; VILELLA; FOSTER, 2010), *H. zea* e *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) (MICHELOTTO et al., 2011). Há relatos também da atividade dessas toxinas sobre a lagarta *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1852) (Lepidoptera: Pyralidae) (MENDES; WAQUIL; VIANA, 2009). Em algodão, cultivares como a Bollgard®, contém as toxinas Cry1Ac e Cry2Ab2 produzidas pelo *B. thuringiensis*. Segundo Head et al. (2010) essa cultivar foi desenvolvida tendo em vista o controle de pragas como *H. zea*, *H. virescens* e *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1843) (Lepidoptera: Gelechiidae). O controle para *H. virescens* é praticamente completo, mas para *H. zea* é apenas parcial, devido à elevada tolerância desta espécie para a maioria das proteínas *Bt* (GOULD et al., 1998).

A expansão das áreas de cultivo de algodão e milho, que possuem algumas pragas em comum com a soja, pode ter influência no manejo da resistência ao nível de macrorregiões. E com a adoção do milho-*Bt*, algodão-*Bt* e soja-*Bt*, expressando toxinas de *B. thuringiensis*, trouxe preocupação em relação ao surgimento de ocorrências de resistência, pela exposição direta das populações de insetos fitófagos às mesmas toxinas em áreas grandes e contínuas (SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012). Esse procedimento, exerce elevada pressão de seleção sobre as populações das pragas alvo (BERNARDI et al., 2011) que pode comprometer a sua eficácia (HEAD et al., 2010).

A resistência é uma característica genética do inseto em tolerar doses que são letais para maior parte dos indivíduos que formam uma população da praga, podendo os insetos resistentes, estarem presentes no ambiente antes mesmo da tecnologia ser utilizada (MONSANTO, 2015). Assim, o manejo da resistência de insetos é o conjunto de medidas que visam prevenir ou retardar a seleção dos indivíduos resistentes para garantir a sustentabilidade da tecnologia (MACHADO; FIÚZA, 2010). Alguns fatores que podem influenciar a evolução da resistência incluem, a herança da resistência, a frequência inicial de alelos de resistência, características de história de vida, comportamento, interações

multitróficas, práticas de gestão de pragas, dinâmica populacional, e os custos de aptidão (BOTTRELL; BARBOSA; GOULD, 1998; CARRIÈRE; SISTERTON; TABASHNIK, 2004). Gassmann et al. (2009) verificaram que custos adaptativos associados com a resistência dos insetos, ocorrem em ambientes com ausência das toxinas *Bt*, através de efeitos pleiotrópicos que reduzem a aptidão de indivíduos portadores de alelos de resistência em relação aos indivíduos suscetíveis que não dispõem desses alelos. Em análises realizadas por esses autores com a lagarta *P. gossypiella*, foram identificados três alelos mutantes (R1, R2, R3), que estão relacionados à resistência à toxina *Bt* (Cry1Ac). Esses genes mutantes, codificam proteínas que se ligam à toxina Cry1Ac em larvas suscetíveis, sendo essas proteínas denominadas de caderinas, e representam uma família de glicoproteínas presentes nos insetos responsáveis pelo contato intercelular. Possuem papel de ligação com a toxina, podendo afetar a morfologia das microvilosidades da superfície apical das células do intestino médio, através de processos de aumento da adesão celular e da diferenciação celular (GASSMANN et al., 2009). Se as mutações que conferem resistência à caderina interferirem com a integridade estrutural ou funcional do intestino médio, tais mutações podem provocar custos adaptativos aos insetos, devido ao aumento da absorção e concentração de produtos químicos de defesa das plantas em seu organismo (GASSMANN et al., 2009). No entanto, nos insetos resistentes, o resultado dessa ligação foi que as enzimas do próprio inseto agiram sobre a toxina, inativando-a.

Uma das alternativas para aumentar o tempo de eficiência de controle e retardar o surgimento de resistência das lagartas à proteína, é a utilização de plantas transgênicas que contenham diversos genes *Bt*. Essa estratégia é promissora devido à expressão de múltiplos genes e, quando não há resistência cruzada, ou seja, resistência de um único mecanismo para dois ou mais compostos tóxicos (GUEDES; LIMA; CRUZ, 1995; RIBEIRO et al., 2003; BERTICAT et al., 2008), a taxa de evolução da resistência do inseto é reduzida, principalmente pela baixa frequência inicial dos insetos resistentes às múltiplas toxinas (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Estudos realizados com *H. zea* alimentadas com proteínas Cry, demonstraram que a resistência cruzada poderia ser esperada entre Cry1Ab e Cry1Ac, mas não para as toxinas Cry2A devido às diferenças nas sequências de aminoácidos e seu modo de ação. A inexistência de resistência cruzada de *H. virescens*, *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) e *P.*

gossypiella às proteínas Cry2 e Cry1Ac, sugerem que esses dois genes podem ser viáveis para o manejo da resistência de Cry1Ac (ANILKUMAR et al., 2008). No entanto, dada a ligação de resistência de *H. zea* aos Cry1Ab e Cry1Ac, a seleção de indivíduos resistentes à Cry1Ac no cinturão de algodão dos EUA pode ocorrer por qualquer seleção direta em algodão, ou de seleção indireta em milho, a partir da utilização de produtos contendo Cry1Ab. Esse inseto, por ser uma praga polífaga, é capaz de se desenvolver em ambas as culturas, no entanto, devido à preferência por milho (JACKSON et al., 2008), a pressão de seleção de Cry1 deve ser maior a partir de milho do que de algodão.

Uma segunda alternativa recomendada para que não haja o desenvolvimento da resistência do inseto aos materiais transgênicos *Bt*, é a utilização do plantio de hospedeiros que não produzem as toxinas *Bt*, mais conhecidas como áreas de refúgio (TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIÈRE, 2009). A preparação dessas áreas contendo plantas não transgênicas visa continuar a manutenção de indivíduos suscetíveis à toxina, através do acasalamento de possíveis indivíduos resistentes provenientes de áreas com plantas *Bt*, formando a progênie em heterozigose (GOULD, 1998; BRAVO; SOBERÓN, 2008) e, assim, retardando a evolução da resistência à proteína Cry1Ac (HEAD et al., 2010) através da seleção contra alelos de resistência (GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009). O refúgio é indispensável para reduzir o desenvolvimento de resistência por parte dos insetos (TABASHNIK et al., 2003), monitorando a suscetibilidade das pragas alvo. Em áreas onde há cultivo de soja com adoção da tecnologia *Bt*, recomenda-se que seja utilizado pelo menos 20% de refúgios estruturados com materiais convencionais (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013). Já em algodão, foi hipotetizado que áreas de refúgios de outras culturas não transgênicas como milho e soja, estão contribuindo significativamente com a ocorrência de populações de indivíduos suscetíveis ao *Bt* (GOULD et al., 2002). Tal contribuição ocorreu por conta da migração de insetos suscetíveis destas outras culturas, excedendo as áreas de refúgio de algodão estruturados.

Em milho-*Bt*, a não implantação das áreas de refúgio adequada, tem resultado na seleção de insetos resistentes a sua toxina ocasionando prejuízos aos agricultores (MESQUITA, 2013). A presença da mesma toxina em soja-*Bt* e no algodão-*Bt* contribui para o aumento da pressão de seleção das populações de noctuídeos, aumentando as possibilidades de aparecimento de insetos resistentes.

Além da exposição à toxina, a rapidez com que essas populações possam ser selecionadas depende de fatores, como herança da resistência (ROUSH; McKENZIE, 1987) e fluxo gênico (MACHADO; FIÚZA, 2010). Com isso, torna-se importante se conhecer a dinâmica da populacional dos insetos de uma cultura para as outras. A alta capacidade de voo dos adultos de lepidópteros, torna possível a exploração dos mais diferentes hospedeiros, e dessa forma a indicação da origem do indivíduo fornece informações relevantes para o manejo da resistência.

Alguns insetos são capazes de sequestrar, ou seja, não detoxificar (assimilar) os metabólitos secundários de defesa oriundos das plantas hospedeiras (KUBO; HANKE, 1986). Em geral, esses compostos são específicos de cada família ou mesmo gênero de plantas e, assim, a sua identificação é uma das estratégias para se determinar nos adultos as plantas hospedeiras consumidas pelo inseto durante a fase larval. Gould et al. (2002) analisando isótopos de carbono de plantas, verificaram que asas da mariposa da espécie *H. zea* que se alimentaram na fase larval de plantas com fisiologia C3, como algodão, amendoim, soja, tiveram proporções de isótopos ^{13}C para ^{12}C que diferiam de mariposas que se desenvolveram em plantas com fisiologia C4. Com essa observação, foi possível verificar que em geral, o aumento das populações de lagartas em todas as regiões e épocas ocorre a partir de culturas como o milho e sorgo (C4). Essas informações são consistentes devido a observações realizadas na China com *H. armigera* (WU; GUO; GAO, 2002) onde o milho e outras culturas C4 predominam como plantas hospedeiras, quando comparadas com a cultura do algodão (JACKSON et al., 2008). Com isso, as populações de lagartas são muito mais influenciadas por práticas em culturas C4 do que na cultura do algodão (HEAD et al., 2010). A homogeneidade sazonal das plantas C4 também indica que o movimento dos insetos é substancial, trazendo benefícios de manejo da resistência através do acasalamento de indivíduos *Bt* selecionados de algodão com indivíduos não resistentes de culturas C4 (HEAD et al., 2010). Tais resultados corroboram para concluir que, análises de isótopos estáveis de carbono podem indicar quais plantas não foram utilizadas como fonte de alimento na fase larval. No entanto, a técnica não é eficiente para distinguir entre as espécies de plantas que utilizam a mesma via fotossintética. Com isso, para se estabelecer um marcador bioquímico de alimentação, técnicas mais específicas para determinação do hospedeiro na fase larval do inseto precisam ser analisadas e utilizadas.

Considerando-se que as espécies estudadas (*S. frugiperda* e *C. includens*) são insetos polípagos que apresentam elevada capacidade reprodutiva em diferentes hospedeiros, a presença de recursos alimentares durante o período da entressafra de culturas como a soja, o milho e o algodão, desempenham um papel importante na dinâmica populacional e surtos de herbívoros polípagos (NAGOSHI, 2009). Assim, a gestão de pragas polípagas compreende e inclui o estudo de plantas cultivadas e não cultivadas que podem servir como reservatórios de pragas (BARROS et al., 2010). Apesar da preferência por plantas da família Poaceae (gramíneas), como milho, arroz, trigo, entre outras (CRUZ, 1995; BUSATO et al., 2002), *S. frugiperda* é considerada cada vez mais, praga de cultivos importantes, como algodão e soja no Cerrado brasileiro, especialmente quando eles são cultivados após o milho. Como resultado, pode explorar uma diversidade de hospedeiros para construir populações fora dos campos de cultivo e migrar em números elevados em grandes áreas de cultivo (NAGOSHI et al., 2008).

2.2 LAGARTAS DESFOLHADORAS DA SOJA

2.2.1 *Spodoptera Frugiperda*

As espécies do gênero *Spodoptera* são amplamente distribuídas no mundo e das 30 espécies descritas, a maioria é considerada praga de várias culturas de grande importância econômica (POGUE, 2002). *S. frugiperda* é conhecida popularmente como “lagarta-do-cartucho”, e preocupa os agricultores pela dificuldade de controle em culturas como milho, trigo, sorgo, algodão, feijão, cana-de-açúcar, amendoim, batata (LABRADOR, 1967; CRUZ; TURPIN, 1982; CRUZ; FIGUEIREDO; MATOSO, 1999), além de utilizar hospedeiros alternativos para se manter nos agroecossistemas.

Ocorre em todas as regiões algodoeiras do Brasil (SOARES; VIEIRA, 1998) e seu aumento populacional nesta cultura envolve fatores como o cultivo intensivo do solo praticado, com sucessão de ciclos de culturas durante todo o ano, condições climáticas favoráveis (alta temperatura e baixa umidade relativa do ar), uso excessivo e inadequado de inseticidas, especialmente os piretróides, e, principalmente, o plantio de gramíneas como milho, sorgo e milheto em sucessão à cultura do algodão. Essas gramíneas têm se mostrado espécies hospedeiras

adequadas ao seu desenvolvimento, favorecendo a ocorrência de surtos populacionais no algodoeiro, ao promover a manutenção do ciclo reprodutivo da praga (LUTTREL; MINK, 1999). Em soja, a sua ocorrência também tem aumentado nos últimos anos, causando reduções significativas na produtividade (BUENO; CORRÊA-FERREIRA; BUENO, 2010), em função dessa cultura ocorrer em áreas próximas às de algodão.

No hemisfério Norte, principalmente nos Estados Unidos, *S. frugiperda* é reconhecida como uma praga migratória (HARDING, 1976), cujos adultos apresentam elevada capacidade de dispersão e disseminação rápida ao longo da faixa de distribuição de suas plantas hospedeiras (SPARKS, 1979). É uma espécie polífaga que se destaca por se alimentar em mais de 80 espécies de plantas hospedeiras, incluindo o milho, a soja e o algodoeiro (CAPINERA, 2005). No Brasil, é considerada a principal praga da cultura do milho (PRAÇA; SILVA NETO; MONNERAT, 2006), capaz de danificá-la desde a fase vegetativa até a reprodutiva ocasionando perdas que podem variar de 15% a 37% (CARVALHO, 1970; CRUZ; TURPIN, 1983). A espécie tem causado também, sérios danos a culturas como o arroz, alfafa, amendoim, abóbora, batata, couve, espinafre, feijão, repolho, sorgo, trigo e tomate (CRUZ; MONTEIRO, 2004). No entanto, sua condição de praga geralmente é associada aos estágios específicos do desenvolvimento da planta hospedeira. No caso do milho, *S. frugiperda* coloniza inicialmente plantas durante a fase vegetativa espiral. Nesse período, as larvas são protegidas ao se alimentarem de folhas jovens que formam a espiral da folha (BARROS et al., 2010). Em algodão, lagartas recém-eclodidas iniciam sua alimentação na superfície inferior da folha de algodão (ALI; LUTTRELL; PITRE, 1990), posteriormente, se alimentam de botões florais, principalmente de maçãs em formação (VELOSO; NAKANO, 1983). Sendo assim, a planta de algodão torna-se um acolhimento favorável, devido à abundância de estruturas de floração e, apesar de ocorrer em baixas densidades em campos de algodão, *S. frugiperda* é uma praga muito destrutiva na cultura por se alimentar diretamente das estruturas reprodutivas (ALI; LUTTRELL; PITRE, 1990). Barros et al. (2010) observaram que, em soja, as lagartas quando em gaiolas, primeiramente se alimentam de folhas, mas também podem consumir vagens na fase inicial de formação.

O desenvolvimento de *S. frugiperda* é do tipo holometábolo, ou seja, possui metamorfose completa, passando pela fase de ovo, lagarta, pré-pupa, pupa e

adulto (GARCIA, 2002). Os ovos geralmente acinzentados são ovipositados em massa, tanto na face inferior quanto na face superior da folha, dando origem a lagartas muito pequenas que irão passar por seis a sete instares até completar o seu desenvolvimento (CRUZ et al., 2008). Segundo os autores, na fase de larva, pode atingir 50 mm de comprimento, apresentando uma coloração que varia de pardo escuro, verde até quase preta, possuindo três linhas longitudinais de coloração branco amarelada na parte dorsal do corpo, e uma linha escura mais larga e, abaixo dessa, uma listra irregular amarela marcada com vermelho. Uma característica dessa espécie é a cabeça de coloração escura com suturas que se cruzam e formam um “y” invertido (CRUZ et al., 2008). Após completar o período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas de coloração inicialmente verde-clara, tornando-se progressivamente mais escura, até ficar totalmente preta, próximo à emergência do adulto (CRUZ, 1995). Essas pupas dão origem às mariposas que medem aproximadamente 35 mm de envergadura e apresentam asas anteriores de coloração parda-escura e posteriores, branca acinzentada (GALLO et al., 1988).

O manejo de *S. frugiperda* tem sido dificultado por uma série de fatores. Dentre eles, um dos mais importantes tem sido a grande oferta de plantas hospedeiras durante todo o ano, pela sucessão de culturas e o plantio em áreas próximas de diferentes culturas com fenologias distintas. Como exemplo, soja, milho e algodão que são cultivados no verão e o milheto na entressafra, facilitam o movimento da praga entre as culturas (NAGOSHI, 2009). Isto é, a praga possui fontes alimentares abundantes e variadas em diferentes fases de desenvolvimento. Sendo assim, essa pode ser a causa da ocorrência mais frequente da praga em culturas onde anteriormente era considerada praga secundária, como o algodão, milheto, milho e soja, levando-se em conta a importância destas culturas no sistemas de produção agrícola no Brasil (BARROS et al., 2010). Essa intensa exposição às plantas pode estar favorecendo o fluxo de pragas entre os cultivos e selecionando novas preferências alimentares dos insetos (SANTOS et al., 2004; SÁ et al., 2009). Já que o comportamento de uma determinada espécie pode variar conforme o alimento disponível e o ambiente em que se encontra (PANIZZI; PARRA, 1991), sendo frequentes as adaptações co-evolutivas entre insetos e plantas, configurando-se numa estratégia de perpetuação das espécies (HAGEN, 1976).

Em função das características do ataque e da severidade das infestações de *S. frugiperda* em diferentes culturas, o seu controle é realizado praticamente com a utilização de inseticidas químicos. Assim, as diferentes populações da praga têm sofrido constantes pressões de seleção por inseticidas de diversas classes nos diferentes sistemas agrícolas, contribuindo para o estabelecimento de populações resistentes a diversas classes de inseticidas (YU, 1991; 1992; 2006; DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001). Grande parte da literatura científica disponível classifica os exemplares de *S. frugiperda* que ocorrem nas culturas do milho e do algodão como pertencentes a uma mesma raça (MARTINELLI; OMOTO, 2006). Para estudar a similaridade molecular de *S. frugiperda*, esses autores coletaram populações da espécie em diferentes localidades do Brasil, nas duas culturas, e não identificaram nenhum agrupamento capaz de separar ou associar as populações a nenhuma das plantas hospedeiras avaliadas, sugerindo a existência de um nível significativo de fluxo gênico entre as populações. Esses dados ressaltam a importância de se conhecer o desempenho desse inseto e de outros do sistema nas diversas plantas hospedeiras, o que pode ser uma importante ferramenta para o seu manejo (BARROS et al., 2010).

2.2.2 *Chrysodeixis Includens*

As lagartas do complexo Plusiinae são comumente denominadas “falsa-medideira” pelo fato de apresentarem apenas dois pares de falsas pernas abdominais e se deslocarem como se estivessem medindo palmos (SOSA-GÓMEZ et al., 2010). Na soja eram consideradas pragas secundárias até meados de 1990, representando não mais que 10% da incidência de *A. gemmatilis* (CORRÊA et al., 1977; MORAES; LOECK; BELARMINO, 1991; MOSCARDI, 1993) e raramente exigiam medidas de controles específicos. No entanto, desde a safra de 2000/2001 e 2001/2002, devido a alterações no sistema produtivo de soja, *C. includens* passou a ser considerada praga chave em várias regiões brasileiras (BUENO et al., 2007).

Um marco na sojicultura brasileira foi o surgimento da ferrugem asiática da soja causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow) (MOSCARDI et al., 2012). *C. includens*, até então era controlada naturalmente por epizootias de *Nomuraea rileyi* (Farlow) (doença branca) e de outros fungos entomopatogênicos, como *Pandora* sp. e *Zoophthora* sp. (causador da doença-marrom) (SOSA-GÓMEZ,

2015). Com os excessos de aplicações de fungicidas para controle, principalmente da ferrugem asiática (SOSA-GÓMEZ, 2015), observou-se uma redução importante dessas doenças fúngicas, influenciando diretamente na intensidade de ataque da praga.

C. includens é um inseto polífago com capacidade de desenvolvimento em 73 espécies de plantas, pertencentes a 29 famílias (BERNARDI, 2012). Dentre elas, feijão, fumo, girassol, alface, tomate, couve-flor, e outras culturas de grande importância econômica como algodão e soja (HENSLEY; NEWSOM; CHAPIN, 1964; HERZOG; TODD, 1980). A polifagia pode colaborar com a dinâmica populacional e a condição de praga, considerando-se que as suas populações podem se desenvolver em diferentes plantas hospedeiras em uma região ou ainda, permanecer no local em baixa densidade até a fêmea adulta encontrar um hospedeiro capaz de sustentar o desenvolvimento das lagartas (MOSCARDI et al., 2012). Georghiou e Taylor (1986) sugerem ainda, que a polifagia pode retardar a evolução da resistência a inseticidas, devido à imigração de indivíduos suscetíveis provenientes de áreas ocupadas com o cultivo de outras culturas não tratadas com defensivos agrícolas.

Seus ovos são de coloração creme-clara, logo após a oviposição, e marrom-clara próximo à eclosão (SOSA-GÓMEZ et al., 2010). Após três a cinco dias, de acordo com os autores, as lagartas que eclodem são verde-claras, com listras longitudinais brancas e pontuações pretas, chegando a medir 40 a 45 mm em seu último estágio larval. As lagartas normalmente passam por seis instares larvais, sendo que em cada instar, esta sofre uma perceptível mudança na coloração de verde-amarronzada-clara para verde-limão translúcida (SMILOWITZ, 1973). No primeiro e segundo instar, as lagartas apenas raspam a folha, e conseguem perfurá-la a partir do terceiro instar, não se alimentando das nervuras centrais e laterais, deixando um aspecto rendilhado bem característico (MOSCARDI et al., 2012). O início da transformação em pré-pupa envolve alterações no sistema hormonal, com parada na alimentação, mudança de coloração e liberação do último “pellet” fecal de coloração amarelo brilhante, início da construção do casulo, perda da mobilidade para então, ocorrer a transformação em pupa (VÁZQUEZ, 1988).

O adulto é uma mariposa que pode atingir 35 mm de envergadura, apresenta quando em repouso, asas dispostas em formato de quilha, de coloração marrom ou cinza, com brilho cúpreo, e duas manchas prateadas em cada par de

asas (FUNICHELLO, 2012). Tem preferência para ovipositar na superfície inferior das folhas de soja (MASCARENHAS; PITRE, 1997).

Estudos realizados constataram que há um aumento na longevidade, oviposição e frequência de cópulas, quando néctar de flores de algodão foi fornecido para adultos de *C. includens* (JENSEN; NEWSON; GIBBENS, 1974). Segundo esses autores, em parte, esse fato pode explicar os maiores índices populacionais da espécie em soja, quando existe uma área de algodoeiro nas proximidades.

2.3 ASSIMILAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR INSETOS

Dentre os mecanismos de defesa das plantas a insetos herbívoros, um dos principais é o seu amplo espectro de metabólitos secundários, e que em alguns casos são específicos de uma única espécie vegetal (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2006). Existem evidências que a escolha do inseto pode ser influenciada pela composição química das plantas que lhes servem de alimento (SCHOONHOVEN; JERMY; VAN LOON, 1998), tanto por ser considerada uma hospedeira adequada, mas também por beneficiar o inseto de uma forma secundária. Evolutivamente, muitos herbívoros desenvolveram a capacidade de sequestrar um pequeno número de compostos fitoquímicos das plantas hospedeiras que lhes serviu de alimento durante a fase larval, mantendo-os até a sua fase adulta (FÜRSTENBERG-HÄGG; ZAGROBELNY; BAK, 2013). Esses compostos podem ser utilizados pelos insetos na sua defesa contra predadores, particularmente nos lepidópteros onde o fenômeno tem sido observado desde o século XIX (TRIGO, 2000).

Bates (1862) e Müller (1879) foram os primeiros autores a propor que borboletas coloridas aparentemente eram impalatáveis para predadores, e que a coloração de insetos palatáveis ou impalatáveis não era semelhante. Após essa constatação, Poulton (1914) apontou que a impalatabilidade das borboletas era devido à alimentação do inseto em determinada planta hospedeira durante a fase larval. O exemplo clássico é o da borboleta monarca, *D. plexippus*, que em sua fase jovem se alimenta de *Asclepias curassavica* (Gentianales: Apocynaceae) e, desta planta, sequestra um metabólito conhecido como cardenolídeo, que tornam os insetos adultos impalatáveis para os pássaros (ROTHSCHILD; FORD, 1970, citado

por ROTHSCCHILD et al., 1975). A assimilação ocorre na fase larval, sendo os compostos assimilados mantidos através da ontogênese do inseto e, posteriormente desempenhando inúmeros papéis ao longo de todo o seu ciclo de vida (ZAGROBELNY et al., 2014).

Segundo Brower (1984), a defesa química pode ser sugerida quando organismos possuem uma ou mais substâncias químicas nocivas que promovem a aproximação e/ou distanciamento dos predadores. A rejeição pode ocorrer de forma parcial ou completa depois do predador ingerir um ou mais indivíduos-praga, ou ser repellido depois de simplesmente sentir o odor ou o sabor da presa (BROWER, 1984). Essa impalatabilidade para os predadores pode ser demonstrada por meio de sinais de alerta visíveis, e também pelo comportamento gregário dos insetos (BOWERS, 1992).

A defesa química nos insetos envolve diversas áreas de pesquisa cujas investigações geralmente assumem característica interdisciplinar. Um exemplo dessa multiplicidade é que podemos encontrar estudos sobre mecanismos fisiológicos de biossíntese e sequestro de compostos defensivos por Lepidoptera (HARTMANN, 1991; 1999), evolução da coloração de aviso associado a impalatabilidade (GILBERT, 1983; TURNER, 1984; GUILFORD, 1990; MALLETT; JORON, 1999) e técnicas para o isolamento e identificação dos defensivos químicos (MILLAR, 1998).

Explicações evolutivas para a razão pela qual os insetos adquirem metabólitos secundários de suas plantas hospedeiras começou a tomar forma depois que Ehrlich e Raven (1964) propuseram a teoria sobre "radiação e fuga entre plantas e borboletas". Nesse cenário, três hipóteses principais promoveram a diversificação de ambos, baseados principalmente na evolução dos produtos químicos de proteção nas plantas, ou seja: (1) plantas com mutações aleatórias e recombinações poderiam produzir diversos compostos químicos que não estão diretamente relacionados com as suas vias metabólicas básicas; (2) alguns destes compostos, ao proteger as plantas do ataque de herbívoros poderiam entrar em uma nova zona adaptativa; e (3) se os insetos possuísem mutações aleatórias e recombinações que lhes permitissem explorar esses novos grupos de plantas, a seleção iria levá-los para uma nova zona de adaptação, onde eles estariam livres dos concorrentes e inimigos naturais, promovendo, mais uma vez, a radiação evolutiva.

Muitos insetos de diferentes ordens podem utilizar os metabólitos secundários de vegetais para sua própria defesa, no entanto, a falta de especificidade absoluta de assimilação destes pode permitir a entrada de outras toxinas levando à morte do inseto (DUFFEY, 1980). Herbívoros adaptados desenvolveram diferentes formas de superar as defesas das plantas (BROWN; TRIGO, 1995; SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2006), possuindo vários mecanismos para fugir dos compostos químicos da defesa dos vegetais. Dentre as estratégias de defesa desenvolvidas pelo inseto destacam-se a capacidade de se alimentar apenas das partes da planta que contém quantidades mínimas das substâncias (HESBACHER et al., 1995), desenvolver um intestino não permeável aos aleloquímicos, permitindo uma rápida eliminação das toxinas (SELF; GUTHRIE; HODGSON, 1964; SCUDDER; MEREDITH, 1982; WEBER; OSWALD; ZÖLLNER, 1986), desintoxicar por uma variedade de meios metabólicos (DOWD; SMITH; SPARKS, 1983; WHEELER; SLANSKY; YU, 2001; WITTSTOCK et al., 2004; AGERBIRK et al., 2006) ou, com o auxílio de microrganismos endossimbióticos (SHEN; DOWD, 1991), tolerar (MELANGELI; ROSENTHAL; DALMAN, 1997), acumular, modificar ou concentrar esses metabólitos para seu próprio benefício (DUFFEY, 1980; BROWN; TRIGO, 1994; NISHIDA, 2002). Tanto nos mecanismos de desintoxicação como no acúmulo de metabólitos podem incorrer em custos fisiológicos (CÂMARA, 1997; DESPRES; DAVID; GALLET, 2007), levando a consequências ecológicas e evolutivas (BOWERS, 1992; NISHIDA, 2002).

A assimilação de metabólitos secundários tem sido investigada com maior intensidade em insetos que se alimentam em plantas da família das Apocynaceae (Apocynoideae, Asclepiadoideae), Aristolochiaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae e Plantaginaceae, podendo ocorrer em angiospermas e, até mesmo em líquens (OPITZ; MÜLLER, 2009). O exemplo mais evidente da ocorrência de sequestro de metabólitos secundários por insetos é o da borboleta monarca, mas outras ordens de herbívoros também podem ingerir e armazenar compostos sintetizados pelas plantas nos tecidos de seu corpo ou tegumento (OPITZ; MÜLLER, 2009). As ordens mais comuns desse fenômeno predominam nos insetos das Coleoptera e Lepidoptera, mas podem ocorrer também em menor frequência em Heteroptera, Hymenoptera, Orthoptera e Sternorrhyncha (DUFFEY, 1980; OPITZ; MÜLLER, 2009).

Fisiologicamente, as substâncias sequestradas são absorvidas através da membrana do intestino e, podem ser distribuídas por todo o corpo do inseto, principalmente, na hemolinfa, ou muitas vezes restritos em tecidos especializados, tais como as glândulas de defesa (BLUM, 1983; BOWERS, 1990; NISHIDA, 2002). Estudos mostram que mutações que ocorrem nas proteínas da membrana, os transportadores ABC, que possuem função de exportar moléculas tóxicas a partir da célula, podem contribuir para a redução da exportação de compostos tóxicos pelas células epiteliais do intestino médio para o lúmen do intestino (GAHAN et al., 2010). Já as mutações nas caderinas (proteínas expressas no intestino médio das lagartas), podem contribuir para aumentar as concentrações de compostos químicos de defesa das plantas em lagartas, tal como na lagarta-rosada *P. gossypiella* (WILLIAMS et al., 2011). Esses resultados sugerem que as proteínas ABC, desempenham um papel importante no modo de ação das toxinas *Bt*, e que mutações dessas proteínas, podem conferir elevados níveis de resistência capazes de ameaçar a utilização contínua de culturas que expressam essas toxinas (GAHAN et al., 2010), podendo ser explorada para administrar este mecanismo de resistência *Bt* no campo.

A habilidade de capturar, concentrar e armazenar os compostos bioativos tóxicos de sua planta hospedeira, além de poderem ser utilizados para sua própria defesa, podem também, estar relacionados no seu comportamento reprodutivo (OPITZ; MÜLLER, 2009) como por exemplo, na comunicação intersexual e nos “presentes nupciais” (ROSSINI; GONZÁLEZ; EISNER, 2001; ZAGROBELNY et al., 2013; BOWERS, 1990; CONNER et al., 2000; DUSSOURD et al., 1989; CARDOSO; GILBERT, 2007; ZAGROBELNY et al., 2007b). Nesses últimos casos, compostos químicos de plantas serão metabolizados em feromônios sexuais e, então, utilizados para fins reprodutivos (OPITZ; MÜLLER, 2009). Na literatura, várias espécies de borboletas são conhecidas por sequestrar substâncias e assimilá-las em suas asas. Por exemplo, a borboleta azul, *Polyommatus icarus* (Rothenburg, 1775) (Lepidoptera: Lycaenidae) que se alimenta de uma variedade de plantas e é conhecida por sequestrar flavonoides e retê-los em suas asas (SIMMONDS, 2003).

Diversas substâncias podem estar envolvidas na proteção química de lepidópteros como, por exemplo, glicosídeos iridóides, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos, alcalóides pirrolizidínicos e tropânicos, ácidos aristolóquicos, inibidores de glicosidase, pirazinas, entre outras (TRIGO, 2000). Além disso, muitos

pigmentos de plantas são sequestrados pelos insetos, para a sua proteção por meio de camuflagem, mimetismo, ou coloração de advertência para evitar predadores (BOHM, 1998; BARBOSA; CALDAS, 2007; SANDRE et al., 2007), atração sexual (HARBORNE; GRAYER, 1993; CARROLL et al., 1997), e como anti-oxidantes para melhorar as funções fisiológicas como: imunidade, nutrição, ou foto-proteção (HINTON, 1981; EICHENSEER; MURPHY; FELTON, 2002; OJALA et al., 2005; CAZZONELLI, 2011). Experimentos analíticos, fisiológicos e comportamentais, com diferentes espécies de borboletas confirmaram a importância da absorção UV e suas estruturas refletindo a radiação para o reconhecimento de espécies e seleção de parceiros (BERNARD; REMINGTON, 1991; MEYER-ROCHOW, 1991; BRUNTON; MAJERUS, 1995). Alguns insetos ainda são capazes de sequestrar flavonoides presentes nas plantas (FORD, 1941; WILSON, 1987), que são armazenados na sua cutícula corporal para proteção contra patógenos e predadores ou até mesmo em suas asas para atração do seu parceiro sexual. Várias espécies de borboletas e de gafanhotos foram observadas sequestrando flavonoides de sua dieta (BERNAYS et al., 1991; HOPKINS; AHMAD, 1991; HARBORNE; GRAYER, 1993). Hopkins e Ahmad (1991) estudando seis espécies de gafanhotos da América do Norte mostraram que estes acumulam rutina (quercitina 3-glicosídeo) principalmente na cutícula da asa. Estudos com adultos de gafanhoto da espécie *Schistocerca americana* (Drury, 1773) (Orthoptera: Acrididae) também demonstraram que o inseto, deposita rutina em sua cutícula quando se alimenta em dietas contendo este flavonoide (BERNAYS et al., 1991).

Existe na literatura exemplos de especificidade onde o sequestro ocorre em apenas um dos sexos. Algumas espécies de machos de borboletas sequestram e metabolizam alcaloides pirrolizidínicos de plantas com finalidade reprodutiva (PLISKE; EDGAR; CULVENOR, 1976; DUSSOURD et al., 1989; TRIGO et al., 1996; EISNER et al., 2002) e glicosídeos cianogênicos tem funções adicionais importantes no ciclo de vida de *Zygaena filipendulae* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Zygaenidae). Esses últimos são utilizados como parte de um presente nupcial transferido do macho para a fêmea durante o acasalamento, em comunicação intersexual, e possivelmente no metabolismo do nitrogênio no processo de pupação (ZAGROBELNY et al., 2007a, 2007b, 2013; ZAGROBELNY; MULLER, 2011). Os flavonoides são compostos que também podem ser sequestrados por insetos sendo este fenômeno, em geral, detectado em maior intensidade nas asas de fêmeas, que

sequestram, em torno de 60% a mais do que os machos (SIMMONDS, 2003). Tal fato, segundo Burghardt et al. (2000; 2001), pode ser explicado pelo fato dos flavonoides acumulados nas asas das fêmeas serem utilizados na comunicação visual, já que precisam ser atrativas para os machos.

O uso de metabólitos secundários na interação dos herbívoros com seus inimigos naturais é outra função vinculada à assimilação de metabólitos secundários de plantas hospedeiras (TURLINGS; TUMLINSON; LEWIS, 1990; DYER, 1995; SMILANICH et al., 2009a). Uma variedade de estudos tem demonstrado que a ingestão e o sequestro de metabólitos secundários tornam os herbívoros impalatáveis a predadores, como pássaros, vespas e formigas (BOWERS, 1992; DYER, 1997; VENCL et al., 2005). Em particular, herbívoros que são impalatáveis aos predadores, são defendidos por determinadas substâncias químicas, tornando-se hospedeiros seguros para parasitoides se desenvolverem (GENTRY; DYER, 2002). Por outro lado, o sequestro e/ou desintoxicação dos metabólitos secundários acabaram alterando as respostas imunes dos herbívoros (SMILANICH et al., 2009a).

Todos os insetos polívoros são suscetíveis a encontrar compostos secundários em sua alimentação, considerando a sua ampla distribuição em diferentes partes da planta, de onde o inseto poderá sequestrar e absorver em seu corpo ou na cutícula (HARBORNE; GRAYER, 1993). No entanto, também é possível que os compostos passem de forma inalterada pelo sistema digestivo do inseto e sejam excretados de forma integral. Testes realizados com a lagarta *Heliothis zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) que se alimentaram de dieta contendo rutina marcada com trítio, mostraram a recuperação desse composto de forma inalterada em seus excrementos (ISMAN; DUFFEY, 1983).

O papel dos compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, em diferentes aspectos da interação entre a planta-inseto é conhecido, incluindo dados do efeito da rutina no comportamento alimentar de lagartas da família Noctuidae (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; 2006). Esse pigmento fenólico encontrado nas asas da borboleta *Melanargia galathea* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Satyridae) foi a primeira evidência de sequestro de flavonoides em insetos (THOMSON, 1926). O autor isolou o composto da borboleta e de sua planta hospedeira *Dactylis glomerata* (Poales: Poaceae), sendo obtidos por testes de cores simples (FORD, 1941) e cromatografia em papel (WILSON, 1985; 1986; 1987). Esses testes revelaram que

lepidópteros diurnos, são as espécies que em geral armazenam estes polifenóis de absorção de raios UV (SCHITTKO et al., 1999), sugerindo que os flavonoides podem contribuir para a pigmentação das asas das espécies voadoras diurnas (FORD, 1941). A importante confirmação de que os flavonoides são sequestrados pela lagarta ao se alimentar de sua planta hospedeira e que não são sintetizadas pelo próprio inseto, obtidos em estudos realizados com *M. galathea* (HARBORNE; GRAYER, 1993) mostraram ainda que a distribuição dos flavonoides nesta espécie ocorre em todos os estágios do seu ciclo vital, estando presentes no corpo e nas asas tanto de machos quanto de fêmeas, observando-se uma maior concentração nas seções brancas das asas pretas e brancas. Diferenças no total de flavonoides no peso seco das asas (0,8 a 1,9%) e no corpo do inseto (0,06 a 0,12%) também foram observadas (HARBORNE; GRAYER, 1993). Análises por cromatografia líquida em HPLC do corpo de borboletas da espécie *P. icarus*, indicaram que estes indivíduos acumulam quantidades variáveis de flavonoides, dependendo da planta hospedeira consumida e também da razão sexual do inseto (SCHITTKO et al., 1999). O autor ainda observou que outros flavonoides, como as flavonas, são particularmente comuns em Papilionidae (39% das espécies), Lycaenidae e Satyridae, mas de ocorrência menos frequente em outros grupos de borboletas. No caso das mariposas, são consideradas espécies menos positivas ao sequestro, embora algumas formas voadoras diurnas como Zygaenidae foram consideradas como sequestradora de flavonas de suas plantas hospedeiras (HARBORNE; GRAYER, 1993).

Avanços no conhecimento da diversidade e especificidade de enzimas envolvidas na biossíntese de compostos, que ocorrem nos organismos vivos como insetos, podem auxiliar no entendimento não só da habilidade dos mesmos em se desintoxicar e metabolizar os compostos das plantas, mas também na evolução do comportamento da seleção da planta hospedeira (BERENBAUM, 2002).

3. ARTIGO A - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA SOJA COMO INDICADORES DE ALIMENTAÇÃO NA FASE LARVAL DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* E *CHRYSODEIXIS INCLUDENS*

RESUMO

Os metabólitos de defesa de plantas hospedeiras podem ser sequestrados pelos insetos durante sua alimentação, permanecendo em seus órgãos e tecidos até a fase adulta. Dessa forma, é possível identificar as plantas hospedeiras consumidas na fase jovem da praga, considerando-se que a movimentação das pragas na paisagem agrícola é de grande importância para seu manejo. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar os metabólitos secundários oriundos das folhas de soja sequestrados por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae). Os genótipos utilizados para a realização das análises e bioensaios foram V. max RR, BMX Apollo RR, BMX Potência RR, BRS 284, BRS 360 RR, NA 5909 RR, ANTA 82 RR, TMG 115 RR, M9144 RR, 98Y30, TMG 132 e Intacta RR2 PRO variedade DONMARIO 6458. As folhas de soja, foram extraídas segundo metodologia do laboratório de Ecologia Química da Embrapa Soja e analisados em HPLC. As lagartas foram alimentadas nessas cultivares até atingirem a fase adulta, para serem analisadas em LC-MS/MS. Nas análises foliares da soja, foram identificados os isoflavonoides daidzina, glicitina, genistina, malonil daidzina, malonil glicitina, malonil genistina e o flavonól rutina. Para a análise dos compostos sequestrados, foi possível observar em *S. frugiperda*, as agliconas genisteína (91%) daidzeína (72%) e gliciteína (9%). Já em *C. includens*, observou-se daidzeína em apenas 48% dos extratos analisados. Assim, pelos resultados obtidos até o momento, é possível sugerir que genisteína é o indicador mais adequado para a alimentação de *S. frugiperda* em soja. Para *C. includens*, a aglicona daidzeína foi assimilada por menos da metade dos insetos analisados, sendo necessários estudos adicionais para verificar a assimilação de genisteína e gliciteína.

ABSTRACT

Plant defense metabolites may be sequestered by insects from host plant by feeding during larval stage, remaining in their organs and tissues up to adulthood. The identification of host plants consumed in the younger stage of the pest is of great importance for their management, considering that its movement in the agricultural landscape. The objective of this study was to determine the secondary metabolites sequestered from soybean leaves by two important soybean pests, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae). Metabolite analyzes and bioassays were carried out by using V. max RR, BMX Apollo RR, BMX Potência RR, BRS 284, BRS 360 RR, NA 5909 RR, ANTA 82 RR, TMG 115 RR, M9144 RR, 98Y30, TMG 132 e Intacta RR2 PRO DONMARIO 6458 genotypes, selected, as representative of the widest soybean sowed area in Brazil. Soybean leaf extractions were carried out according to the methodology of Chemical Ecology Lab of Embrapa Soja and analyzed by HPLC. The larvae were fed on these cultivars until reaching adulthood, when extraction and LC-MS/MS analyses were performed. In soybean leaf extract analyses, the isoflavones genistin, daidzein, glycitin, malonyl genistin, malonyl daidzin, malonyl glycitin, were identified, as well as the flavonol rutin. The aglycones genistein, daidzein and glycitein were observed on, respectively 91%, 72% and 9% of *S. frugiperda* adult bodies. On *C. includens*, daidzein was observed in only 48% of the body extracts analyzed. Thus, the results obtained so far, it is possible to suggest that genistein is the most suitable indicator for soybean feeding *S. frugiperda*. For *C. includens*, daidzein aglycone was assimilated by less than half of the analyzed insects, and additional studies are necessary to validate the assimilation of genistein and glycitein.

3.1 INTRODUÇÃO

Nas áreas de cultivo, onde é comum a sucessão de culturas, ou plantios escalonados de culturas com fenologias diferentes em áreas próximas como é o caso da soja, milho e algodão que são cultivados no verão, além desses, cultivos de entressafra, como aveia, trigo ou milho-safrinha, acabam favorecendo populações de insetos polípagos, devido à oferta contínua de alimento durante todo o ano, contribuindo para aumentar a dificuldade no seu manejo. Associada a essa condição, práticas inadequadas de controle como a aplicação excessiva de inseticidas e fungicidas, assim como a expansão da área de cultivo podem favorecer surtos de pragas até então consideradas secundárias (YORINORI, 2002; SANTOS; NEVES; MENEGUIM, 2005). Tais pragas, vêm ganhando importância devido ao seu ataque constante em culturas, com ocorrência regular e ampla distribuição geográfica, como é o caso das espécies do gênero *Spodoptera* (BUENO et al., 2010).

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta-do-cartucho, por exemplo destaca-se por se alimentar em mais de 80 espécies de plantas, incluindo o algodoeiro, milho e soja (POGUE, 2002; CAPINERA, 2008) que são sistemas agrícolas muito comuns no Brasil que oferecem oferta contínua de alimento aos insetos (SANTOS, 2001). Essa disponibilidade de alimento beneficia o desenvolvimento e reprodução dos insetos polípagos, principalmente quando há cultivo de algodão em áreas próximas às culturas do milho, de onde ocorrem migrações dos insetos para áreas cultivadas com algodão quando a cultura hospedeira principal entra na fase de maturação e senescência (SOARES; VIEIRA, 1998).

Outra lagarta polífaga anteriormente considerada uma praga secundária é *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae). Conhecida popularmente como “falsa-medideira”, esse lepidóptero tem capacidade de se desenvolver em 73 espécies de plantas hospedeiras no Brasil, pertencentes a 29 famílias (BERNARDI, 2012). Essa lagarta tem ocasionado danos expressivos a culturas como soja, algodão e milho, e passaram a ser constantes em Estados produtores como Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, entre outros (MOSCARDI et al., 2012).

Dentre os principais mecanismos de defesa das plantas contra

insetos herbívoros, podemos considerar a ampla ocorrência de metabólitos secundários dos vegetais (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2006). Muitos desses compostos são relativamente limitados em sua distribuição e, em função de sua toxicidade, os insetos herbívoros tendem a sequestrá-los (ORTH; HEAD; MIEROW, 2007), permanecendo em diferentes células do seu organismo até a fase adulta, para utilizá-los na sua proteção aos inimigos naturais. Um exemplo dessa proteção química é a borboleta monarca, *Danaus plexippus* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Danaidae), cuja larva assimila cardenolídeos de sua planta hospedeira (*Asclepias syriaca*) e as transfere para os adultos, tornando-as impalatáveis para pássaros (BROWER; EDMUNDS; MOFFITT, 1975).

A identificação desses compostos no corpo de insetos adultos é uma importante ferramenta para monitoramento dos hospedeiros no cenário agrícola. Além disso, com a inserção de culturas contendo o mesmo gene *Bt*, como algodão, milho e soja representam uma alta pressão de seleção para insetos, pois estes estarão expostos à proteína por muito mais tempo durante o ano. Nesse contexto, compreender a adaptabilidade de lepidópteros nessas culturas e o fluxo populacional entre as diversas culturas ao longo do ano é de grande importância para o manejo da resistência desses insetos. Essas informações podem fornecer indícios importantes da intensidade da pressão de seleção para resistência que os cultivos *Bts* podem estar exercendo no cenário agrícola. Com isso, o objetivo deste estudo foi identificar metabólitos de defesa em diferentes cultivares de soja e determinar a frequência de assimilação (sequestro) destes compostos por *S. frugiperda* e *C. includens*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Cultivo da Soja

Os experimentos foram realizados no laboratório de Ecologia Química e casa-de-vegetação da Embrapa Soja, Londrina, Paraná. Para avaliar a detecção dos metabólitos secundários em noctuídeos, primeiramente, foram cultivados doze genótipos de soja, sendo eles: V. Max RR; BMX Apollo RR; BMX Potência RR; BRS 284; BRS 360 RR; NA 5909 RR; Anta 82 RR; TMG 115 RR; M9144 RR; 98Y30; TMG 132 RR e a cultivar contendo a tecnologia *Bt* Intacta RR2

PRO variedade DONMARIO 6458, conhecida pela tolerância ao herbicida glifosato, maior produtividade em relação às demais variedades de soja e resistência às principais lagartas que atacam a soja como a lagarta da soja, a lagarta das maçãs, a broca das axilas e a falsa-medideira. As sementes foram obtidas no banco de germoplasma de soja da Embrapa Soja, exceto TMG 115 RR e TMG 132 RR que foram fornecidas pela empresa TMG. Estes materiais foram selecionados por serem na atualidade os genótipos de soja mais plantados no Brasil. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade de cinco litros, mantidas a uma temperatura de $\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\% \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas. Foram semeadas 10 sementes por vaso, deixando-se após desbaste, apenas cinco plantas. Para garantir alimento durante todo o desenvolvimento do inseto, foram realizados três plantios de forma escalonada (semanal), com dez vasos por genótipo em cada plantio. Após atingirem estágio vegetativo V6 (FEHR; CAVINESS, 1977), as folhas foram coletadas, levadas ao laboratório, desinfetadas em hipoclorito de sódio a 5%, para eliminar possíveis contaminantes (fungos, bactérias, etc.), enxaguadas com água, secas e o pecíolo enrolado com algodão úmido para evitar ressecamento da folha e oferecidas às lagartas.

3.2.2 Extração dos Isoflavonoides

As plantas utilizadas para a identificação dos metabólitos secundários foram cultivadas nas mesmas condições (temperatura, umidade e fotoperíodo) das plantas utilizadas para o desenvolvimento dos insetos. Após a coleta do 6º trifólio, as folhas foram moídas em almofariz com nitrogênio líquido, transferidas para tubo “Falcon” de 15 mL, pesadas e adicionado 5 mL de metanol (MeOH) 90%. As amostras foram submetidas ao banho de ultrassom durante 20 minutos e centrifugadas a 5650 rpm a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. O sobrenadante das amostras foi coletado com auxílio de pipetas Pasteur, transferido para tubos, e seco no vácuo. As amostras foram ressolubilizadas com 1,5 mL de MeOH 80%, filtradas em filtros-seringa (“Acrodiscs”) com membrana (Millipore®) de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e transferidas para os *vials* do auto-injetor, do cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC Prominence - Shimadzu) (Figura 1).

3.2.3 Identificação e Quantificação de Metabólitos de Defesa por HPLC

Os extratos metanólicos das amostras de folha das cultivares de soja foram analisados através de HPLC em coluna C18 de fase reversa (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5 micra). Alíquotas de 20µL foram injetadas automaticamente no equipamento Prominence da Shimadzu, com controlador CBM-20A; detector SPD-20A; desgaseificador DGU 20A5; bomba LC-20AT; amostrador automático SIL-20A e forno CTO 20A. A fase móvel foi composta de dois solventes: (A): 2% de ácido acético (HOAc) e (B): uma mistura de metanol (MeOH), ácido acético e água Milli-Q® (H₂O) (MeOH:HOAc:H₂O; 18:1:1). O sistema de gradiente linear utilizado na análise partiu da condição inicial com 75% de A e 25% de B, atingindo após 40 minutos a situação inversa, ou seja, 25% de A e 75% de B, mantida por cinco minutos. Ao atingir 45 minutos voltou à situação inicial permanecendo por 5 minutos antes da próxima injeção. O fluxo do solvente foi de 1 mililitro/minuto e o registro na região do ultravioleta (UV) no comprimento de onda 260 nanômetro (nm). A identificação dos compostos foi realizada através da comparação do tempo de retenção na coluna do HPLC e dos espectros dos picos obtidos com os dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides.

Figura 1 - Equipamento HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizado para identificação e quantificação de compostos secundários de extratos vegetais obtidos da folha da soja.



3.2.4 Os Insetos

As lagartas utilizadas das espécies *S. frugiperda* e *C. includens* foram obtidas na criação massal de insetos da Embrapa Soja. Para evitar o manuseio, as lagartas neonatas foram mantidas agrupadas e individualizadas em potes plásticos (200 mL) após atingirem o 3º instar. Os insetos foram condicionados, durante todo o seu desenvolvimento em câmara B.O.D. em condições controladas de temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotoperíodo (14 horas) nas diferentes cultivares de soja. Acompanhamentos diários foram realizados, observando-se a necessidade de manutenção e troca de alimento até a lagarta atingir a fase de pupa. Para assegurar que a concentração de isoflavonoides observadas nas lagartas de *S. frugiperda* e *C. includens* seria devido às substâncias presentes nas cultivares utilizadas, foram analisados insetos das duas espécies alimentados com dieta artificial como controle, já que esta possui baixas concentrações de flavonoides, não suficientes para sequestro pelo inseto. Essa dieta, à base de feijão, proteína de soja, gérmen de trigo, caseína e ágar foi desenvolvida de acordo com o método de Greene et al. (1976) e modificada por Hoffmann-Campo et al. (1985).

3.2.5 Análise Química dos Compostos Sequestrados pelos Insetos

Após emergência dos adultos, os insetos foram armazenados em microtubo 2 mL no ultrafreezer ($- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Na etapa seguinte os insetos foram liofilizados no Liofilizador Liotop L101 (Figura 2) por 48 h. Na sequência, as asas e pernas foram removidas, e a massa do restante do corpo foi pesada em balança analítica. Os insetos foram moídos no equipamento “Shake Master BMS”, onde em cada microtubo foram colocadas duas pérolas de aço para a trituração, a 1100 rpm, durante 60 segundos. As pérolas de aço foram retiradas e, em seguida, foi acrescentado 0,5 mL de 1N HCl em MeOH e homogeneizado em vortex, durante 10 segundos. A amostra foi transferida para um *vial dram* de 2 mL. O microtubo foi lavado novamente com 0,5 mL da solução de 1N HCL e reunida com a amostra do mesmo *vial dram*. Os *vials* com as amostras foram tampados e levados ao banho-maria a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. Após o resfriamento, a amostra foi agitada em vortex por 10 segundos, acrescentando-se 69 μl de NH_4OH (hidróxido de amônio), e

homogeneizado por 10 segundos, em vortex, e secas no vácuo. Para iniciar a etapa de extração, às amostras secas foram acrescentados 800 µl de 1% ácido fórmico em água no *vial dram* e agitadas por 10 segundos em vortex. Em seguida, adicionou-se 1500 µl acetato de etila, agitando-se novamente por 10 segundos. Na sequência, as amostras foram levadas ao banho de ultrassom, por 12 minutos. Posteriormente, as amostras foram transferidas para tubo Falcon (15 mL) e centrifugadas (4000 rpm, por 10 minutos, a 25 °C).

Para a primeira extração, foram retirados 1200 µl do sobrenadante do tubo e transferido para um microtubo (2 mL) (não foi descartado o restante do extrato para realizar a segunda parte da extração). Após transferir, as amostras foram colocadas no fluxo de nitrogênio gasoso até a secagem completa. Adicionou-se 1200 µl de acetato de etila no tubo “Falcon” com o restante do extrato da mariposa, agitou durante 10 segundos e depois as amostras foram levadas ao ultrassom durante 12 minutos, e centrifugadas (4000 rpm por 10 minutos a 25 °C). Foram retirados 1200 µl do sobrenadante e transferidos para o mesmo microtubo contendo o extrato seco da primeira extração. As amostras foram então novamente secas em fluxo de nitrogênio gasoso. O procedimento de extração foi realizado duas vezes com o objetivo de aumentar a concentração das substâncias extraídas. Para ressolubilização, ao extrato seco foi acrescentado 200 µl de 0,1% ácido fórmico em metanol, agitado em vortex por 30 segundos, filtradas em filtro-seringa 0,22 µm e transferido para um frasco específico do LC-MS/MS e realizada a identificação dos picos por espectrometria de massas.

Na análise dos metabólitos sequestrados pelos insetos da espécie *C. includens*, foi realizada uma etapa adicional com uma coluna de sílica-gel Waters Sep-Pak® C18 (10 g) devido ao maior conteúdo de lipídeos nesta espécie, que dificulta a identificação de agliconas e comprometem a separação cromatográfica. Tal etapa de filtração foi adicionada para limpeza das amostras, com intuito de isolar a isoflavona desejada, removendo compostos presentes na amostra bruta. Após secar à vácuo, a amostra onde havia sido acrescentado 200 µl de 0,1% ácido fórmico em metanol, foi ressolubilizada em 100 µl de MeOH 100%. Para condicionar a coluna, primeiramente uma seringa de 10 mL foi acoplada ao Sep-Pak®, e lentamente foi passado 10 mL de MeOH 100%, em seguida, 10 mL de água Milli-Q® (Ultrapura) para limpeza da coluna. Após tal procedimento, a seringa de 10 mL foi trocada por uma de 3 mL, e a amostra ressolubilizada foi adicionada à coluna.

Acrescentou-se 2 mL de MeOH 50% para início da corrida, em seguida, 2 mL de MeOH 80% e por último 2 mL de MeOH 100%.

Todas as corridas foram realizadas de forma separada e armazenadas em microtubo de 2 mL. Análises comparando as diferentes porcentagens de MeOH verificaram uma melhor extração quando realizada a uma concentração de MeOH 80%. A alíquota de MeOH 80% então, foi seca no SpeedVac, sendo a de 50 e 100% armazenadas caso necessária posteriormente. Após totalmente seco, foi adicionado 30% de acetonitrila (correspondente a 60 µl), homogeneizado em vortex por 10 segundos, submetido ao banho de ultrassom por 12 minutos, e adicionado 70% de água Milli-Q® (140 µl). Com o auxílio de uma pipeta, a amostra foi transferida para um *vial* do LC-MS/MS e feita a identificação dos picos por espectrometria de massas assim como realizado em *S. frugiperda*.

Figura 2 - Equipamento Liotop L101 utilizado para liofilizar o corpo do inseto.



3.2.6 Identificação e Quantificação por LC-Ms/Ms

Para identificar e quantificar os metabólitos de interesse, o sistema de cromatografia líquida e espectrometria de massa Q-TOF (MS/MS) modelo Xevo (Waters/Micromass, Manchester, UK), equipado com ESI (Figura 3), aspira 10 µL da amostra e as injeta em uma linha cromatográfica eluída com uma fase móvel constituída por 30% de MeOH em água para as análises dos tecidos de *C. includens*. Para as análises de *S. frugiperda* a fase móvel como condição inicial do gradiente, iniciou com 35% de acetonitrila em água, a um fluxo de 0,45 mL/min finalizando com 70% da solução. Essa diferença na metodologia foi devido a *S. frugiperda* ter sido analisada anteriormente a *C. includens*, e esta exigiu readaptações na metodologia, a qual, condicionou o equipamento a uma maior sensibilidade. No procedimento, a amostra é conduzida a um cartucho Acquity UPLC® BEH C18 de partícula 1.7 µm 2.1 x 50 mm (Waters), sendo os flavonoides de interesse retidos e parcialmente purificados. O perfil cromatográfico obtido é diretamente aplicado no espectrômetro de massas operando em modo negativo. A quantificação é realizada através da coleta de áreas do software MassLynx (Micromass) as quais são confrontadas em uma curva de calibração traçada pela injeção de padrões das isoflavonas em questão. O tempo de corrida do ensaio, desde a colocação da alíquota da amostra até a obtenção do cromatograma é de 5,5 minutos por amostra.

Figura 3 - Equipamento LC-MS/MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) utilizado para identificação e quantificação das agliconas obtidas do corpo do inseto.



3.2.7 Análise Estatística

No experimento de quantificação de isoflavonoides foi realizada a análise dos compostos presentes nas doze cultivares (V. MAX RR; BMX Apollo RR; BMX Potência RR; BRS 284; BRS 360 RR; NA 5909 RR; ANTA 82 RR; TMG 115 RR; M9144 RR; 98Y30; TMG 132 RR e Intacta RR2 PRO variedade DONMARIO 6458), com total de dez repetições cada cultivar, totalizando 120 plantas.

Para a análise dos compostos sequestrados pelos insetos de *S. frugiperda* e *C. includens*, foram utilizados os efeitos positivo e negativo, com onze cultivares (V. MAX RR; BMX Apollo RR; BMX Potência RR; BRS 284; BRS 360 RR; NA 5909 RR; ANTA 82 RR; TMG 115 RR; M9144 RR; 98Y30 e TMG 132 RR).

Os dados foram submetidos à análise exploratória para verificação da existência de todos os pressupostos exigidos para a análise de variância (ANOVA). Quando os requisitos para o emprego da estatística (normalidade da distribuição dos erros, homogeneidade das variâncias, e aditividade dos efeitos dos fatores de variação) não foram atendidos pelos dados da amostra experimental, os dados foram transformados $\sqrt{x + 0.5}$ ou $\sqrt{x + 1}$. Em seguida, foram realizadas as comparações múltiplas das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O

programa estatístico utilizado foi o pacote SAS-Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 1996).

No procedimento de extração de isoflavonoides do corpo do inseto, foi realizado o processo de hidrólise ácida, na qual todas as isoflavonas glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina), as malonís (daidzina, genistina e glicitina), as agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) foram concentradas nas formas de agliconas, daidzeína, genisteína e gliciteína. Pelo fato do procedimento da extração das folhas não se realizar a etapa de hidrólise, as formas derivadas são glicosídica, malonil, acetil e, algumas vezes na forma de aglicona. Com isso, para se obter a quantidade total de isoflavonas consumida pelo inseto, foi realizado uma soma das concentrações ($\mu\text{g/g}$) das isoflavonas glicosídicas, malonís, as agliconas e o derivado acetilado de daidzina, transformando-os todos em agliconas. Para calcular a média das isoflavonas (glicosídeo, malonil e acetil) identificadas nas folhas, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Massa glicosilada}}{\text{Peso Molecular glicosilado}} = \frac{\text{Massa aglicona}}{\text{Peso Molecular aglicona}}$$

Onde, a massa glicosilada foi multiplicada pelo peso molecular da aglicona, e em seguida, dividida pelo peso molecular do glicosídeo, assim obtendo o valor da massa da aglicona.

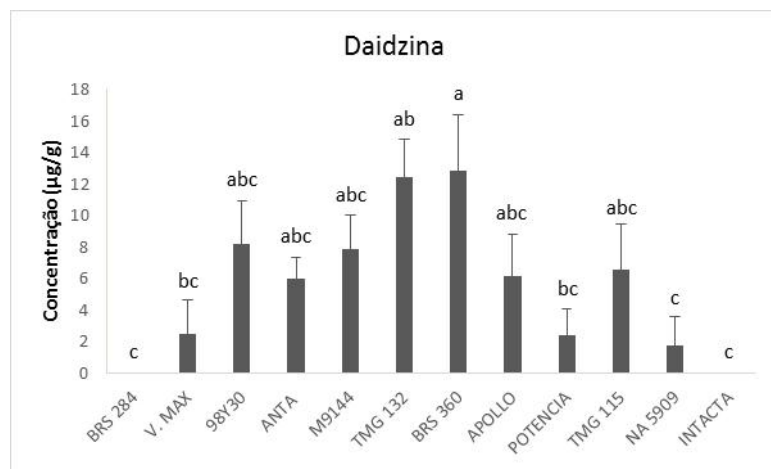
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análises Cromatográficas dos Extratos Foliares

Nas análises cromatográficas dos metabólitos secundários presentes na soja, foram identificadas as isoflavonas glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina), as malonís (daidzina, genistina e glicitina), as agliconas (daidzeína e genisteína), e a acetil daidzina, além da fitoalexina coumestrol e o flavonól rutina. O isoflavonoide glicosídico daidzina foi encontrado em todas as cultivares de soja, exceto em BRS 284 e Intacta RR2 PRO variedade DONMARIO 6458. A maior concentração foi observada em BRS 360 RR diferindo estatisticamente das outras cultivares. A cultivar NA 5909 RR apresentou a menor

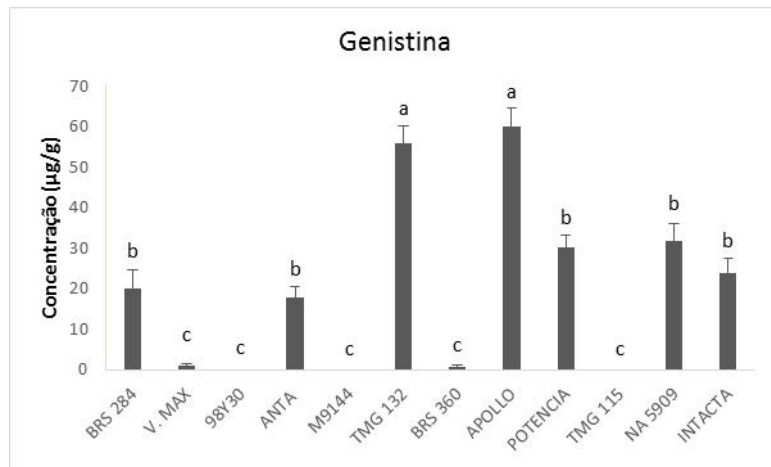
concentração, no entanto, não diferiu estatisticamente das duas cultivares onde a substância esteve ausente (Figura 4). Esse composto representa um dos metabólitos secundários de defesa da soja a insetos. Sharma e Norris (1991) descreveram que a daidzina causa antibiose em lagartas de *T. ni*, prolongando seu período de desenvolvimento, reduzindo a sua pupação e a emergência de adultos.

Figura 4 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) do glicosídeo daidzina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



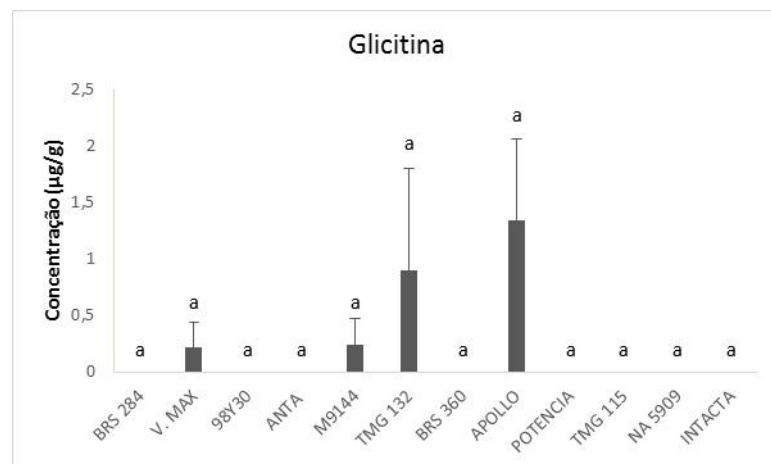
As maiores concentrações de genistina foram observadas nas cultivares Apollo RR e TMG 132 RR, não sendo detectada nas cultivares 98Y30, M9144 RR e TMG 115 RR (Figura 5). Esta isoflavona, juntamente com rutina têm sido relatada como os compostos relacionados à resistência de soja a desfolhadores (PIUBELLI, 2004), afetando negativamente por exemplo o tempo de alimentação de *Trichoplusia ni* (Hübner, 1802) (Lepidoptera: Noctuidae) (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001). Outros autores, como Salvador (2008), também constatou que essa isoflavona adicionada a dieta artificial não demonstra efeito antinutricional em *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Eribidae). No entanto, quando este composto é adicionado com o flavonoide rutina à dieta, observa-se uma maior mortalidade, redução dos pesos iniciais e de pupa, além de maior duração da fase larval.

Figura 5 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) do glicosídeo genistina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



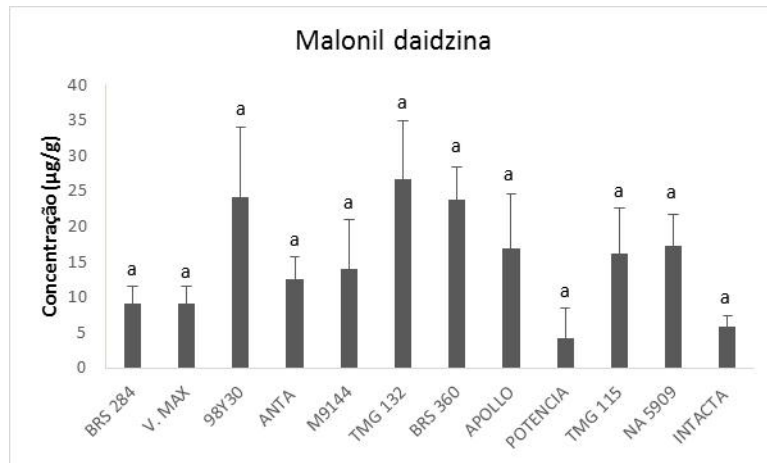
Conforme Figura 6, glicitina foi detectada apenas nas cultivares V. max RR, M9144 RR, TMG 132 RR e Apollo RR. Entretanto, devido a baixa detecção e alta variabilidade dos dados desse composto, não se observou diferença estatística significativa entre as cultivares.

Figura 6 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) do glicosídeo glicitina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



A malonil daidzina foi detectada em todos os genótipos não diferindo estatisticamente entre as cultivares (Figura 7). No entanto, é possível observar uma maior concentração nas cultivares, TMG 132 RR, 98Y30 e BRS 360 RR.

Figura 7 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) da malonil daidzina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Malonil genistina não foi identificada em TMG 132 RR, Apollo RR, BMX Potência RR e TMG 115 RR, com a maior concentração dessa substância observada em NA 5909 RR (Figura 8). Nas demais cultivares onde a malonil genistina esteve presente, não houve diferença estatística. Já malonil glicitina esteve ausente para os genótipos 98Y30, Anta 82 RR, TMG 115 RR, NA 5909 RR e Intacta RR2 PRO variedade DONMARIO 6458. As maiores concentrações desse composto ocorreram em BRS 360 RR (Figura 9). A acetil daidzina foi o único acetilado detectado nos genótipos de soja, sendo observado em maior concentração em NA 5909 RR e ausente em V. max RR, Anta 82 RR, M9144 RR e Intacta RR2 PRO variedade DONMARIO 6458 (Figura 10).

Figura 8 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) da malonil genistina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

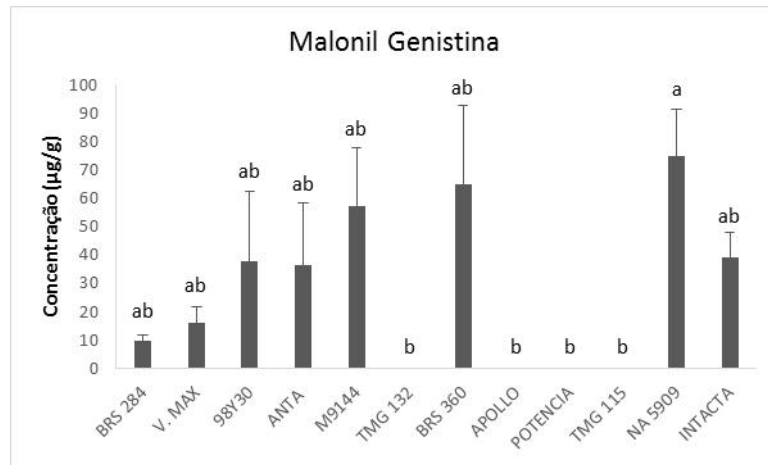


Figura 9 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) da malonil glicitina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

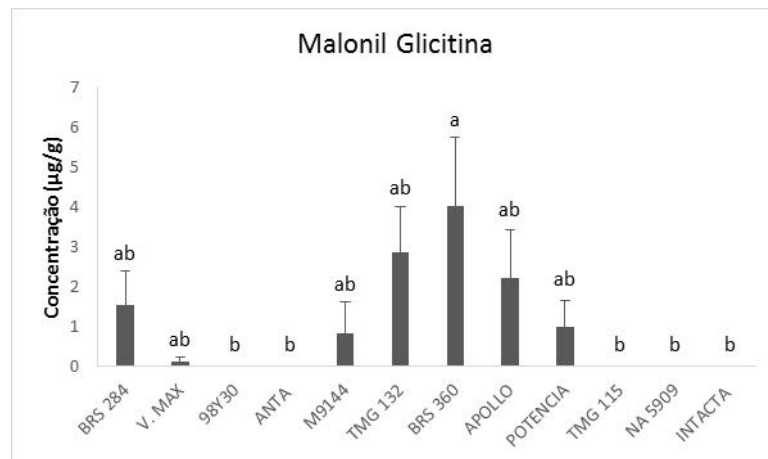
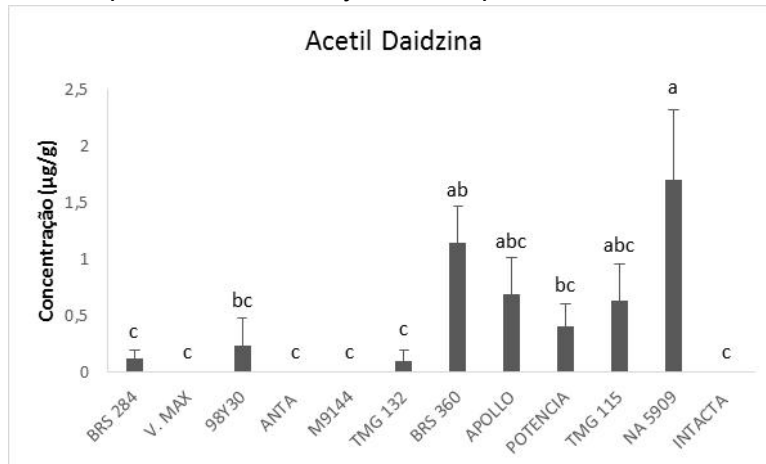
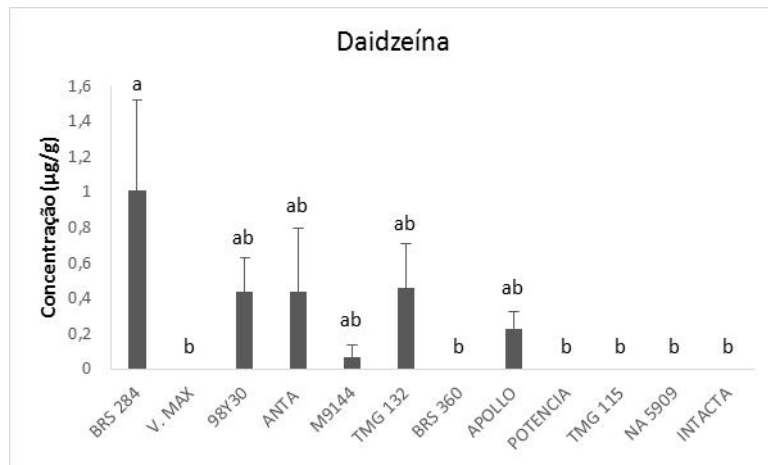


Figura 10 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) da acetil daidzina nos diferentes genótipos de soja com média transformada $\sqrt{x+1}$. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



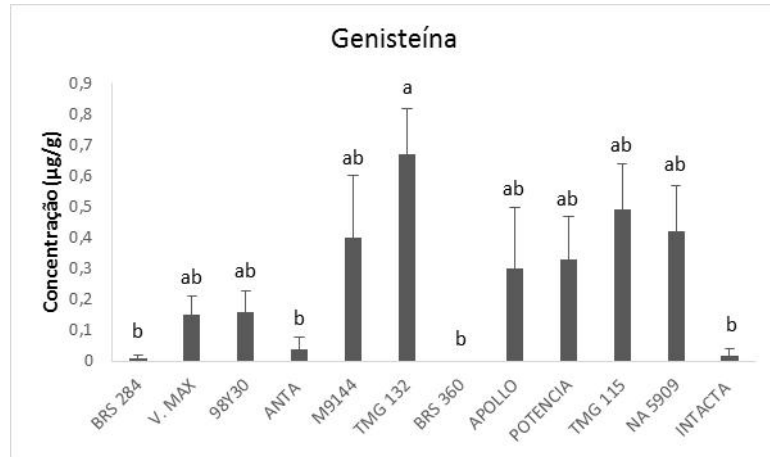
As agliconas identificadas, daidzeína e genisteína, ocorreram em concentração mais baixa em relação aos seus conjugados, principalmente glicosídeos e malonís. Relativamente, em folhas de BRS 284, daidzeína foi detectada em maior concentração, não ocorrendo nas cultivares V. max RR, BRS 360 RR, BMX Potência RR, TMG 115 RR, NA 5909 RR e Intacta RR2 PRO variedade DONMARIO 6458 (Figura 11). Essa substância possui baixo peso molecular e tem sido associado à resistência da soja a doenças (GRAHAM, 1999; LOZOVAYA et al., 2004). É descrita como precursora na produção de fitoalexinas como as gliceolinas (EBEL, 1986) e coumestrol (DEWICK; BARZ; GRISBBACH, 1970). Em soja, além de atuar na produção de fitoalexinas, a daidzeína tem sido relacionada como importante composto de defesa de plantas à insetos, afetando negativamente a biologia dos herbívoros, principalmente pela inibição do crescimento de lagartas (ZHOU et al., 2011).

Figura 11 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) da aglicona daidzeína nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



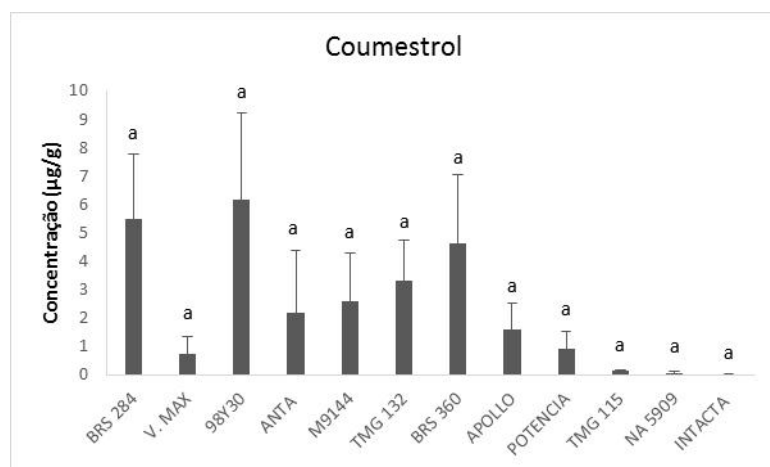
Na figura 12, genisteína foi identificada em todas as cultivares, exceto em BRS 360 RR, sendo em TMG 132 RR observada a sua maior concentração. Efeitos tóxicos, assim como efeitos negativos no desenvolvimento e biologia de pragas como *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Pentatomidae), *T. ni* e *A. gemmatilis* dessa isoflavona juntamente com daidzina tem sido observada por vários autores (SHARMA; NORRIS, 1991; HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; PIUBELLI et al., 2003b; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). Daidzeína e coumestrol observadas neste trabalho podem causar efeitos antibiótico e/ou antialimentar em lagartas de *T.ni* (SHARMA; NORRIS, 1991). As agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína são as formas mais bioativa dos isoflavonoides (KUDOU et al., 1991b; DHAUBHADEL, 2011), sendo, em geral ligadas a resposta das plantas a estresses de várias naturezas, ou seja induzidos por fatores bióticos e abióticos. Esse fato pode explicar a sua baixa ocorrência em folhas de soja desenvolvidas em casa-de-vegetação.

Figura 12 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) da aglicona genisteína nos diferentes genótipos de soja com média transformada $\sqrt{x + 0.5}$. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Em todas as cultivares testadas, a fitoalexina coumestrol (Figura 13) foi encontrada, no entanto, suas concentrações não diferiram estatisticamente. Caballero et al. (1986) associaram essa substância à redução da biomassa de lagartas e aumento na mortalidade de *C. includens*. Ainda Neupane e Norris (1990) relacionaram a ocorrência de daidzeína e coumestrol à redução no consumo alimentar de *T. ni*.

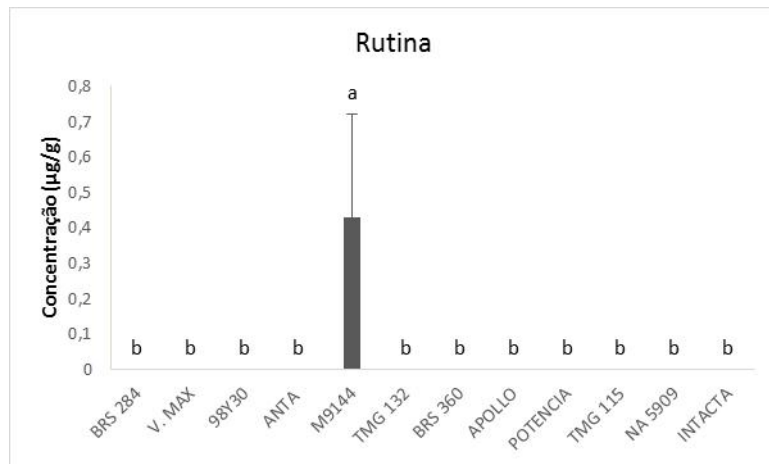
Figura 13 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) do coumestrol nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Outra substância identificada em folhas de soja, foi o flavonól rutina que ocorreu apenas em M9144 RR, e em baixa concentração (Figura 14). Esse flavonoide é reconhecido por desempenhar papel importante na defesa das plantas contra lepidópteros (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001), efeitos antibiótico e/ou antinutricional em insetos sugadores (PIUBELLI et al., 2003a; GILMAR et al., 1982; PIUBELLI et al., 2003b) e insetos mastigadores (STAMP; SKROBOLA, 1993; SIMMONDS, 2001; HOFFMANN-CAMPO et al., 2001, PIUBELLI et al., 2005; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). Sendo um dos compostos identificados no genótipo PI 227687 (HOFFMANN-CAMPO, 1995), que é amplamente utilizado em programas de melhoramento como fonte de resistência a insetos desfolhadores (PIUBELLI et al., 2005). O efeito negativo de rutina foi observado na biologia de lagartas desfolhadoras como *H. virescens* (HOFFMANN-CAMPO, 1995), *A. gemmatalis* (GAZZONI; HÜLSMEYER; HOFFMANN-CAMPO, 1997; PIUBELLI et al., 2005; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006), constando-se aumento da mortalidade e do período larval. Outros autores como Salvador et al. (2010) também constataram que *A. gemmatalis* quando alimentada com dieta contendo rutina isolada ou associada à caseína apresentou efeito negativo no desenvolvimento larval, na quantidade de alimento consumido e no peso de pupas. Em insetos como *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) e *H. armigera* o efeito da rutina na dieta ou de extratos indicaram uma redução do crescimento e aumento da mortalidade das lagartas, fato este que evidencia sua eficácia na formulação de biopesticidas contra insetos praga (PANDEY et al., 2012).

No entanto, a resposta do inseto em relação à rutina pode variar conforme a concentração testada. Em níveis acima de 10^{-3} molar foi deterrente para *Heliothis zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) e *H. armigera*, no final do estágio larval, porém, em concentrações acima de 10^{-4} molar, a mesma substância estimulou a alimentação dos insetos (BLANEY; SIMMONDS, 1983).

Figura 14 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) de rutina nos diferentes genótipos de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



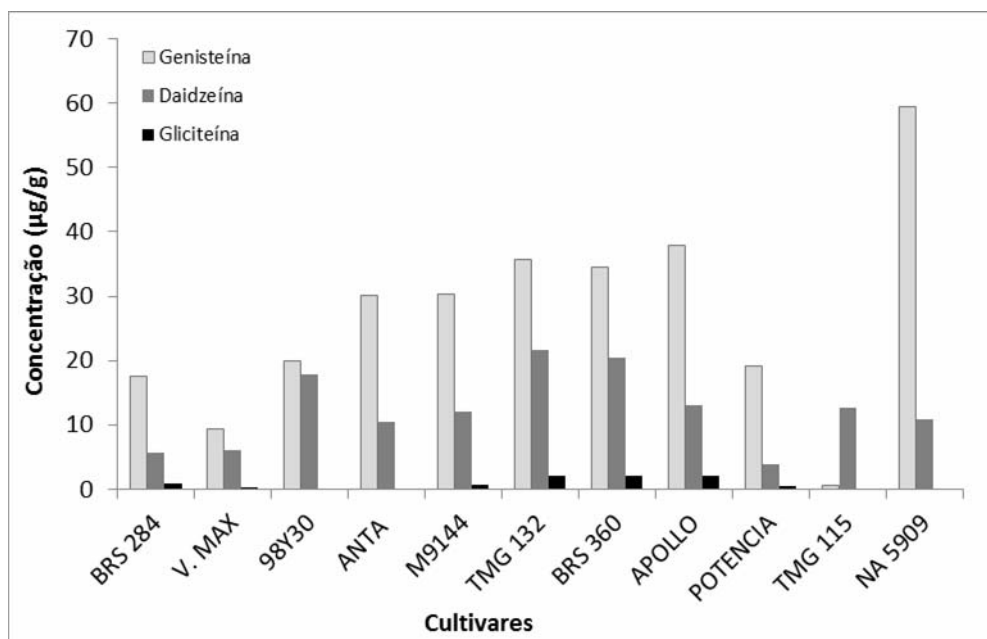
Os isoflavonoides daidzina, daidzeína, genistina, genisteína e as malonís (daidzina e genistina) são relacionadas a uma variedade de funções, como precursores da produção de fitoalexinas (LOZOVAYA et al., 2007), inibidores do ataque de patógenos (NAOUMKINA et al., 2007) e resistência de plantas a insetos (ZHOU et al., 2011). Embora as propriedades antinutricionais das gliceolinas contra insetos desfolhadores tenham sido observadas sobre condições experimentais, essas respostas são aparentemente espécie-específicas (HART; KOGAN; PAXTON, 1983). Melhores desempenhos dos insetos já foram observados, onde a concentração de isoflavonoides era maior. Esse fato pode estar relacionado com as diferentes formas de ação dessas substâncias sobre artrópodes pragas e a capacidade de adaptação dos insetos a essas substâncias. Apesar de amplamente distribuídos nas cultivares de soja, os isoflavonoides não possuem alta toxicidade aos artrópodes pragas. Comparados a muitas outras substâncias secundárias, os flavonoides não são especialmente tóxicos, e possuem baixa atividade fisiológica em muitos insetos (HARBORNE; GRAYER, 1993). Dependendo da concentração e da espécie de inseto podem atuar de forma diferenciada, como por exemplo o flavonoide rutina, que pode ser estimulante alimentar para o gafanhoto *Schistocerca americana* (Drury, 1773) (Orthoptera: Acrididae) (BERNAYS et al., 1991) e atuar negativamente na biologia de *A. gemmatilis* causando prolongamento do ciclo e alta mortalidade (GAZZONI; HÜLSMEYER; HOFFMANN-CAMPO, 1997; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). Além disso, flavonoides com estruturas relativamente parecidas, podem agir de forma diferente no mesmo inseto (HARBORNE; GRAYER,

1993), como no caso da rutina que funciona como estimulante alimentar para *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763) (Lepidoptera: Sphingidae), enquanto a quercetina 3-rhamnosido que possui menor quantidade de açúcar em relação à rutina, age como deterrente (BOER; HANSON, 1987).

Para os insetos, a composição química da planta constitui um desafio em sua alimentação, barreira esta que pode ser superada através de estratégias de adaptação como um conjunto de enzimas que atuam contra agentes tóxicos químicos (MELLO; SILVA-FILHO, 2002) e detoxificação por oxidação, redução, hidrólise ou conjugação de moléculas (SCOTT; WEN, 2001). O desenvolvimento de insetos em um número reduzido de hospedeiros, propicia uma forma mais eficiente de reconhecimento e adaptação aos metabólitos secundários presentes nas plantas.

Afim de se conhecer o conteúdo total de cada isoflavonoide na sua forma aglicona a conversão das formas glicosídicas, malonís e acetís indicou que a genisteína é o isoflavonoide com maior concentração nas cultivares de soja estudadas seguidas da daidzeína e por último a gliciteína com menor frequência e concentração (Figura 15).

Figura 15 - Concentração ($\mu\text{g/g}$) total de cada isoflavonoide na sua forma aglicona nos diferentes genótipos de soja.



3.3.2 Análises dos Extratos do Corpo do Inseto

A análise dos extratos do corpo de adultos de *S. frugiperda* permitiu identificar compostos sequestrados em insetos alimentados com todas as cultivares que lhes serviram de alimento na fase larval. As agliconas genisteína, daidzeína e gliciteína foram assimiladas pelo inseto em proporções variadas (Tabela 1). De modo geral, a genisteína foi identificada em 91% dos adultos analisados. Sendo detectada em todos os extratos de adultos quando alimentadas nas cultivares BMX Potência RR, BMX Apollo, TMG 115 RR e Anta 82 RR (n=10). E na cultivar V. max RR, essa aglicona foi identificada em sete insetos.

Daidzeína foi observada em 72% dos adultos de *S. frugiperda* analisados (Tabela 1). Dentre as cultivares, Anta 82 RR teve a presença da daidzeína em todos os insetos analisados (n=10). E, a menor detecção foi observada na cultivar NA 5009 para esta substância (n=4).

A hidrólise ácida dos extratos do corpo de insetos auxilia na detecção dos metabólitos secundários embora nas folhas de soja as formas agliconas ocorrem em concentrações menores. Entretanto, esse procedimento padroniza as diferentes formas glicosiladas e facilita os procedimentos analíticos. Esses resultados corroboram com os observados por Harborne e Grayer (1993), que constataram que após a hidrólise ácida dos extratos do corpo das borboletas são esperadas as formas agliconas sequestradas de suas plantas hospedeiras. Os autores ainda verificaram que muito dos resultados negativos são de espécies de borboletas que se alimentam de mais de uma espécie vegetal, capazes de sequestrar outras classes de constituintes secundários dos hospedeiros. Bjarnholt et al. (2012) ao realizarem a quantificação de linamarina e lotaustralina sequestradas por lagartas do gênero *Zygaena*, verificou que cerca de 0,5 a 50% dos compostos ingeridos podem ser recuperados a partir das lagartas. No presente experimento, as lagartas foram alimentadas unicamente com soja, entretanto é necessário considerar que baixas concentrações podem estar abaixo do nível de detecção dos equipamentos utilizados.

Gliciteína foi o isoflavonoide com menor frequência nas mariposas com total geral de 9% (Tabela 1). Nas cultivares, três insetos foram o maior número de sequestro observados em adultos alimentados na fase larval em BRS 360 RR e M9144 RR. Em contrapartida nos genótipos TMG 132 RR, 98Y30, V. max RR, BMX

Apollo e NA5909 RR, esta substância não foi identificada em nenhum dos insetos analisados. Essa variação no sequestro de flavonoides também é observado em espécies de borboletas como *Eurytides marcellus* (Cramer, 1777) (Lepidoptera: Papilionidae), *Lysandra coridon* (Poda, 1761) (Lepidoptera: Lycaenidae) e *Coenonympha pamphilus* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Satyridae), a qual apenas um dos três glicosídeos do flavonoide quercetina da planta alimentar, foi detectável nesses insetos (HARBORNE; GRAYER, 1993). Schittko et al. (1999) também realizaram análises cromatográficas em HPLC com adultos da espécie *Polyommatus icarus* (Rothenburg, 1775) (Lepidoptera: Lycaenidae) demonstrando que esses insetos acumulam quantidades variáveis de flavonoides dependendo da planta hospedeira e da razão sexual dos indivíduos. As diferenças entre os padrões de flavonoides de plantas e insetos e mudanças no desenvolvimento dos padrões de flavonoides nas borboletas podem ser devido a mecanismos seletivos de excreção e sequestro, bem como reações de biotransformação por insetos ou de sua flora intestinal (WILSON, 1985; WIESEN et al., 1994).

Tabela 1 - Número de insetos onde houve presença das agliconas genisteína, daidzeína e gliciteína em adultos de *Spodoptera frugiperda* alimentadas na fase larval nas diferentes cultivares (n=10).

Cultivares	Genisteína	Daidzeína	Gliciteína
M9144	8	6	3
TMG 132	9	8	0
98Y30	9	9	0
V. max	7	5	0
Potência	10	5	1
Apollo	10	9	0
TMG 115	10	7	1
NA5909	9	4	0
BRS 360	10	9	3
BRS 284	8	7	1
Anta	10	10	1
Total	100	79	10

C. includens é conhecida por ser um inseto bastante migratório quando atinge a fase adulta (HARDING, 1976). E o fato de encontrar outras substâncias além da daidzeína, sem o processo de limpeza do Sep-Pak®, pode ser devido às mariposas dessa espécie conter elevados níveis de lipídio no corpo, característica fisiológica tipicamente associada a insetos migratórios (MASON; JOHNSON; WOODRING, 1989). No desenvolvimento de *C. includens*, nas diferentes cultivares foi observada uma alta mortalidade na fase larval, a qual comprometeu o número de repetições dessa espécie para a análise dos compostos sequestrados. Devido à essa variação no número de indivíduos por cultivar, foi calculado a porcentagem dos resultados positivos para facilitar a comparação. Nas análises dos compostos assimilados em *C. includens*, mostraram que, em apenas 48% dos insetos criados, houve sequestro da aglicona daidzeína, observando uma redução de 24% quando comparado com o sequestro que ocorreu em *S. frugiperda* (Tabela 2). Essa variação na assimilação, pode ser decorrente à diferenças no

mecanismo de detoxificação de metabólitos entre as espécies. Tal resultado, corrobora com resultados obtidos por Ford (1941) que realizou um levantamento com dez ordens de lepidópteros, e através da detecção por cromatografia, que mostrou a forma desigual de ocorrência de flavonoides entre as diversas ordens de insetos estudados. Em confirmação com seu trabalho, apenas três grupos apresentaram flavonoides regularmente em seus tecidos, podendo ser essa uma das razões possíveis pela diferença no sequestro de compostos secundários entre *S. frugiperda* e *C. includens*. Urzúa et al. (1987) quantificaram as concentrações de ácido aristolóquico nas plantas e insetos, com o objetivo de investigar a eficiência do sequestro em larvas de *Battus archidamas* (Boisduval, 1836) (Papilionidae: Troidini) quando criadas em *Austrocedrus chilensis*. Desse sequestro, foi verificado que apenas 2% do total do composto presente na planta foi sequestrado, e 25% excretado pelo inseto, entendendo-se que o restante do ácido tenha sido metabolizado. Lampert e Bowers (2010) analisando insetos da espécie *Estigmene acrea* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Arctiidae), também verificaram uma baixa assimilação de compostos pelas mariposas. Smilanich et al. (2011) ainda, constataram que indivíduos que se alimentam de dietas com altas e baixas concentrações de glicosídeos iridóides exibem respostas imunes quase idênticas. Os elevados níveis de melanização sobre as dietas vegetais, bem como a baixa variação entre todas as dietas sugerem que indivíduos de *Grammia incorrupta* (Hy. Edwards, 1881) (Lepidoptera: Arctiidae) tem uma forte resposta imune. As respostas imunes podem ser altamente variáveis em insetos (ROLFF; SIVA-JOTHY, 2003) e essa variação pode ser atribuída ao estresse ambiental (VAN OOIK; PAUSIO; RANTALA, 2008), dieta alimentar (SMILANICH et al., 2009a), variação genética (LAZZARO; SCEURMAN; CLARK, 2004), ou pressão de predação.

No presente trabalho, insetos alimentados à base de dieta artificial, tanto *S. frugiperda* quanto *C. includens*, não apresentaram o sequestro de nenhuma das agliconas analisadas. Essa ausência da substância mostra que devido a baixa concentração de isoflavonoides na dieta artificial, esses não foram suficientes para que os insetos o sequestrassem. Esse fato também comprova que os flavonoides foram sequestrados pela lagarta ao se alimentar da cultura da soja, e que não foram sintetizadas pelo próprio inseto, assim como Harborne e Grayer (1993) já haviam constatado em estudos com a borboleta *Melanargia galathea* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Satyridae).

Tabela 2 - Número de insetos onde houve presença da aglicona daidzeína em adultos de *Chrysodeixis includens* alimentadas na fase larval nas diferentes cultivares.

Cultivares	Daidzeína
M9144 (n=7)	2
TMG 132 (n=1)	0
98Y30 (n=5)	4
V. max (n=7)	4
Potência (n=7)	3
Apollo (n=5)	1
TMG 115 (n=6)	3
NA5909 (n=8)	4
BRS 360 (n=3)	2
BRS 284 (n=8)	4
Anta (n=7)	4
Total	31

A possibilidade de identificar nos insetos adultos as plantas hospedeiras utilizadas pelo inseto na fase larval torna-se importante para monitoramento do cenário agrícola, principalmente para as tecnologias que possam gerar uma pressão de seleção, como no caso das cultivares *Bt*. Muitos metabólitos secundários são relativamente limitados em sua distribuição nas espécies vegetais e, em função de sua toxicidade, insetos herbívoros tendem a sequestrá-los (ORTH; HEAD; MIEROW, 2007), permanecendo em diferentes células de seu organismo até a fase adulta. Burghardt et al. (2000) estudaram o teor de flavonoides em borboletas alimentadas em diferentes espécies de plantas com conhecidos teores de flavonoides, sendo possível observar que os níveis de flavonoides nos insetos são associados positivamente com as quantidades de flavonoides no alimento consumido. Os autores mencionam que as lagartas também são capazes de sequestrar flavonoides de alimentos que normalmente não se alimentam (não-hospedeiros) e que essa assimilação de flavonoides é maior nas fêmeas do que nos machos. Um outro exemplo é o gossipol, composto exclusivamente relacionado ao

algodão (*Gossypium* spp.). Rojas et al. (1992) demonstraram que embora grande parte desse composto seja excretado pelas lagartas de *H. virescens*, pelo menos 33% se dispersou na hemolinfa e pode ser detectado nos adultos.

Dependendo da planta consumida, outros compostos secundários podem ser estudados com o mesmo objetivo. Os ácidos hidroxâmicos podem se constituir como bons indicadores para gramíneas, tanto selvagens como cultivadas (LONG et al., 1977; ZUNICA et al., 1983). Entretanto, a separação entre as diferentes espécies de gramíneas fica mais difícil pois, por exemplo, especificamente, o composto 2,4-diidroxí-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (DIMBOA) que é o principal ácido hidroxâmico do milho (ARGANDOÑA et al., 1983), foi também identificado em trigo (MORAES et al., 2008).

Como pode ser observado nesta pesquisa, a assimilação (sequestro) ou a detoxificação de metabólitos secundários depende largamente da espécie do inseto praga. *C. includens* e *S. frugiperda* pertencem à mesma ordem de insetos (Lepidoptera) e à mesma família (Noctuidae), entretanto possuem diferentes padrões de assimilação e/ou detoxificação, sendo necessários diversos estudos adicionais para determinar com maior precisão seus padrões de metabólicos.

3.4 CONCLUSÃO

Nas análises cromatográficas dos metabólitos secundários em folhas de soja, foram identificadas isoflavonas glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina), malonís (daidzina, genistina e glicitina), agliconas (daidzeína e genisteína), e a acetil daidzina, além da fitoalexina coumestrol e o flavonól rutina.

Ao realizar a transformação do conteúdo total de cada isoflavonoide em sua forma aglicona, os dados obtidos indicaram que a genisteína é o isoflavonoide com maior concentração nas cultivares de soja estudadas, seguidas da daidzeína, e por último a gliciteína, em menor concentração. Assim, as análises cromatográficas e espectrométricas sugerem que genisteína é a aglicona sequestrada pelo maior número de insetos. Tal resultado justifica o fato de adultos de *S. frugiperda* terem sequestrado genisteína em maior proporção em relação às demais agliconas.

Em *C. includens*, os dados sugerem que daidzeína ocorre em menos da metade dos extratos de insetos analisados, o que também indica a não adequação de sua utilização como indicador alimentar em soja para a lagarta falsa-medideira (*C. includens*). No entanto, estudos adicionais são necessários para verificar a assimilação de genisteína e gliciteína nesta espécie.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O alto percentual de genisteína identificado em *S. frugiperda*, sugere que este composto é o indicador da fonte alimentar mais adequado para essa espécie comparado à daidzeína.

A transformação das formas glicosídicas e malonís de glicitina em gliciteína, mostrou que essa aglicona ocorreu em baixa concentração nos genótipos de soja estudados e, conseqüentemente o sequestro dessa substância pelos insetos ficou abaixo do nível de detecção dos equipamentos utilizados, mesmo nas amostras hidrolizadas. Dessa forma, essa aglicona não se caracteriza como um bom indicador de alimentação de lagartas da cultura da soja.

Em *C. includens*, daidzeína não se mostrou um bom marcador alimentar para a cultura da soja, assim estudos adicionais para verificar a assimilação de genisteína e gliciteína nessa espécie são necessários.

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam genisteína como marcador bioquímico relacionado à cultura da soja para insetos oriundos do campo, sem conhecimento prévio da planta hospedeira na fase larval. Sendo importante verificar a assimilação dessa substância em outras espécies pragas da soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGERBIRK, N.; MÜLLER, C.; OLSEN, C. E.; CHEW, F. S. A common pathway for detoxification of 4-hydroxybenzylglucosinolate in *Pieris* and *Anthocaris* (Lepidoptera: Pieridae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 3, p. 189-198, 2006.

ALI, A.; LUTTRELL, R. G.; PITRE, H. N. Feeding sites and distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on cotton. **Environmental Entomology**, v. 19, n. 4, p. 1060-1067, 1990.

AOKI, T.; AKASHI, T.; AYABE, S. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. **Journal of Plant Research**, v. 113, n. 4, p. 475-488, 2000.

ARGANDOÑA, V. H.; CORCUEREA, L. J.; NIEMEYER, H. M.; CAMPBELL, B. C. Toxicity and feeding deterrence of hydroxamic acids from gramineae in synthetic diets against the greenbug, *Schizaphis graminum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 34, n. 2, p.134-138, 1983.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS, **Soja Bt**. Disponível em: <<http://www.boaspraticasogm.com.br/site/soja-bt.aspx>> Acesso 03 jun de 2015.

ÁVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013, 12 p. (**Embrapa Agropecuária Oeste, Circular técnica, n. 23**).

ÁVILA, C. J.; GRIGOLLI, J. F. J. Pragas de soja e seu controle. Embrapa Agropecuária Oeste. In: LOURENÇÃO, A. L. F.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; PITOL, C.; GITTI, D. C.; ROSCOE, R. (Ed.). **Tecnologia e produção: Soja 2013/2014**. Maracaju, MS: Fundação MS, p. 109-168, 2014.

BALDWIN, I. T.; SCHULTZ, J. C. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. **Science**, n. 221, p. 277-278, 1983.

BARBOSA, P.; CALDAS, A. Do larvae of species in macrolepidopteran assemblages share traits that influence susceptibility to parasitism? **Environmental Entomology**, v. 36, n. 2, p. 329-336, 2007.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R.; OLIVEIRA, M. D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 137, n. 3, p. 237-245, 2010.

BATES, H. W. Contributions to an insect fauna of the Amazon Valley. Lepidoptera: Heliconidae. **Transactions of the Linnean Society of London**. v. 23, n. 3, p. 495-566, 1862.

BERENBAUM, M. R. Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. **Journal Chemical Ecology**, v. 28, n. 5, p. 873-896, 2002.

BERNARD, G. D.; REMINGTON, C. L. Color vision in *Lycaena* butterflies: spectral tuning of receptor arrays in relation to behavioral ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 7, p. 2783-2787, 1991.

BERNARDI, O. ; ALBERNAZ, K. C.; VALICENTE, F. H.; OMOTO, C. Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: **BORÉM, A.; ALMEIDA, G. D. Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais. Visconde do Rio Branco: Suprema**, p. 179-204, 2011.

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**. 2012. 144p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba (São Paulo).

BERNAYS, E. A.; HOWARD, J. J.; CHAMPAGNE, D.; ESTESEN, B. J. Rutin: a phagostimulant for polyphagous acridid *Schistocerca americana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 60, n. 1, p. 19-28, 1991.

BERTICAT, C.; BONNET, J. DUCHON, S.; AGNEW, P.; WEILL, M.; CORBEL, V. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, p. 1-9, 2008.

BJARNHOLT, N.; NAKONIECZNY, M.; KEDZIORSKI, A.; DEBINSKI, D. M.; MATTER, S. F.; OLSEN, C. E.; ZAGROBELNY, M. Occurrence of sarmentosin and other hydroxynitrile in Parnassius (Papilionidae) butterflies and their food plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 5, p. 525-537, 2012.

BLANEY, W. M.; SIMMONDS, M. S. J. Electrophysiological activity in insects in response to antifeedants. **COPR report Project**, v. 9, p. 219, 1983.

BLUM, M. S. Detoxication, Deactivation, and utilization of plant compounds by insects. In: Plant Resistance to Insects. **American Chemical Society**, p. 265-275, 1983.

BOER, G.; HANSON, F. E. Feeding responses to solanaceous allelochemicals by larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 45, n. 2, p. 123-131, 1987.

BOHM, B. A. Introduction to flavonoids: Chemistry and biochemistry of organic natural products. **Australia: Harwood Academic Publishers**, 1998.

BOTTON, M.; CARBONARI, J. J.; GARCIA, M. S.; MARTINS, J. D. S. Preferência alimentar e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim-arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 2, 1998.

BOTTRELL, D. G.; BARBOSA, P.; GOULD, F. Manipulating natural enemies by plant variety selection and modification: a realistic strategy? **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 347-367, 1998.

BOWERS, M. D. Recycling plant natural products for insect defense. In: Insect Defenses. **State University of New York Press**. Albany, p. 353-386, 1990.

BOWERS, M. D. The evolution of unpalatability and the cost of chemical defense in insects, p. 216-244. In: ROITBERG, B. D.; ISMAN, M. B. (Eds.). **Insect Chemical Ecology: An Evolutionary Approach**. Chapman & Hall, New York, 1992.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 573-579, 2008.

BROWER, L. P.; EDMUNDS, M.; MOFFITT, C. M. Cardenolide content and palatability of a population of *Danaus chrysippus* butterflies from West Africa. **Journal of Entomology Series A, General Entomology**, v. 49, n. 2, p. 183-196, 1975.

BROWER, L. P. Chemical defense in butterflies. In: **Symposia of the Royal Entomological Society of London**, 1984.

BROWN, K. S.; TRIGO, J. R. Multi-level complexity in the use of plant allelochemicals by aposematic insects. **Chemoecology**, v. 5, p. 119-126, 1994.

BROWN, K. S.; TRIGO, J. R. The ecological activities of alkaloids. **The Alkaloids: chemistry and pharmacology**, v. 47, p. 227-354, 1995.

BRUNTON, C. F. A.; MAJERUS, M. E. N.; MICHAEL, E. N. Ultraviolet colours in butterflies: intra or inter specific communication?. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 260, n. 1358, p. 199-204, 1995.

BUENO, R. D. F.; PARRA, J. R. P.; BUENO, A. D. F.; MOSCARDI, F.; DI OLIVEIRA, J. R. G.; CAMILLO, M. F. Sem Barreira. **Embrapa Soja - Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2007.

BUENO, R. C. O. F. PARRA, J. R.; BUENO, A. D. F.; HADDAD, M. L. Performance of *Trichogrammatids* as biocontrol agents of *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 389-394, 2009.

BUENO, A. F.; BATISTELA, M. J.; MOSCARDI, F.; BUENO, R. C. O. F.; NISHIKAWA, M.; HIDALGO, G.; SILVA, L.; GARCIA, A.; CORBO, E.; SILVA, R. B. Níveis de desfolha tolerados na cultura da soja sem a ocorrência de prejuízos à produtividade. Londrina: Embrapa CNPSo, 2010, 11 p. (**Embrapa Soja, Circular Técnica, n. 79**).

BUENO, A. F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BUENO, R. C. O. F. Controle de pragas apenas com o MIP. **Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2010.

BURGHARDT, F.; KNUTTEL, H.; BECKER, M.; FIEDLER, K. Flavonoid wing pigments increase attractiveness of female common blue (*Polyommatus icarus*) butterflies to mate-searching males. **Naturwissenschaften**, v. 87, n. 7, p. 304-307, 2000.

BURGHARDT, F.; PROKSCH, P.; FIEDLER, K. Flavonoid sequestration by the common blue butterfly *Polyommatus icarus*: quantitative intraspecific variation in relation to larval hostplant, sex and body size. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 9, p. 875-889, 2001.

BUSATO, G. R.; GRUTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S.; GIOLO, F. P.; MARTINS, A. F. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, v. 31, p. 525-529, 2002.

BUSOLI, A. C.; FRAGA, D. F.; SANTOS, L. C.; ALENCAR, J. R. C. C.; GRIGOLLI, J. F. J.; JANINI, J. C.; SOUZA, L. A. VIANA, M. A.; FUNICHELLO, M. **Tópicos em Entomologia Agrícola**. 4ª edição. Jaboticabal: Editora Multipress, 2011.

CABALLERO, P.; SMITH, C. M.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H. Isoflavones from an insect-resistant variety of soybean and the molecular structure of afrormosin, **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 6, p. 1126-1129, 1986.

CÂMARA, M. D. Physiological mechanisms underlying the costs of chemical defense in *Junonia coenia* Hübner (Nymphalidae): a gravimetric and quantitative genetic analysis. **Evolutionary Ecology**, v. 11, p. 451-469, 1997.

CAPINERA, J. L. **Southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)**. University of Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS, 1999.

CAPINERA J. L. **Encyclopedia of entomology**. Springer Science & Business, 2nd ed., Dordrecht: The Netherlands, 2008.

CARDOSO, M. Z.; GILBERT, L. E. A male gift to its partner? Cyanogenic glycosides in a spermatophore of longwing butterflies (*Heliconius*). **Naturwissenschaften**, v. 94, p. 39-42, 2007.

CARRIÈRE, Y.; SISTERTON, M. S.; TABASHNIK, B. E. Resistance management for sustainable use of *Bacillus thuringiensis* crops in integrated pest management. In: HOROWITZ, A. R.; ISHAAYA, I. **Insect Pest Management: Field and Protected Crops**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2004. p. 65-95.

CARROLL, M.; HANLON, A.; HANLON, T.; ZANGERL, A. R.; BERENBAUM, M. R. Behavioral effects of carotenoid sequestration by the parsnip webworm *Depressaria partinacella*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 2707-2719, 1997.

CARVALHO, R. P. L. **Danos, flutuação populacional, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo**. 1970. 170 p. Tese de Doutorado. – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba (São Paulo).

CAZZONELLI, C. I. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. **Functional Plant Biology**, v. 38, p. 833-847, 2011.

COLEMAN, J. S.; JONES, C. G. A phyto-centric perspective of phytochemical induction by herbivores. **Phytochemical induction by herbivores**. New York: Wiley, p. 3-45, 1991.

CONCOMI, A.; SMERDON, M. J.; HOWE, G. A.; RYAN, C. A. The octadecanoid signaling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. **Nature**, v. 383, p. 826-829, 1996.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; AZEVEDO, J. Soybean seed damage by different species of stink bugs. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, n. 2, p. 145-150, 2002.

CORRÊA, B. S.; PANIZZI, A. R.; NEWMAN, G. G.; TURNIPSEED, S. G. Distribuição geográfica e abundância estacional dos principais insetos-pragas da soja e seus predadores. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 6, p. 40-50, 1977.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_07_08_59_54_boletim_graos_agosto_2014.pdf> Acesso 20 set de 2014.

CONNER, W. E.; BOADA, R.; SCHROEDER, F. C.; GONZÁLEZ, A.; MEINWALD, J.; EISNER, T. Chemical defense: bestowal of a nuptial alkaloidal garment by a male moth on its mate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, p. 14406-14411, 2000.

CORTEZ, M. G. R.; WAQUIL, J. M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento do sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, p. 407-410, 1997.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 1995, 45 p. (**Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - Circular técnica, n. 21**).

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; MATOSO, M. J. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitoide de ovos *Trichogramma*. Sete Lagoas: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 1999, 40 p. (**Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - Circular Técnica, n. 30**).

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 355-359, 1982.

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Yield impact of larval infestation of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to midwhorl stage of corn. **Journal of Economic Entomology**, v. 76, n. 5, p. 1052-1054. 1983.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. Controle biológico da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitoide de ovos de *Trichogramma pretiosum*. Sete Lagoas: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 2004, 4 p. (Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - Circular Técnica, n. 114).

CRUZ, I.; VALICENTE, F.; SANTOS, J.; WAQUIL, J.; VIANA, P. **Manual de identificação de pragas do milho e de seus principais agentes de controle biológico**. Editora: Embrapa. 2008.

DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. Pragas da soja. **Boletim de Pesquisa de Soja**, v. 12, p. 254, 2007.

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

DEWICK, P. M.; BARZ, W.; GRISBBACH, H. Biosynthesis of coumestrol in *Phaseolus aureus*. **Phytochemistry**, v. 9, n. 4, p. 775-783, 1970.

DHAUBHADEL, S. Regulation of isoflavonoid biosynthesis in soybean seeds. **Biochemistry, Chemistry and Physiology**, p. 243- 258, 2011.

DIEZ-RODRIGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 331-316, 2001.

DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, n. 3, p. 205- 211, 2002.

DOWD, P. F.; SMITH, C. M.; SPARKS, T. C. Detoxification of plant toxins by insects. **Insect Biochemistry**, v. 13, p. 453-468, 1983.

DUFFEY, S. S. Sequestration of plant natural products by insects. **Annual Review of Entomology**, v. 25, n. 1, p. 447–477, 1980.

DUSSOURD, D. E.; HARVIS, C. A.; MEINWALD, J.; EISNER, T. Paternal allocation of sequestered plant pyrrolizidine alkaloid to eggs in the danaine butterfly, *Danaus gilippus*. **Experientia**, v. 45, p. 896-898, 1989.

DYER, L. A. Tasty generalists and nasty specialists? A comparative study of antipredator mechanisms in tropical lepidopteran larvae. **Ecology**, v. 76, p. 1483-1496, 1995.

DYER, L. A. Effectiveness of caterpillar defenses against three species of invertebrate predators. **The Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 34, p. 48-68, 1997.

EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 235-264, 1986.

EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, p. 586-608, 1964.

EICHENSEER, H. MURPHY, J. B.; FELTON, G. W. Sequestration of host plant carotenoids in the larval tissues of *Helicoverpa zea*. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 311-318, 2002.

EISNER, T.; ROSSINI, C.; GONZALÉZ, A.; IYENGAR, V. K.; SIEGLER, M. V. S.; SMEDLEY, S. R. Paternal investment in egg defense. In: HILKER, M.; MEINERS, T. (Eds.) **Chemoecology of insect eggs and egg deposition**. Blackwell, Berlin, p. 91-116, 2002.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Cooperative Extension Service; Agriculture and Home Economics Experiment Station, Iowa State University of Science and Technology, p. 25-26, 1977.

FERGUSON, J. A.; MATHESIUS, U. Signaling interactions during nodule development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 22, n. 1, p. 47-72, 2003.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 501-543, 2002.

FORD, E. B. Studies on the chemistry of pigments in the Lepidoptera, with reference to their bearing on systematics. 1. The anthoxanthins. In: **Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology**. Blackwell Publishing Ltd, v. 16, n. 7-9, p. 65-90, 1941.

FRAGOSO, D. B.; SILVA, R. Z. Na soja. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, v. 94, n. 1, p. 20-22, 2007.

FUGI, C. G. Q.; LOURENÇÃO, A. L.; PARRA, J. R. P. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. **Sciencia agricola**, v. 62, n. 1, p. 31-35, 2005.

FUNICHELLO, M. **Aspectos bioecológicos de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares convencionais e transgênicas de algodoeiro**. 2012. 70 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias e Veterinárias) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal (São Paulo).

FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant defense against insect herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10242-10297, 2013.

GAHAN, L. J.; PAUCHET, Y.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **PLOS Genetics**, v. 6, n. 12, 11 p., 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES S. B.; VENDRAMIM, J. D. **Manual de Entomologia agrícola**. 2ª edição. São Paulo: CERES, 1988.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GARCIA, F. R. M. **Zoologia Agrícola: manejo ecológico de pragas**. 2ª edição. Porto Alegre: Rígel, 2002, 248 p.

GASSMANN, A. J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 147-163, 2009.

GAZZONI, D. L.; YORINORI, J. T. Manual de identificação de pragas e doenças da soja. Brasília: Embrapa SPI, 1995, 128 p. (**Embrapa SPI - Manuais de identificação de pragas e doenças, n. 1**).

GAZZONI, D. L.; HÜLSMEYER, A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Efeitos de diferentes doses de rutina e de quercetina na biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 32, n.7, p. 673-681, 1997.

GAZZONI, D. L. Efeito de populações de percevejos na produtividade, qualidade da semente e características agronômicas da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1229-1237, 1998.

GENTRY, G. L.; DYER, L. A. On the conditional nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. **Ecology**, v. 83, n. 11, p. 3108-3119, 2002.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Factors influencing the evolution of resistance. **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**, p. 157-169, 1986.

GILBERT, L. E. Coevolution and mimicry. In: FUTUYMA, D. J.; SLATKIN, M. (Eds). **Coevolution**. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, v. 1, p. 263-28, 1983.

GILMAR, D. F.; McPHERSON, R. M.; NEWSOM, L. D.; HERZOG, D. C.; WILLIAMS, C. Resistance in soybeans to the southern green stink bug. **Crop Science**, v. 22, p. 573-576, 1982.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 701-726, 1998.

GOULD, F.; BLAIR, N.; REID, M.; RENNIE, T. L.; LOPEZ, J.; MICINSKI, S. *Bacillus thuringiensis* – toxin resistance management: stable isotope assessment of alternate host use by *Helicoverpa zea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 6, p. 16581-16586, 2002.

GRAHAM, T. L. Biosynthesis and distribution of phytoestrogens and their roles in plant defense, signal transduction, and cell-to-cell signaling. **Journal of Medicinal Food**, v. 2, n. 3-4, p. 93-97, 1999.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

GRISHAM, M. P.; STERLING, W. L.; POWELL, R. D.; MORGAN, P. W. Characterization of the induction of stress ethylene synthesis in cotton caused by the cotton fleahopper (Hemiptera: Miridae) and its microorganisms. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 80, p. 411-416, 1987.

GUEDES, R. N. C.; LIMA, J. O. G; CRUZ, C. D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 31, p. 145-150, 1995.

GUILFORD, T. The evolution of aposematism. **Insect defenses: adaptive mechanisms and strategies of prey and predators**, p. 23-61, 1990.

HAGEN, K. S. Role of nutrition in insect management. **Proceedings Tall Timbers Conference on Ecological Animal Control by Habitat Manage**, v. 6, p. 221-261, 1976.

HARBORNE, J. B.; GRAYER, R. J. Flavonoids and insects. In: HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 589-618.

HARDING, J. A. Seasonal occurrence, parasitism and parasites of cabbage and soybean loopers in the lower Rio Grande Valley. **Environmental Entomology**, v. 5, n. 4, p. 672-674, 1976.

HART, S. V.; KOGAN, M.; PAXTON, J. D. Effect of soybean phytoalexins on the herbivorous insects Mexican bean beetle and soybean looper. **Journal of Chemical Ecology**, v. 9, n. 6, p. 657-672, 1983.

HARTMANN, T. Alkaloids, in herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. In: Rosenthal, G. A. & Berenbaum, M. R., eds. **The chemical participants**, 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1991. p. 79-121

HARTMANN, T.; THEURING, C.; SCHMIDT, J.; RAHIER, M.; PASTEELS, J. M. Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, n. 12, p. 1085-1095, 1999.

HEAD, G.; JACKSON, R. E.; ADAMCZYK, J.; BRADLEY, J. R.; VAN DUYN, J.; GORE, J.; HARDEE, D. D.; LEONARD, B. R.; LUTTRELL, R.; RUBERSON, J.; MULLINS, J. W.; ORTH, R. G.; SIVASUPRAMANIAM, S.; VOTH, R. Spatial and temporal variability in host use by *Helicoverpa zea* as measured by analyses of stable carbon isotope ratios and gossypol residues. **Journal of Applied Ecology**, v. 47, n. 3, p. 583-592, 2010.

HENSLEY, S. D.; NEWSOM, L. D.; CHAPIN, J. Observations on the looper complex of the noctuid subfamily Plusiinae. **Journal of Economic Entomology**, v. 57, n. 6, p. 1006-1007, 1964.

HERZOG, D. C.; TODD, J. W. Sampling velvetbean caterpillar on soybean. In: KOOGAN, M.; HERZOG, D. C. **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer, 1980, p. 107-140.

HESBACHER, S.; GIEZ, I.; EMBACHER, G.; FIEDLER, K.; MAX, W.; TRAWOOR, A.; TURK, R.; LANCE, O. L.; PROKSCH, P. Sequestration of lichen compounds by lichen-feeding members of the Arctiidae (Lepidoptera). **Journal Chemical Ecology**, v. 21, n. 12, p. 2079-2089, 1995.

HINTON, H. E. **Biology of insect eggs**. Oxford: Pergamon Press, 1981.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B.; MOSCARDI, F. Criação massal da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*. Londrina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1985, 23 p. (**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Documentos, v. 10**).

HOFFMANN-CAMPO, C. B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. 165 p. Dissertation (PHD of Department of Botany) - The University of Reading, Reading (Berkshire).

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2000, 70p. (**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Circular Técnica, v. 30**).

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

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

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; CORSO, I. C. Pragas que atacam plântulas, hastes e pecíolo da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Distrito Federal: Embrapa, 2012. p. 145-212.

HOPKINS, T. L.; AHMAD, S. A. Flavonoid wing pigments in grasshoppers. **Experientia**, v. 47, p. 1089-1091, 1991.

HUTCHISON, W. D.; BURKNESS, E. C.; MOON, R. D.; LESLIE, T.; FLEISCHER, S. J.; ABRAHAMSON, M.; HAMILTON, K. L.; STEFFEY, K. L.; GRAY, M. E.; HELLMICH, R. L.; KASTER, L. V.; HUNT, T. E.; WRIGHT, R. J.; PECINOVSKY, K.; RABAEY, T. L.; FLOOD, B. R.; RAUN, E. S. Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 222-225, 2010.

ISIDRO, R.; ALMEIDA, R. P.; PEREIRA, J. O. V. Consumo foliar de *S. frugiperda* em amendoim cultivares Tatu e CNPA BR-1. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 1, n. 1, p. 37-42, 1997.

ISMAN, M. B.; DUFFEY, S. S. Pharmacokinetics of chlorogenic acid and rutin in larvae of *Heliothis zea*. **Journal of Insect Physiology**, v. 29, n. 4, p. 295-300, 1983.

JACKSON, R. E.; BRADLEY, J.; VAN DUYN, J.; LEONARD, B. R.; ALLEN, C.; LUTTRELL, R.; ADAMCZYK, J. J. JR.; GORE, J.; HARDEE, D. D.; VOTH, R.; SIVASUPRAMANIAM, S.; MULLINS, W.; HEAD, G. Regional assessment of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations on cotton and non-cotton crop hosts. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 126, n. 2, p. 89-106, 2008.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2012**. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA): Ithaca, NY, Vol. 44, 2012.

JENSEN, R. L.; NEWSON, L. D.; GIBBENS, J. Soybean looper; effect of adult nutrition on oviposition, mating frequency and longevity. **Journal of Economic Entomology**, v. 67, n. 4, p. 467-4760, 1974.

KOGAN, M. Natural chemical in plant resistance to insects. **Iowa State Journal of Research (USA)**, v. 60, n. 4, 1986.

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

KUDOU, S.; SHIMOYAMADA, M.; IMURA, T.; UCHIDA, T.; OKUBO, K. A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), Glycitein 7-O- β -D-(6'-O-Acetyl)- Glucopyranoside. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 859-860, 1991a.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELT, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991b.

LABRADOR, J. R. **Estudio de biología y combate del gusano cogollero del maíz *Laphygma frugiperda***. 1967. 83 p. Faculdade de Agronomía - Universidad del Zulia, Maracaibo.

LAMPERT, E. C.; BOWERS, M. D. Host plant influences on iridoid glycoside sequestration of generalist and specialist caterpillars. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 10, p. 1101-1104, 2010.

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

LAZZARO, B. P.; SCEURMAN, B. K.; CLARK, A. G. Genetic basis of natural variation in *D. melanogaster* antibacterial immunity. **Science**, v. 303, p. 1873-1876, 2004.

LIN, H.; KOGAN, M. Influence of induced resistance in soybean on the development and nutrition of the soybean looper and Mexican bean beetle. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 55, n. 2, p. 131-138, 1990.

LIN, H.; KOGAN, M.; FISCHER, D. Induced resistance in soybean to the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae): comparison of inducing factors. **Environmental Entomology**, v. 19, p. 1852-1857, 1990.

LONG, B. J.; DUNN, G. M.; BOWMAN, J. S.; ROUTLEY, D. G. Relationship of hydroxamic acid content in corn and resistance to the corn leaf aphid. **Crop Science**, v. 17, n. 1, p. 55-58, 1977.

LOZOVAYA, V. V.; LYGIN, A. V.; ZERNOVA, O. V.; LI, S.; HARTMAN, G. L.; WIDHOLM, J. M. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 7-8, p. 671-679, 2004.

LOZOVAYA, V. V.; LYGIN, A. V.; ZERNOVA, O. V.; ULANOV, A. V.; LI, S.; HARTMAN, G. L.; WIDHOLM, J. M. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase. **Planta**, v. 225, n. 3, p. 665-679, 2007.

LUTTREL, R. G.; MINK, J. S. Damage to cotton structures by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **The Journal of Cotton Science**, v. 3, n. 2, p. 35-44, 1999.

MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Sciences**, v. 4, n. 1, p. 9-13, 1999.

MACHADO, V.; FIÚZA, L. M. Evolução e manejo da resistência de insetos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 38, p. 68-74, 2010.

MACLEOD, G.; AMES, J. Soy flavor and its improvement. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 219, 1988.

MALLET, J.; JORON, M. Evolution of diversity in warning color and mimicry: polymorphisms, shifting balance, and speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p. 201-233, 1999.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.
Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>> Acesso 04 jan de 2015.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 113 p. 1982.

MARKHAM, K. R. Flavones, flavonols and their glycosides. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, 1989, 552 p.

MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de lepidópteros-praga a inseticidas na cultura do algodão no Brasil. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 10, n. 3, 2006.

MASCARENHAS, R. N.; PITRE, H. N. Oviposition responses of soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to varieties and growth stages of soybeans. **Environmental Entomology**, v. 26, n. 1, p. 76-83, 1997.

MASON, L. J.; JOHNSON, S. J.; WOODRING, J. Seasonal and ontogenetic examination of the reproductive biology of *Pseudoplusia includes* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 18, n. 6, p. 980-985, 1989.

MELANGELI, C.; ROSENTHAL, G. A.; DALMAN, D. L. The biochemical basis for L-canavanine tolerance by the tobacco budworm *Heliothis virescens* (Noctuidae). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 94, p. 2255-2260, 1997.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 71-81, 2002.

MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. **Manejo integrado de pragas em lavouras plantadas com milho geneticamente modificado com gene Bt (milho Bt)**. Disponível em:
<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/milhoBT.htm> Acesso 08 jan de 2015.

MESQUITA, A. Lavoura furada. **Agro DBO**, v. 9, n. 42, p. 25-30, 2013.

MEYER-ROCHOW, V. B. Differences in ultraviolet wing patterns in the New Zealand lycaenid butterflies *Lycaena salustius*, *L. rauparaha*, and *L. feredayi* as a likely isolating mechanism. **Journal of the Royal Society of New Zealand**, v. 21, n. 2, p. 169-177, 1991.

MICHELOTTO, M.; FREITAS, R.; FINOTO, E.; MARTINS, A. L.; DUARTE, A. Milho: tecnologia protetora. **Revista Cultivar – Grandes Culturas**, nº 145, p. 36-38, 2011.

MILLAR, J. G. Liquid chromatography. In: MILLAR, J. G.; HAYNES, K. F. (Eds). **Methods in chemical ecology-Chemical methods**. Kluwer Academic Publishers, v. 1, 1998. p. 38-84

MISSÃO, M. R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. Maringá Management: **Revista de Ciências Empresariais**, v. 3, n. 1, p. 7-15, 2006.

MONSANTO. **Manejo de Resistência de Insetos**. Disponível em: <<http://www.monsanto.com/global/br/produtos/pages/manejo-de-resistencia-de-insetos.aspx>> Acesso 17 de abr de 2015.

MORAES, R. R., LOECK, A. E.; BELARMINO, L. C. Flutuação populacional de *Plusiinae* e *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 51-56, 1991.

MORAES, M. C. B.; BIRKETT, M. A.; GORDON-WEEKS, R.; SMART, L. E.; MARTIN, J. L.; PYE, B. J.; BROMILLOW, R.; POCKETT, J. A. *cis*-Jasmone induces accumulation of defence compounds in wheat *Triticum aestivum*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 9-17, 2008.

MOSCARDI, F. Soybean integrated pest management in Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 41, n. 2, p. 91-100, 1993.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Distrito Federal: Embrapa, 2012. p. 211-334.

MÜLLER, F. T. Entomological Society London 1879, xx-xxix apud MALLETT, J.; JORON, M. **Annual Review Ecology, Evolution, and Systematics**. v. 30, n. 201, 2000.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L.; FLANDERS, K.; GORE, J.; JACKSON, R.; LOPEZ, J.; ARMSTRONG, J. S.; BUNTIN, G. D.; SANSONE, C.; LEONARD, B. R. Using haplotypes to monitor the migration of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Texas and Florida. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, n. 3, p. 742-749, 2008.

NAGOSHI, R. N. Can the amount of corn acreage predict fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation levels in nearby cotton? **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 1, p. 210-218, 2009.

NAOUMKINA, M.; FARAG, M. A.; SUMNER, L. W.; TANG, Y.; LIU, C. J.; DIXON, R. A. Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, n. 46, p. 17909-17915, 2007.

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

NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 47, n. 1, p. 57-92, 2002.

OHTA, N.; KUWATA, G.; AKAHORI, H.; WATANABE, T. Isoflavonoid constituents of soybean and isolation of a new acetyl daidzin. **Journal Agricultural Biological Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1415-1419, 1979.

OJALA, K.; JULKUNEN-TIITTO, R.; LINDSTRÖM, L.; MAPPES, J. Diet affects the immune defense and life-history traits of an arctiid moth *Parasemia plantaginis*. **Evolutionary Ecology Research**, v. 7, p. 1153-1170, 2005.

OPITZ, S. E. W.; MÜLLER, C. Plant chemistry and insect sequestration. **Chemoecology**, v. 19, n. 3, p. 117-154, 2009.

ORTH, R. G., HEAD, G., MIEROWSKI, M. Determining larval host plant use by a polyphagous Lepidopteran through analysis of adult moths for plant secondary metabolites. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 6, p. 1131-1148, 2007.

PANDEY, A.; MISRA, P.; CHANDRASHEKAR, K.; TRIVEDI, P. K. Development of AtMYB12-expressing transgenic tobacco callus culture for production of rutin with biopesticidal potential. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 10, p. 1867-1876, 2012.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. São Paulo: Manole, 1991. 359 p.

PANIZZI, A. R. Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1, p. 99-122, 1997.

PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Distrito Federal: Embrapa, 2012. p. 335-420.

PAPA, G. Manejo integrado de pragas. In: PAPA, G. **O que engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. Ilha Solteira: Unesp, 2002. p. 203-231.

PEDERSEN, H. A.; KUDSK, P.; FOMSGAARD, I.S. Metabolic profiling of *Arabidopsis thaliana* reveals herbicide- and allelochemical-dependent alterations before they became apparent in plant growth. **Journal of Plant Growth Regulation**, vol. 34, p. 96-107, 2015.

PEREIRA, M. C. C. F.; CALAFIORI, M. H. Prejuízos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) na cultura do arroz (*Oryza sativa* L.). **Ecossistema**, v. 14, p. 193-196, 1989.

PLISKE, T. E.; EDGAR, J. A.; CULVENOR, C. C. J. The chemical basis of attraction of ithomiine butterflies to plants containing pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, p. 255-262, 1976.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; LARA, F. M. Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on soybean genotypes. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 1, p. 127-132p, 2003a.

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

PIUBELLI, G. C. **Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais**. 2004. 126 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba (Paraná).

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. Are chemical compounds importante for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 7, p. 1509- 1525, 2005.

POGUE, G. M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, v. 43, p. 1-202, 2002.

POULTON, E. B. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. v. 66, p. 161, 1914. apud MALCOLM, S. B. In: **Herbivores: Their intactions with secondary plant metabolites**. Vol I. Chemical Participants; ROSENTHAL, G. A.; BERENBAUM, M. R. (Eds.); San Diego: Academic Press, 251 p. 1991.

PRAÇA, L. B.; SILVA-NETO, S. P.; MONNERAT, R. G. *Spodoptera frugiperda* (J. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) Biologia, amostragem e métodos de controle. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006, 22 p. (**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Circular técnica, n. 199**).

RIBEIRO, B. M.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E.; SANTOS, J. P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 39, p. 21-31, 2003.

ROJAS, M. G.; STIPANOVIC, R. D.; WILLIAMS, H. J.; VINSON, S. B. Metabolism of gossypol by *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 21, n. 3, p. 518-526, 1992.

ROLFF, J.; SIVA-JOTHY, M. T. Invertebrate ecological immunology. **Science**, v. 301, p. 472-475, 2003.

ROSSINI, C.; GONZÁLEZ, A.; EISNER, T. Fate of an alkaloidal nuptial gift in the moth *Utetheisa ornatrix*: systemic allocation for defense of self by the receiving female. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 639-647, 2001.

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 361-380, 1987.

ROTHSCHILD, M.; VON EUW, J.; REICHSTEIN, T.; SMITH, D. A. S.; PIERRE, J. Cardenolide storage in *Danaus chrysippus* (L.) with additional notes on *D. plexippus* (L.). **Proceedings of the Royal Society**, v. 190, n. 1098, p. 1-38, 1975.

RYAN, C. A.; BISHOP, P. D.; GRAHAM, J. S.; BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Plant and fungal cell wall fragments activate the expression of proteinase inhibitor genes for plant defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 12, p. 1025-1036, 1985.

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**, v. 38, n. 1, p. 108-115, 2009.

SALVADOR, M. C. **Efeito de genótipos de soja e de flavonóides na biologia e no intestino médio de *Anticarsia gemmatalis***. 2008. 129 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal.

SALVADOR, M. C.; BOIÇA JR, A. L.; OLIVEIRA, M. C. N. de; 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, 2010.

SANDRE, S. L.; TAMMARU, T.; ESPERK, T.; JULKUNEN-TIITTO, R.; MAPPES, J. Carotenoid-based color polyphenism in a moth species: search for fitness correlatives. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 124, p. 269-277, 2007.

SANTOS, G. P.; COSENZA, G. W.; ALBINO, J. C. Biology of *Spodoptera latifascia* (Walker, 1856) (Lepidoptera: Noctuidae) on eucalyptus leaves. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 24, n. 2, p.153-155, 1980.

SANTOS, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: **Algodão: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa CPAO, 296 p. 2001.

SANTOS, L. M.; REDAELLI, L. R.; DIEFENBACH, L. M. G.; EFROM, C. F. S. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 345-350, 2004.

SANTOS, K. B.; NEVES, P. J.; MENEGUIM, A. M. Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 6, p. 903-910, 2005.

SANTOS, K. B.; NEVES, P. J.; MENEGUIM, A. M.; SANTOS, R. B.; SANTOS, W. J.; VILLAS BOAS, G.; DUMAS, V.; MARTINS, E.; PRAÇA, L. B.; QUEIROZ, P.; BERRY, C.; MONNERAT, R. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 157-163, 2009.

SAS INSTITUTE. **SAS Proprietary Software Release 6.12**. North Carolina: SAS Institute, 1996.

SCHITTKO, U.; BURGHARDT, F.; FIEDLER, K.; WRAY, V.; PROKSCH, P. Sequestration and distribution of flavonoids in the common blue butterfly *Polyommatus icarus* reared on *Trifolium repens*. **Phytochemistry**, v. 51, n.5, p. 609-614, 1999.

SCHOONHOVEN, L. M.; JERMY, T.; VAN LOON, J. J. A. **Insect-plant biology: from Physiology to Evolution**. London: Chapman & Hall, 1998.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect – Plant Biology**. New York: Oxford University Press, 2006.

SCHNEPF, E.; CRICHMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 755-806, 1998.

SCOTT, J. G.; WEN, Z. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. **Pest Management Science**, v. 57, n. 10, p. 958-967, 2001.

SCUDDER, G. G. E.; MEREDITH, J. The permeability of the midgut of three insects to cardiac glycosides. **Journal of Insect Physiology**, v. 28, n. 8, p. 689-694, 1982.

SELF, L. S.; GUTHRIE, F. E.; HODGSON, E. Adaptation of tobacco hornworms to the ingestion of nicotine. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, n. 6, p. 907-914, 1964.

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

SHEN, S. K.; DOWD, P. F. Detoxification spectrum of the cigarette beetle symbiont *Symbiotaphrina kochii* in culture. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 60, p. 51-59, 1991.

SILVA, A. G. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, M. M.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil seus parasitos e predadores: insetos, hospedeiros e inimigos naturais**. Parte 2: Tomo 1. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura. 1968, 622p.

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

SIMMONDS, M. S. J. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 245-252, 2001.

SIMMONDS, M. S. J. Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 21-30, 2003.

SMILANICH, A. M.; DYER, L. A.; CHAMBERS, J. Q.; BOWERS, M. D. Immunological cost of chemical defense and evolution of herbivore diet breadth. **Ecology Letters**, v. 12, p. 612-621, 2009a.

SMILANICH, A. M.; VARGAS, J.; DYER, L. A.; BOWERS, M. D. Effects of ingested secondary metabolites on the immune response of a polyphagous caterpillar *Grammia incorrupta*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, n. 3, p. 239-245, 2011.

SMILOWITZ, Z. Electrophoretic patterns in hemolymph protein of cabbage looper during development of the parasitoid *Hyposoter exiguae*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 66, n. 1, p. 93-99, 1973.

SOARES, J. J.; VIEIRA, R. M. *Spodoptera frugiperda* ameaça a cotonicultura brasileira. Campina Grande: Embrapa-CNPA, 1998, 5 p. (Embrapa CNPA - Comunicado Técnico, nº 96).

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; HIROSE, E. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Embrapa Soja, 2010.

SOSA-GÓMEZ, D. R. **Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos**. Disponível em:

<http://www.cnpso.embrapa.br/download/artigos/seletiv_fung.pdf> Acesso 22 jan de 2015.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Distrito Federal: Embrapa, 2012. P. 673-723.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; HIROSE, E.; ROGGIA, S. Manual de Identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Londrina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2014. **(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Documentos/Embrapa Soja, n° 269)**.

SPARKS, A. N. A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, v. 62, p. 82-87, 1979.

STAMP, N. E.; SKROBOLA, K. L. Failure to avoid rutin diets results in altered food utilization and reduced growth rate of *Manduca sexta* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 68, n. 2, p. 127-142, 1993.

STEWART, C. N.; ADANG, M. J.; ALL, J. N.; BOERMA, H. R.; CARDINEAUX, G.; TUCKER, D.; PARROT, W. A. Genetic transformation recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIA (c) gene. **Plant Physiology**, v. 112, n. 1, p. 121-129, 1996.

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

STOUT, M. J.; WORKMAN, J.; DUFFEY, S. S. Differential induction of tomato foliar proteins by arthropod herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 10, p. 2575-2594, 1994.

TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T. J.; MORIN, S.; SISTERTON, M. S.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 4, p. 1031-1038, 2003.

TABASHNIK, B. E.; VAN RENSBURG, J. B. J.; CARRIÈRE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory and data. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 6, p. 2011-2025, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, 5ª edição. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2010.

TAKAHASHI, M. K.; NAKANO, O.; ORSI, J. R. Avaliação de danos causados por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultura de trigo. **Solo**, v. 72, p. 43-44, 1980.

THOMSON, D. L. The pigments of butterflies wings: *Melanargia galatea*. **Biochemical Journal**, v. 20, n. 1, p. 73-75, 1926.

TRIGO, J. R.; BROWN, K. S.; WITTE, L.; HARTMANN, T.; ERNST, L.; BARATA, L. E. S. Pyrrolizidine alkaloids: different acquisition and use patterns in Apocynaceae and Solanaceae feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). **Biological Journal of the Linneans Society**, v. 58, p. 99-123, 1996.

TRIGO, J. R. The chemistry of antipredator defense by secondary compounds in neotropical 95carus95tera: facts, perspectives and caveats. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 6, p. 551-561, 2000.

TURLINGS, T. C. J.; TUMLINSON, J. H.; LEWIS, W. J. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1251-1253, 1990.

TURNER, J. R. G. Mimicry: the palatability spectrum and its consequences. In: VANE-WRIGHT, R. I.; ACKERY, P. R. (Eds.). In: **The biology of butterflies** (Symposia of the Royal Entomological Society of London, 11). London: Academic Press, 1984. P. 141-161.

TURNIPSEED, S. G.; KOGAN, M. Soybean Entomology. **Annual Review of Entomology**, v. 21, n. 1, p. 247-282, 1976.

URZÚA, A.; RODRIGUEZ, R.; CASSELS, B. Fate of ingested aristolochic acids in *Battus archidamas*. **Biochemical System Ecology**, v. 15, p. 687-689, 1987.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSENS, S.; BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; MONTAGU, M. V.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, n. 6125, p. 33-37, 1987.

VAN OOIK, T.; PAUSIO, S.; RANTALA, M. J. Direct effects of heavy metal pollution on the immune function of a geometrid moth, *Epirrita autumnata*. **Chemosphere**, v. 71, p. 1840-1844, 2008.

VÁZQUEZ, W. R. C. **Biologia comparada de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em dietas naturais e artificiais e efeito de um vírus de poliedrose nuclear na sua mortalidade e no consumo da área foliar da soja**. Piracicaba, SP (Brazil), 1988.

VELOSO, V. R. S.; NAKANO, O. Determinação do número de estruturas frutíferas do algodoeiro danificadas por lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em diferentes épocas de desenvolvimento da cultura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 13, n. 1, p. 117-126, 1983.

VENCL, F. V.; NOGUEIRA DE AS, F.; ALLEN, B. J.; WINDSOR, D. M.; FUTUYMA, D. J. Dietary specialization influences the efficacy of larval tortoise beetle shield defenses. **Oecologia**, v. 145, p. 404-414, 2005.

VILELA, P. S., MOREIRA, A. C. S. D. O. Complexo Soja e o Mercado de Energia no Brasil. **Assessoria Técnica – ASTEC/FAEMG**, 2007.

VIVAN, L. As espécies inimigas da soja. **A Granja**, v. 66, n. 743, p. 40-42, 2010.

WAQUIL, J. M.; VILLELA, M. F.; FOSTER, J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (Bt) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 3, p. 1-11, 2010.

WALKER, D. R.; ALL, J. N.; MCPHERSON, R. M.; BOERMA, H. R.; PARROTT, W. A. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 3, p. 613-622, 2000.

WEBER, G.; OSWALD, S.; ZÖLLNER, U. Die Wirtseignung von Rapssorten unterschiedlichen Glucosinolatgehaltes für *Brevicoryne brassicae* (L.) und *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Zeitschr Pflanzenkrankh Pflanzenschutz**, v. 93, p. 113-124, 1986.

WHEELER, G. S.; SLANSKY, F.; YU, S. J. Food consumption, utilization and detoxification enzyme activity of larvae of three polyphagous noctuid moth species when fed the botanical insecticide rotenone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 98, p. 225-239, 2001.

WIESEN, B.; KRUG, E.; FIEDLER, K.; WRAY, V.; PROKSCH, P. Sequestration of host-plant-derived flavonoids by lycaenid butterfly *Polyommatus 97carus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 10, p. 2523-2538, 1994.

WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B. Isoflavonoids. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1989, p 421-449.

WILLIAMS, J. L.; ELLERS-KIRK, C.; ORTH, R. G.; GASSMANN, A. J.; HEAD, G.; TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y. Fitness cost of resistance to Bt cotton linked with increased gossypol content in pink bollworm larvae. **PLOS One**, v. 6, n. 6, 9 p., 2011.

WILSON, A. Flavonoid pigments of butterflies in the genus *Melanargia*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1685-1691, 1985.

WILSON, A. Flavonoid pigments in Swallowtail butterflies. **Phytochemistry**, v. 25, n. 6, p. 1309-1313, 1986.

WILSON, A. Flavonoid pigments in chalkhill blue (*Lysandra coridon* Poda) and other lycaenid butterflies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, n. 3, p. 473-493, 1987.

WISCH, L. N. **Flutuação populacional dos principais noctuídeos e distribuição vertical de ovos e lagartas na cultura da soja**. 2011. 85 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola de Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná.

WITTSTOCK, U.; AGERBIRK, N.; STAUBER, E. J.; OLSEN, C. E.; HIPPLER, M.; MITCHELLOLDS, T.; GERSHENZON, J.; VOGEL, H. Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, p. 4859-4864, 2004.

WU, K.; GUO, Y.; GAO, S. Evaluation of the natural refuge function for *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) within *Bacillus thuringiensis* transgenic cotton growing areas in North China. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 4, p. 832-837, 2002.

YORINORI, J. T. Ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*): ocorrência no Brasil e estratégias de manejo. In: **Encontro Brasileiro sobre Doenças da cultura da soja**, n° 2, 2002, Passo Fundo: Aldeia Norte, 2002. P. 47-54.

YU, S. J. Insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, p. 91-94, 1991.

YU, S. J. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 675-682, 1992.

YU, S. J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 2, p. 135-142, 2006.

ZAGROBELNY, M.; BAK, S.; EKSTROM, C.T.; OLSEN, C.E.; MØLLER, B. L. The cyanogenic glucoside composition of *Zygaena filipendulae* (Lepidoptera: Zygaenidae) as effected by feeding on wild-type and transgenic lotus populations with variable cyanogenic glucoside profiles. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 10-18, 2007a.

ZAGROBELNY, M.; OLSEN, C. E.; BAK, S.; MØLLER, B. L. Intimate roles for cyanogenic glucosides in the life cycle of *Zygaena filipendulae* (Lepidoptera: Zygaenidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 1189-1197, 2007b.

ZAGROBELNY, M.; SCHEIBYE-ALSING, K.; JENSEN, N. B.; MØLLER, B. L.; GORODKIN, J.; BAK, S. 454 pyrosequencing based transcriptome analysis of *Zygaena filipendulae* with focus on genes involved in biosynthesis of cyanogenic glucosides. **BMC Genomics**, v. 10, 2009.

ZAGROBELNY, M.; MØLLER, B. L. Cyanogenic glucosides in the biological warfare between plants and insects: the Burnet moth-Birdsfoot trefoil model system. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1585-1592, 2011.

ZAGROBELNY, M.; MOTAWIE, M. S.; OLSEN, C. E.; BAK, S.; MØLLER, B. L. Male to female transfer of 5-hydroxytryptophan glucoside during mating in *Zygaena filipendulae* (Lepidoptera). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 1037-1044, 2013.

ZAGROBELNY, M.; OLSEN, C. E.; PENTZOLD, S.; FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; JØRGENSEN, K.; BAK, S.; MØLLER, B. L.; MOTAWIA, M. S. Sequestration, tissue distribution and developmental transmission of cyanogenic glucosides in a specialist insect herbivore. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 44, p. 44-53, 2014.

ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T.; MODESTO, E. C.; ALCADE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; SILVA, D. C.; SILVA, K. T.; FAUSTINO, J. O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 937-943, 2001.

ZHOU, Y. Y.; LUO, S. H.; YI, T. S.; LI, C. H.; LUO, Q.; HUA, J.; LIU, Y.; LI, S. H. Secondary Metabolites from *Glycine* soja and their growth inhibitory effect against *Spodoptera litura*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 6004–6010, 2011.

ZUNICA, G. E.; ARGANDOÑA, V. H.; NIEMEYER, H. M.; CORCUERA, L. J. Hidroxamic acid content in wild and cultivated Gramineae. **Phytochemistry**, v. 22, n. 12, p. 2665-2668, 1983.