



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EVERSON TARTARI KUNZ

**“CONTROLE GENÉTICO DA PRODUÇÃO DO FLAVONÓIDE
RUTINA EM SOJA COM CARACTERÍSTICA DE
RESISTÊNCIA A INSETOS DESFOLHADORES”**

Londrina
2008



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EVERSON TARTARI KUNZ

**“CONTROLE GENÉTICO DA PRODUÇÃO DO FLAVONÓIDE
RUTINA EM SOJA COM CARACTERÍSTICA DE
RESISTÊNCIA A INSETOS DESFOLHADORES”**

EVERSON TARTARI KUNZ

**“CONTROLE GENÉTICO DA PRODUÇÃO DO FLAVONÓIDE
RUTINA EM SOJA COM CARACTERÍSTICA DE RESISTÊNCIA
A INSETOS DESFOLHADORES”**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título Mestre.

Orientador: Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias
Co-orientador: Dr^a. Clara Beatriz Hoffmann-Campo

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

K96c Kunz, Everson Tartari.

Controle genético da produção do flavonóide rutina em soja com característica de resistência a insetos desfolhadores / Everson Tartari Kunz. – Londrina, 2008.
68f. : il.

Orientador: Carlos Alberto Arrabal Arias.

Co-orientador: Clara Beatriz Hoffmann-Campo.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Genética vegetal – Teses. 2. Soja – Flavonóides – Teses. 3. Lagarta da soja – Controle biológico – Teses. I. Arias, Carlos Alberto Arrabal. III. Hoffmann-Campo, Clara Beatriz. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônômico do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 581.169

EVERSON TARTARI KUNZ

**“CONTROLE GENÉTICO DA PRODUÇÃO DO FLAVONÓIDE RUTINA EM
SOJA COM CARACTERÍSTICA DE RESISTÊNCIA
A INSETOS DESFOLHADORES”**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias
Embrapa Soja – Londrina-Pr

Dr. José Francisco Ferraz de Toledo
Embrapa Soja – Londrina-Pr

Prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira
UEL – Londrina-Pr

Londrina
2008

Aos meus mestres eternos,

Laury Luiz Kunz e Dirce Tartari Kunz

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido concluir esse trabalho, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus irmãos, Marcelo e Eduardo, pelos papos descontraídos.

Ao Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias, pela preciosa orientação, dedicação e exemplo de profissionalismo.

À Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo, pela valiosa coorientação e agradável atenção dada durante todo o mestrado.

Ao Dr. José Francisco Ferraz de Toledo, pelo apoio e sugestões.

Ao Técnico João Alves Filho, pela colaboração.

Ao Dr. Josué Maldonado Ferreira, pelos ensinamentos, sugestões e pela amizade.

À secretária do curso de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Sueli, pela atenção e disponibilidade.

À coordenação do curso de Mestrado em Genética e Biologia Molecular.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelos ensinamentos.

À Universidade Estadual de Londrina – UEL, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Soja – Embrapa Soja, pelo auxílio e disponibilidade de realização do trabalho.

Aos amigos da turma “Esquecida” do mestrado pelos momentos felizes.

À colega Ilara, um agradecimento especial pelo imensurável apoio no início do curso.

Às colegas Jacqueline Enequio e Raquel Barbosa, pela grande amizade.

Aos colegas de Quantitativa, pela amizade.

Aos colegas do laboratório: Sergio, José, Mariana, Débora, Tatiana, Maira, Jaqueline e Léo Áquila, pela amizade.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

KUNZ, Everson Tartari. **Controle genético da produção do flavonoide rutina em soja com característica de resistência a insetos desfolhadores**. 2008. 61f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

A soja é, atualmente, o principal produto da agricultura brasileira, colocando o Brasil em segundo lugar no cenário mundial em produção e exportação de grãos. No entanto, altas populações de insetos, como a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis*, podem causar perdas significativas no rendimento dessa cultura. A maioria das plantas, selvagens ou cultivadas, possui alguma resistência a pragas e que, em geral, envolvem metabólitos secundários, como os flavonóides. A rutina é um dos flavonóides identificados em folhas de genótipos de soja resistentes a insetos, como a PI 227687 e 'IAC 100'. Esse composto pode causar efeitos negativos no comportamento e biologia de lagartas desfolhadoras, como a *A. gemmatalis*. Diante disso, o entendimento genético de como esse composto químico é ativado e herdado pode acelerar os programas de melhoramento para o desenvolvimento de variedades resistentes. O objetivo principal desse trabalho foi estudar o controle genético da produção do flavonoide rutina em soja. Dois ensaios foram realizados em casa-de-vegetação. No primeiro foram utilizados os parentais 'IAC 100' e 'Conquista', respectivamente, resistente e suscetível, apresentando nas folhas concentração relativamente alta e média de rutina. No segundo ensaio, utilizou-se o mesmo parental resistente, 'IAC 100', e 'BR 16', considerado suscetível e que não apresenta rutina nas folhas. Os parentais e a geração F₆ dos cruzamentos foram avaliados quanto à concentração de rutina nas folhas através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A distribuição de frequência nos dois ensaios indicou distribuição contínua não evidenciando a presença de genes maiores. Quanto aos modelos genéticos ajustados às médias nos dois ensaios, apenas os efeitos aditivos [*d*] foram significativos. A variância genética aditiva (D) e a variância devido à interação genótipo x microambiente (E₁ e E₂) foram incluídas entre os componentes do modelo de variância ajustado para o primeiro ensaio. Já no segundo ensaio, verificou-se significância apenas de E₁ e E₂. As estimativas de herdabilidade no sentido restrito variaram de 23%, ao nível de indivíduo, a 53% ao nível de média de família. Portanto, conclui-se que o caráter em questão é poligênico, com presença de efeitos genéticos aditivos. Assim sendo, a seleção de plantas superiores é mais efetiva quando baseado em médias de famílias. O cruzamento 'IAC 100' x 'Conquista' mostrou-se ser o mais promissor, tanto para o estudo quanto para o desenvolvimento de genótipos de soja com altas concentrações de rutina nas folhas e, conseqüentemente, resistentes à lagarta-da-soja.

Palavras chave: *Glycine Max*. *Anticarsia gemmatalis*. Componente genético aditivo. IAC 100.

KUNZ, Everson Tartari. **Controle genético da produção do flavonoide rutina em soja com característica de resistência a insetos desfolhadores**. 2008. 61f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The soybean is, currently, the main Brazilian crop product, ranking Brazil in second place in world-wide scenary of production and exportation of agricultural products. However, high insect population, as velvetbean caterpillars *Anticarsia gemmatalis*, can cause significant soybean crop yield losses. The majority of the plants, wild or cultivated, possess some pest resistance that, in general, is caused by secondary metabolites, as the flavonoids. Rutin is a constitutive flavonoid identified in leaves of insect resistant soybean genotypes, as PI 227687 and 'IAC 100'. This compound can cause negative effects on the behavior and biological aspects of the defoliator caterpillars, as the *A. gemmatalis*. Consequently, the knowledge of the mechanism of chemical activation and inheritance of such chemical compound can speed up programs for development of insect resistant cultivars. The main objective of this work was to study the genetic control of rutin production in soybean leaves. Two assays were carried out in greenhouse. In the first assay, it was used the parentals IAC 100 and Conquista, respectively considered insect resistance and susceptible, containing in their leaves relatively high and medium rutin concentration. In the second assay, the same resistance parental, IAC 100, and the susceptible parental BR 16, without rutin in its leaves were used. The parental and F₆ generation of the crosses regarding rutin concentration were evaluated in leaves by using high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. The distribution of frequency in both trials indicated continuous distribution, without evidence of the presence of major genes. In regarding to genetic models fitted to the mean in the two assays, only the additive effect [d] was significant. The additive genetic variance (D) and the variance of genotype x microenvironment interaction (E₁ and E₂) were included among the components of variance model fitted to the first assay. In the second assay, only E₁ and E₂ were significant. The estimative of narrow sense heritability varied from 23%, at individual level to 53% at family level. Thus, it is possible to conclude that rutin concentration is a polygenic character, with the presence of genetic additive effects, and the selection of superior lines in leaves is more effective when based on family averages. The cross of IAC 100 x Conquista showed more promising either for studies or for the development of soybean genotypes containing, in their leaves, high rutin concentration, and consequently soybean caterpillar resistant.

Key words: *Glycine max.* *Anticarsia gemmatalis*. Additive genetic component. IAC 100.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 A SOJA	12
2.2 SOJA NA ECONOMIA MUNDIAL	13
2.3 SOJA NA ECONOMIA BRASILEIRA	13
2.4 <i>ANTICARSIA GEMMATALIS</i> HUBNER, 1818 (LEP.: NOCTUIDAE).....	14
2.4.1 Histórico, Distribuição Geográfica e Plantas Hospedeiras	14
2.4.2 Aspectos Biológicos	15
2.5 RESISTÊNCIA VEGETAL.....	17
2.6 RESISTÊNCIA DE SOJA A INSETOS.....	19
2.7 FONTES DE RESISTÊNCIA A INSETOS EM SOJA.....	20
2.8 RUTINA	22
2.9 GENÉTICA DA RESISTÊNCIA EM SOJA.....	24
3 OBJETIVOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 GENÓTIPOS UTILIZADOS	28
4.2 MONTAGEM DO EXPERIMENTO	30
4.2.1 Híbridos e Avanços de Gerações	30
4.2.2 Ensaios.....	31
4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA.....	32
4.3.1 Preparo das amostras	32
4.3.2 Quantificação – Análise cromatográfica	32
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICO-GENÉTICAS	33
4.4.1 Componentes Genéticos de Média	34
4.4.2 Componentes Genéticos e Ambientais de Variância	36
4.4.3 Coeficiente de Herdabilidade	39
5 ARTIGO	40

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....53

REFERÊNCIAS.....54

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tem grande importância econômica e social, não somente pela grande área na qual ela é cultivada, mas por todo o complexo industrial que gira em torno do seu cultivo. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de farelo e grãos de soja, sendo este o principal produto cultivado e o de maior importância econômica no país, com uma produção de 60,07 milhões de toneladas na safra 2007/08 em uma área de 21,32 milhões de hectares (CONAB, 2008).

Em termos percentuais, a cultura da soja foi a que mais cresceu, em área plantada, nos últimos 35 anos. Esse aumento da área cultivada se deve, entre outros fatores, ao preço do produto estar em alta, ao surgimento de um sistema cooperativista dinâmico e eficiente, que apoiou fortemente a produção, a industrialização e a comercialização das safras e ao estabelecimento de uma bem articulada rede de pesquisa de soja envolvendo os poderes públicos, apoiada financeiramente pela indústria privada.

A expansão da soja dentro da fronteira agrícola e, principalmente, fora dela, com frequência envolve áreas degradadas e até inaptas para a exploração econômica. Percebe-se que, ao longo dos anos, o uso restrito das tecnologias disponíveis tem provocado o agravamento de problemas antigos. Além disso, novos problemas surgem, exigindo investimentos na pesquisa para gerar novas tecnologias.

Um grande problema são os insetos pragas. Dentre as principais pragas que tem provocado quebras no rendimento da soja, a lagarta-da-soja [*Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)], destaca-se como a principal praga desfolhadora da soja, nas regiões tropical e subtropical. A *A. gemmatalis* provoca perdas quantitativas anuais estimadas em 11% da produção mundial (BENTO, 1999).

Para o controle dessa espécie o controle químico continua sendo a técnica preferencialmente usada pelos sojicultores brasileiros, sendo que o uso indiscriminado de agroquímicos pode trazer consequências graves ao meio ambiente, além de onerar a cultura. No entanto, a preocupação cada vez maior da sociedade em relação às questões ambientais e de saúde, e o incremento

significativo de mercados específicos, como o da soja orgânica, faz com que a utilização de cultivares resistentes seja apontada como a solução mais racional para o controle de insetos, sendo essa atividade mantida por alguns programas públicos de melhoramento.

O uso de cultivares resistentes a insetos integra-se harmonicamente aos programas de manejo integrado de insetos (MIP), uma vez que é seguro atuando em qualquer nível de infestação, além de apresentar vantagens também em relação ao custo, pois esse fator já está embutido nas sementes e, com isso, não apresenta custos adicionais.

Para o desenvolvimento de genótipos de soja resistentes a insetos é fundamental o entendimento dos mecanismos de resistência, sendo que a maioria das plantas, selvagens ou cultivadas, possui alguma resistência à pragas (KOGAN, 1986) e que, em geral, envolvem metabólitos secundários (KUBO & HANKE, 1986).

Sendo assim, se as plantas produzem substâncias capazes de afetar negativamente parâmetros vitais e comportamentais de insetos e microrganismos, então essas substâncias poderão ser incorporadas a cultivares que passarão a apresentar a característica de resistência, culminando com a redução do uso de agrotóxicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A SOJA

A soja é um membro da família das Leguminosas (Fabaceae) e é umas das oleaginosas mais importantes do mundo.

A soja que hoje é cultivada é muito diferente dos seus ancestrais: plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do Rio Yangtse, na China (TECNOLOGIAS, 2002). As plantas cultivadas são anuais, tem caule ereto, com grande diversidade quanto ao ciclo de vida, variando de 70 dias (plantas mais precoces) até 200 dias (plantas mais tardia). O ciclo da planta pode ser dividido em duas fases: a fase vegetativa (VE, VC, V1, V2, V3, Vn) que se caracteriza pela emergência da plântula até a abertura das primeiras flores e a fase reprodutiva (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8) que compreende o período do início da floração até a maturação (FEHR et al., 1971).

A cultura da soja é exigente quanto à disponibilidade de água principalmente em dois períodos de desenvolvimento: na germinação-emergência, quando tanto o excesso quanto o déficit de água são prejudiciais á obtenção de uma boa uniformidade de plantas; e na floração-enchimento de grãos, quando ocorre o máximo de exigência hídrica (TECNOLOGIAS, 2002).

A adaptação de diferentes cultivares a determinadas regiões depende das exigências hídricas, térmicas e fotoperiódicas. A soja melhor se adapta a temperaturas entre 20°C e 30°C, sendo a floração induzida com temperatura acima de 13°C. Cada cultivar possui seu fotoperíodo crítico, acima do qual o florescimento é atrasado e por isso a soja é considerada planta de dia curto. Então, a soja precisa de uma duração de noite maior que o dia para iniciar o processo de floração (TECNOLOGIAS, 2002).

Segundo Pascale (1969), existe uma relação inversa entre a temperatura média e o número de dias necessários para a floração. Dessa forma, temperaturas mais baixas causam aumento do período vegetativo ou atraso no florescimento.

2.2 SOJA NA ECONOMIA MUNDIAL

A produção mundial de soja está concentrada, principalmente, na Argentina, no Brasil e nos Estados Unidos. Este último ocupa o primeiro lugar na produção (36%) e nas vendas do grão para o exterior (25,7%). Na safra 2007/2008, a produção de soja norte-americana foi de 70,36 milhões de toneladas (USDA, 2008).

A produção mundial de soja, na safra 2007/08, segundo a USDA (2008), situou-se em 218,80 milhões de toneladas, 7,51% a menos em relação a anterior (236,56 milhões), numa área com cerca de 90,53 milhões de hectares. Isso devido à redução na safra americana para 70,36 milhões de toneladas (menos 19%), apesar do aumento de 2% na produção sul-americana, para 117,1 milhões de toneladas. As perspectivas são que, na safra 2016/17, a produção mundial de soja alcance 279,7 milhões de toneladas (+23,3% sobre a safra 2006/2007). A produção tornar-se-á mais concentrada, sendo que em 2016/17, os três maiores produtores (Argentina, Brasil e Estados Unidos) representarão 83% da produção mundial (AGE, 2008).

2.3 SOJA NA ECONOMIA BRASILEIRA

A soja chegou ao Brasil via Estados Unidos, em 1882, trazida pelo professor Gustavo D'utra da Escola Agrícola da Bahia, que fez a primeira referência à planta no Brasil. Apenas em 1940, a soja começou a ser cultivada comercialmente. Os pioneiros nesse processo foram os gaúchos.

Somente na década de 70 a oleaginosa passou a ter representatividade na agricultura brasileira, passando a figurar entre os principais produtos capazes de gerar divisas ao país, em termos de exportação, e tornando-se, a partir de então, fator decisivo ao equilíbrio da balança comercial (BOLETIM, 2007).

Nos anos 60, as lavouras comerciais estavam restritas em latitudes entre 30°S e 20°S, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Hoje, graças ao melhoramento genético realizado por

pesquisadores brasileiros, a soja pode ser cultivada em latitudes menores de 20°S, na região equatorial, onde o fotoperíodo é menor que o das regiões de latitudes mais altas (KIIHL et al., 1989 apud MIRANDA, 2005).

A produção nacional de soja, safra 2007/08, foi estimada em 60,07 milhões de toneladas, superior à safra passada em 2,9% (1,68 milhões de toneladas). Isso representa 42,02% da safra nacional de grãos. O referido aumento foi motivado pelo incremento de 2,6% (539,5 mil hectares) na área cultivada, impulsionado pelos bons preços do produto e a expectativa do aumento da demanda no mercado externo à época da implantação da cultura, aliados às boas condições climáticas durante todo ciclo da soja (CONAB, 2008).

Sendo atualmente o segundo maior produtor mundial de soja, atrás apenas dos Estados Unidos, as projeções apontam para que a produção do grão no país deva atingir 75,3 milhões nos próximos 10 anos, sendo que as exportações serão 40% maiores. Como o Brasil é o único produtor mundial com potencial de expandir significativamente a sua área total de cultivo, existem perspectivas para liderar o mercado mundial (CONGRESSO..., 2006). Assim, o Brasil vai acompanhar a tendência de crescimento do mercado mundial, cujas exportações globais devem saltar de 64,1 milhões para 85 milhões de toneladas no decorrer dos próximos 10 anos (ABIN, 2008).

No contexto das grandes culturas produtoras de grãos, a soja foi a que mais cresceu em termos percentuais nos últimos 35 anos, tanto no Brasil, quanto no mundo. Os ótimos resultados do agronegócio de soja Brasileiro podem ser atribuídos às sofisticadas técnicas de cultivo aplicadas para a soja no país, que é resultado dos esforços realizados por várias instituições de pesquisa brasileiras. No entanto, o destaque especial é dado aos programas de melhoramento genético de soja do Brasil, que disponibilizam, atualmente, centenas de cultivares aos produtores.

2.4 *ANTICARSIA GEMMATALIS* HUBNER, 1818 (LEP.: NOCTUIDAE)

2.4.1 Histórico, Distribuição Geográfica e Plantas Hospedeiras

As perdas médias causadas por insetos, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação (FAO), chegam a 14% da produção agrícola mundial. No Brasil, a perda de produção devido ao ataque de insetos é de 7,1%, em média, oscilando entre 2% e 30%. Estes dados de perdas representam algo em torno de US\$ 2,2 bilhões de dólares ao ano (BENTO, 1999).

No Brasil, a *A. gemmatalis*, conhecida popularmente no Brasil por “lagarta-da-soja”, é uma das principais pragas desfolhadoras da cultura da soja (OLIVEIRA et al., 1993), acarretando grandes prejuízos para essa cultura (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

A origem de *A. gemmatalis* é referida como sendo das regiões tropical e subtropical devido a sua incapacidade de passar o inverno nas regiões temperadas mais frescas (TURNIPSEED; KOGAN, 1976).

Sua presença se estende desde 40° N nos EUA até 39° S na Argentina, sendo que, entre esses extremos, existe similaridade genética entre as populações dessa praga, indicando migração (SOSA-GÓMEZ, 2004). Essa praga costuma atacar as lavouras a partir de novembro, nas regiões setentrionais, e a partir de dezembro no Sul do País, permanecendo até março, podendo causar até 100% de desfolhamento (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Apesar de ser considerada primariamente uma praga de leguminosas, foram registrados surtos em algodoeiro (HINDS; OSTERBERGER, 1931), alfafa (ELLISOR; GRAHAM, 1937), pastagens (WILLE, 1943), arroz (TARRAGÓ et al., 1977) e trigo (MOSCARDI, 1979). Além disso, Herzog e Tod (1980), conduziram estudos ecológicos nos Estados Unidos, com o objetivo de gerar as bases para o estabelecimento de programas de controle integrado, e sugeriram vários hospedeiros vegetais, sendo 38 espécies de leguminosas e mais 5 espécies pertencentes às famílias Begoniaceae, Gramineae e Malvaceae.

2.4.2 Aspectos Biológicos

Em meados do século passado, os primeiros estudos buscando o conhecimento sobre a biologia da *A. gemmatalis*, foram desenvolvidos por Watson (1916), apud Fugi (2003) em folhas de mucuna-aña, *Stizolobium deeringianum*

(Bart). Este autor, em condições de campo, observou que os ovos são depositados isolados, geralmente na face inferior das folhas e, menos freqüente, nas hastes e pecíolos.

A oviposição e o acasalamento em *A. gemmatalis* ocorrem à noite, começando a partir do terceiro dia após a emergência da fêmea, com um pico no quinto dia, após a emergência. Os ovos, cuja cor é verde-claro, assim que depositados podem se tornar acinzentados com o passar do tempo e, posteriormente, marrom-escuros. Próximo à eclosão das larvas, são depositados isoladamente, na parte inferior das folhas, no caule, nos ramos e nos pecíolos, com maior concentração na parte inferior das plantas, sendo que a postura se estende até o 13º dia, tendo capacidade para depositar até 1000 ovos (HOFFMANN-CAMPO et al., 2005).

As lagartas dessa espécie podem apresentar coloração totalmente verdes, pardo-avermelhada ou preta, com estrias longitudinais brancas sobre o dorso e são caracterizadas pela presença de cinco pares de falsas pernas abnominais. Já a mariposa possui uma coloração cinza, marrom ou bege, apresentando, na maioria das vezes, uma listra transversal escura ao longo das asas, unindo as pontas do primeiro par de asas (HOFFMANN-CAMPO et al., 2005).

O ciclo de vida da *A. gemmatalis* tem duração média de 36 dias. A duração média de cada fase do desenvolvimento do inseto é: ovo 3 dias; período larval 12 dias; pupa 10 dias; e adulto 11 dias, podendo variar muito de acordo com a temperatura, variedade de soja, local e umidade (MAGRINI et al., 1999).

As lagartas locomovem-se medindo palmos e durante essa fase (fase de “fio”) as lagartas raspam o parênquima foliar e só a partir do terceiro ínstar conseguem perfurar a folha, reduzindo a área foliar e diminuindo a taxa fotossintética, sendo que, quando a lagarta pára de se alimentar, no último ínstar, ela entra na fase de pré-pupa. Quando a lagarta empupa no solo, sua coloração é verde-clara, tornando-se, posteriormente, marrom escura e brilhante e, após essa fase emergem as mariposas (BOLETIM, 2007).

2.5 RESISTÊNCIA VEGETAL

Segundo Painter (1951), a resistência é definida como sendo a soma relativa de qualidades hereditárias que a planta possui, a qual influencia o resultado do grau de dano causado pelo inseto, ou seja, representa a habilidade de uma cultivar em alcançar uma maior produtividade, de boa qualidade, do que outros cultivares sob mesmo nível populacional do inseto.

A interação planta-inseto é dinâmica e está em contínua variação e mudança. As plantas encontram-se, na natureza, expostas em todos os estádios do seu ciclo de vida a parasitas e predadores que estabelecem contato com seus tecidos. A resposta da planta à herbivoria pode reduzir a preferência e a performance de uma dada espécie de herbívoro, aumentando a capacidade de se defender das folhas ainda não atacadas bem como de plantas vizinhas, deixando-as aptas a se defenderem caso um ataque aconteça (AGRAWAL, 2000). Essa resposta ao ataque de insetos ocorre através de diversos mecanismos que incluem barreiras químicas, pela indução de proteínas defensivas (HARUTA et al., 2001); liberação de voláteis que atraem predadores de insetos herbívoros (BIRKETT et al., 2000) e metabólitos secundários (BALDWIN, 2001), barreiras morfológicas e físicas, pelo aumento na densidade de tricomas (FORDYCE; AGRAWAL, 2001).

Os mecanismos de defesa estão presentes em todas as plantas, sendo que, segundo Kogan (1986), a maioria das plantas vivas, selvagens ou cultivadas possuem algum grau de resistência a insetos. Para Kogan (1982), as barreiras físico/morfológicas e químicas, além de interferirem no processo de seleção do hospedeiro, ainda apresentam importante papel na interação planta-inseto, já que os insetos filófagos possuem um padrão de preferência consistente a partir do momento em que podem fazer a escolha do alimento.

Considerando que existam barreiras físicas, morfológicas entre outras, que determinem a resistência de plantas a insetos, a resistência ao ataque destes é devida principalmente aos químicos presentes na planta hospedeira (HOFFMANN-CAMPO et al. 1994; KUBO; HANKE, 1986).

Segundo Harborne (1993) os compostos químicos das plantas podem ser classificados em nitrogenados, aminoácidos não-proteicos, glicosídeos cianogênicos, alcalóides glicosilados, peptídeos e proteínas e toxinas não

nitrogenadas como os iridóides, lactonas sesquiterpênicas, glicosídeos cardiotônicos, saponinas, furanocumarinas, quinonas, poliacetilenos, aflatoxinas e flavonóides. Em concentrações apropriadas, estas substâncias podem repelir todos os tipos de herbívoros.

Dentre as substâncias conhecidas de metabólitos secundários (substâncias aleloquímicas), flavonóides é o grupo mais vasto nas plantas e o mais diversificado biológica e quimicamente (TREUTTER, 2006), sendo que a função dos aleloquímicos ainda não foi bem definida (KOGAN, 1986). Entretanto, segundo Hoffmann-Campo et al. (2001); Thoison et al. (2004) e Chen et al. (2004), eles possuem diversos efeitos fisiológicos (pré-ingestivas) e comportamentais (pós-ingestivas) sobre os insetos. Yan et al. (2008) relata que os metabólitos secundários desempenham um papel essencial em muitas plantas como resposta ao ataque de insetos, e que vários genes associados com a síntese desses químicos, e que podem ser usados contra predadores ou apenas como antioxidantes, foram diferencialmente expressos na planta atacada por inseto.

A defesa relacionada a flavonóides pode ser dividida em dois grupos: compostos constitutivos ou pré-formados e compostos induzidos. Compostos constitutivos são sintetizados durante o desenvolvimento normal da planta e armazenados em sítios estratégicos na planta, mantendo um nível constante. Já os induzidos, são sintetizados em resposta a injúrias físicas, infecções, ou stress, podendo ser produzidos constitutivamente, mas aumentados na presença de diversos tipos de stress (KOGAN, 1986; TREUTTER, 2006).

Os flavonóides representam a classe mais comum e mais bem estudada do reino vegetal, ocorrendo amplamente nas plantas (HARBORNE, 1993). Nele se encontram diversos grupos com intensa atividade biológica, sendo que, em comparação a outros metabólitos secundários os flavonóides são aparentemente não muito tóxicos. No entanto muitos flavonóides podem atuar como deterrentes alimentares para insetos fitófagos em baixas concentrações.

Estas são substâncias químicas fenólicas de biossíntese mista, que desempenham as mais variadas funções, como: proteção à radiação UV, insetos, doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, atraente para polinização (cor das pétalas), dispersante de sementes, controladores de hormônios, estimulante à produção de nódulos pelos rizóbios, inibidores enzimáticos, antioxidantes e agentes alelopáticos (MARKHAM, 1989), resistência a frio (CHALKER-SCOTT; KRAHMER,

1989) e seca (MOORE et al, 2005) e ajudam a planta a sobreviver em solos ricos em metais pesados (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 2002).

Alguns Isoflavonóides, um subgrupo dos Flavonóides, são importantes como fitoalexinas e compostos anti-herbivoria em legumes (SHARMA; NORRIS, 1991).

Em soja, flavonóides foram identificados em diversas partes da planta (HOFFMANN-CAMPO, 1995), sendo que, segundo Haukioja (2002), a idade fisiológica das folhas pode interferir nos tipos de fenólicos presentes bem como seu consumo por insetos. Folhas jovens de *Bétula pubescens* foram 40% menos consumidas por lagartas de *Epirrita autumnata* que folhas normais.

A soja pode ser atacada por diversos insetos-pragas e algumas podem causar severos danos econômicos. Os mais freqüentes e capazes de causar danos severos na soja são *A. gemmatilis* (HUBNER), *Euschistus heros* (FABRICIUS), *Nezara viridula* (LINNAEUS) e *Piezodorus guildinii* (WESTWOOD) (PANIZZI; CORREA-FERREIRA, 1997).

2.6 RESISTÊNCIA DE SOJA A INSETOS

Três tipos de resistência de plantas a insetos foram definidos por Painter (1951), sendo (1) não preferência ou antixenose: característica da planta que conduz o inseto a não utilizar uma planta para oviposição, alimentação ou abrigo, ou a combinação destes; (2) antibiose: que é o mecanismo de resistência que opera depois do inseto ter colonizado e ter começado o ataque à planta. O efeito antibiótico pode resultar em um declínio no tamanho do inseto ou peso, reduz o processo metabólico, diminui seus movimentos e eleva a mortalidade larval ou pré-adulto; e (3) tolerância, capacidade da planta suportar determinados níveis de danos provocados pelos insetos sem perder rendimento ou qualidade do produto, quando comparado a outro cultivar.

O mesmo autor, Painter (1951), ainda lista as características da resistência de plantas a insetos como sendo: (a) hereditária e controlada por um ou mais genes; (b) relativa e somente pode ser medida por comparação com outros

genótipos; (c) mensurável; e (d) variável, podendo ser modificada pelo ambiente físico e biológico.

Em geral, a planta responde a ataques de predadores de forma espécie-específica, produzindo compostos secundários a partir de genes específicos (quando presentes) e também pela produção de proteínas inseticidas que diferem de espécie para espécie, sendo que muitas espécies de plantas acumulam esses compostos como defesa constitutiva (GATEHOUSE, 2002).

Os mecanismos de resistência em soja compreendem fatores químicos e físicos, podendo ser constitutivos ou indutivos (KOGAN, 1986). Injúrias causadas por insetos em folhas induzem o aumento do nível de resistência em folhas não atacadas da mesma planta (REYNOLDS; SMITH, 1985).

Segundo Hoffmann-Campo, (1996), a concentração suficiente e até mesmo as substâncias químicas que estão ligadas à característica de resistência a insetos podem não ser detectáveis na planta, pois elas podem estar latentes. A partir do momento que se provoca uma indução para sua manifestação, por meio de um inseto que ataca a planta desfolhando ou sugando a seiva, os metabólitos secundários (fitoalexinas) têm sua síntese aumentada, interferindo negativamente a fisiologia do inseto.

Algumas cultivares de soja resistentes a insetos apresentam, em suas folhas, o flavonóide rutina, um composto constitutivo associado à resistência da soja a insetos (HOFFMANN-CAMPO, 2006).

A importância dos compostos químicos constitutivos na resistência natural é conhecida desde a década de 50, embora seu uso tenha sido pouco considerado (KOGAN, 1986). A identificação de compostos químicos responsáveis pela defesa da planta pode ajudar os melhoristas no desenvolvimento de cultivares resistentes a insetos (HEDIN, 1986 apud HOFFMANN, 2006).

2.7 FONTES DE RESISTÊNCIA A INSETOS EM SOJA

A utilização de fontes de resistência a insetos em programas de melhoramento de soja ganhou grande impulso após a identificação de três introduções (PI's) (PI 171451, PI 227687 e PI 229358) como portadoras de

resistência ao besouro mexicano *Epilachna varivestis* Mulsant, nos EUA (DUYN et al., 1971). Essa resistência era caracterizada pela não-preferência pelo besouro a esses genótipos. Em estudos posteriores, verificou-se que essas introduções possuíam resistência a outros insetos como *Helicoverpa zea* (Boddie), *Cerotoma trifurcata* (Forster) (CLARK et al., 1972), *Plathypena scabra* (F.), *Epicauta* spp. e *Trichoplusia ni* Hübner (LUEDDERS; DICKERSON, 1977).

Nos EUA pelo menos duas cultivares resistentes a insetos foram liberadas: “Crockett”, em cuja genealogia encontra-se o acesso PI 171451 (BOWERS, 1990) e “Lamar”, proveniente de cruzamentos envolvendo PI 229358 (HARTWIG et al. 1990). No Brasil foi liberada a cultivar IAC 100 (ROSSETTO, 1989), IAC 24 (MIRANDA et al., 2003a), IAC 17, IAC 23, (MIRANDA et al., 2003b), resistentes a insetos, e IAC 18 e IAC 19, com moderada resistentes a insetos (MIRANDA et al., 2003a).

As PI 274453 e PI 274454, e a IAC78-228 mostraram danos irrisórios em áreas com altas populações de lagarta enroladeira, *Omiodes indicata*, que causou severos danos nos demais genótipos (LOURENÇÃO et al., 1985).

Machado et al. (1999) postulou que a cultivar IAC 100 apresenta moderada resistência à *A. gemmatalis*, pois as larvas dessa espécie que se alimentaram com folhas dessa cultivar, apresentaram aumento na fase larval. Essa resistência também foi observada por Lourenção e Miranda (1987).

Lima e Lara (2004), utilizando cinco genótipos: BR-82 12547, IAC 100, IAC 78-2318, PI 229358 e PI 227687 realizaram um ensaio de antibiose à mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e concluíram que a cultivar IAC 100 destacou-se por afetar negativamente *B. tabaci* biótipo B, prolongando o período ninfal (12,8 dias) e reduzindo a emergência de adultos (80,0%).

Castiglioni e Vendramim (1997) avaliaram a preferência para alimentação e oviposição de *A. gemmatalis* em seis genótipos de soja, sendo três deles (IAC 100, PI 171451 e PI 229358) considerados resistentes a insetos. Em teste com livre chance de escolha, verificou-se não-preferência para alimentação das lagartas pelas linhagens PI 171451 e PI 229358. Não foram detectadas diferenças na preferência para oviposição.

Piubelli et al (2003) trabalhando com PI 227687 verificaram que o extrato desse genótipo foi deterrente para adultos de *N. viridula* afetando sua biologia, e que a deterrência foi maior após esse genótipo ser injuriado, pois o

conteúdo de isoflavonóides aumentou. Hoffmann-Campo (1995) encontrou sete flavonóides glicosídeos diferentes em folhas de PI 227687, genótipo muito usado em programas de melhoramento como fonte de resistência a insetos. A mesma autora, trabalhando com diferentes genótipos de soja, encontrou rutina na cultivar IAC 100, em uma linha melhorada (BR82-12547) e em dois genótipos selvagens (PI 227687 e PI 229358).

Dentre os 56 cultivares da Embrapa, disponíveis comercialmente aos produtores, 22 genótipos apresentaram rutina. No entanto, apenas 3 genótipos (Viçôja, BRS 134 e Embrapa 20 ('Doko RC')) apresentam teores considerados altos o suficiente para causar algum efeito sobre a biologia dos insetos desfolhadores.

2.8 RUTINA

Rutina é um fenólico simples do grupo dos flavonóis que ocorre em plantas terrestres (SONDHEIMER, 1964; HARBORNE, 1977), incluindo variedades cultivadas agronomicamente (GRIFFITH et al., 1955), sendo o fenólico mais amplamente distribuído do reino vegetal (HARBORNE, 1977).

Ela é conhecida por cumprir papel importante na defesa de plantas contra insetos sugadores (GILMAR et al. 1982; PIUBELLI et al. 2003) e mastigadores (HOFFMANN-CAMPO et al. 2001; 2006; PIUBELLI et al. 2005; SIMMONDS, 2001; STAMP; SKROBOLA 1993), sendo um dos compostos identificados em extratos de folhas dos genótipos PI 227687 (SALVADOR, 2008) e PI 274454 (PIUBELLI, 2004, et al, 2005; HOFFMANN-CAMPO et al. 2001) amplamente utilizados em programas de melhoramento de plantas como fonte de resistência a insetos.

A Rutina pode agir de diversas formas sobre o comportamento dos insetos. Pode reduzir o crescimento, prolongar o tempo de desenvolvimento e interferir nos insetos herbívoros de primeiro e segundo ínstar. (ISMAN; DUFFEY, 1982; STAMP; HORWATH, 1992; STAMP; YANG, 1996). Segundo Hoffmann-Campo (2006), a rutina foi responsável por um prolongamento no ciclo biológico de *A. gemmatilis*. Efeito parecido foi encontrado por Hoffmann-Campo et al. (2001), quando acrescentaram 2% de rutina na dieta de *T. ni*. Os insetos foram afetados

negativamente na sobrevivência, no comportamento e na fisiologia. A rutina também apresentou impacto negativo no crescimento e na iniciação de muda de *Manduca sexta* (STAMP; HORWARTH, 1992).

No entanto, a resposta do inseto em relação à rutina pode variar de acordo com a concentração e da espécie que se alimenta dela. Ela atua como fago estimulante para *Heliothis virescens* (BLANEY; SIMMONDS, 1983), *Schistocerca americana* (BERNAYS et al., 1991), *S. albolineata* (Thomas), e *Melanoplus differentialis* (Thomas) (BERNAYS; CHAPMAN, 2000). Entretanto, sua influência sobre larvas de *Helicoverpa zea*, *H. armigera*, *Spodoptera littoralis*, *S. exiqua* e *S. exempta* depende da concentração testada. Concentrações maiores que 10^{-3} molar atuam como inibidor da alimentação no final do estágio larval para *H. zea* e *H. armigera*. Já concentrações menores que 10^{-4} molar atuam como fagoestimulante para essas mesmas espécies (BLANEY; SIMMONDS, 1983).

Segundo Gazzoni et al. (1997), o efeito da rutina na biologia da *A. gemmatalis* também depende da dose ministrada nas dietas. Em seu trabalho esse autor conclui que a rutina, em dose de 1% na dieta das lagartas tem maior efeito que doses menores, pois causou maior aumento na duração da fase larval, provavelmente por estes tentarem atingir o peso ideal para chegar a fase de pupa e posterior reprodução (PIUBELLI, 2004), e na mortalidade de *A. gemmatalis*, sendo que a ingestão pelos insetos desse flavonóide causa o efeito de antibiose, observado em genótipos resistentes a insetos.

Uma associação dessa resposta diferenciada causada por diferentes doses de rutina pode ser feita com o mecanismo de defesa das plantas. Ortega (1985) sugere uma variação no teor de rutina nas folhas das plantas durante o ciclo vegetativo, mesmo fenômeno visto por Ermakov (1958), em folhas de *Sophora japonica*. Segundo Edwards & Wratten (1980) este comportamento de acúmulo diferenciado em partes da planta e em épocas distintas é comum nos vegetais e este fato pode estar atuando como um mecanismo de proteção (dos vegetais), preservando folhas jovens (altas concentrações de rutina) da predação, pois, de acordo com Shaver e Lukefahr (1969), a rutina tem ação repelente contra insetos. Salvador (2008), observou influência negativa nos pesos secos iniciais, peso de pupa, dieta consumida e ainda um prolongamento no ciclo larval dos insetos de *A. gemmatalis* alimentados de dietas com adição de rutina.

Além da rutina, a genistina (genisteína 7-O-β-D-glicosídeo) também tem sido encontrada em genótipos com característica de resistência a insetos. Considerando a concentração de rutina e genistina nos genótipos PI 227687, PI 274454 e IAC 100 é razoável sugerir que esses flavonóides são importantes fatores em termos de resistência a *A. gemmatilis* (PIUBELLI, 2005).

Segundo Salvador (2008), tanto a rutina quanto a genistina estão relacionadas à defesa da soja a insetos, ressaltando a importância da manutenção desses compostos em cultivares de soja. Rutina e genistina têm sido relatadas como as substâncias mais evidentes associadas à resistência de soja a desfolhadores (PIUBELLI, 2004).

2.9 GENÉTICA DA RESISTÊNCIA EM SOJA

A resistência a insetos de cada uma das PI's (PI 171451, PI 227687 e PI 229358, portadoras de resistência múltipla) é devida a diferentes fatores (KILEN; LAMBERT, 1986). Fato ratificado por Valle e Lourenção (2002), que, trabalhando com as mesmas PI's, verificou comportamento diferenciado frente a *B. tabaci* biótipo B.

A presença de um único gene com dominância incompleta controlando a resistência da cultivar 'Dowling' a *Spilosoma obliqua*, foi sugerido por Bhattacharya e Ram (1995).

Yan et al. (2008) usando *microarrays* de cDNA de soja, examinaram a expressão de genes de plantas resistentes e suscetíveis, sem a presença de *Aphis glycines*, para identificar genes com diferenças constitutivas na expressão, concluíram que todos os genes (5 genes apresentaram expressão constitutiva) que mostraram uma expressão significativamente mais elevada nas plantas resistentes do que nas suscetíveis, através de três pontos no tempo, foram considerados candidatos para o gene de resistência a *A. glycines*, *Rag1* (resistência a *A. glycines*), gene esse que foi determinado ser um único gene dominante para resistência da cultivar 'Dowling' a *A. glycines*. (HILL et al. 2006).

Segundo Meksem et al. (2001) a caracterização do conteúdo de isoflavonóides entre linhas puras recombinantes de soja, mostrou que a distribuição

foi tipicamente de característica poligênica com pouca evidência para genes de efeito maior na característica.

Cultivares diferentes podem possuir o mesmo nível de resistência com diferentes mecanismos para resistência.

A resistência a outros insetos em soja é quantitativa na expressão e na herança (KILEN; LAMBERT, 1998; NARVEL et al., 2001; ROWAN et al., 1991).

Pesquisa realizada com o genótipo PI 417061, considerada resistente a diversas espécies de insetos, sugere que essa resistência é controlada por múltiplos genes, resultado similar ao encontrado com os acessos PI 171451, PI 227687 e PI 229358, e que cada fonte de resistência carrega pelo menos um gene que é diferente das outras (KILEN; LAMBERT, 1998).

Sisson et al. (1976) estudando a herança da resistência da soja a *Epilachna varivestis* através das gerações F₃ de cruzamentos entre cultivares comerciais ('Ransom', 'Coker Hampton 226A' e 'Bragg') e os acessos PI 171451, PI 227687 e PI 229358, não encontrou características de frequências mendelianas simples. No entanto, houve expressão de resistência equivalente às médias das linhagens parentais nas gerações segregantes, sugerindo um pequeno número de genes, dois ou três principais, envolvidos na resistência.

Plantas com resistência constitutiva resultam em um cultivar sendo menos danificado que uma planta suscetível deficiente dessa qualidade (PAINTER, 1951). A indução de resistência a insetos pode também ocorrer quando o sistema defensivo da planta é estimulado por estímulos externos: físicos ou químicos (KOGAN; PAXTON, 1983).

Em soja, dois genes que codificam isoflavonas sintetase (enzima chave para a formação das isoflavonas – metabólitos secundários) foram identificados, usando estudo de expressão em *Arabidopsis* e isolando seus genes homólogos de outras leguminosas (JUNG et al., 2000).

Diversos genes são seletivamente ativados pelo ataque de insetos. Os genes indol-3-glicerol fosfatase liase, que catalisa a formação do indol livre, uma importante peça na formação dos metabólitos secundários (FREY et al., 2000), e aleno sintetase, que catalisa o primeiro passo na biossíntese de ácido jasmônico (REYMOND et al., 2000), são induzidos pela herbivoria.

A grande maioria dos genes envolvidos no controle de caracteres quantitativos não pode ter os seus efeitos isolados. No entanto, alguns genes podem

apresentar efeito maior e, com isso, podem ser isolados e seqüenciados em estudos posteriores.

Esse conhecimento envolve estudos genéticos, avaliações cromatográficas e prospecção de marcadores moleculares os quais permitem decifrar o tipo de herança envolvida na produção desses metabólitos secundários: monogênica, oligogênica ou poligênica.

Informações sobre a herança da resistência são muito úteis para o melhorista decidir qual método de melhoramento e estratégia a ser adotada. Diversos genes para resistência são necessários para combater o desenvolvimento de novos biótipos. Por essa razão, estudos genéticos são conduzidos para determinar a herança, a resistência e para identificar diversos genes para resistência.

Também, o conhecimento do controle genético da herança da resistência contribui para a escolha do método de melhoramento, previsão da duração e eficiência da resistência, assim como para o planejamento de ações futuras.

Um dos objetivos dos programas de melhoramento, principalmente em empresas públicas, é desenvolver variedades resistentes a insetos para os agricultores, minimizando, assim, as perdas devido ao ataque dessas pragas.

3 OBJETIVOS

Os principais objetivos do presente estudo foram:

- Determinar o controle genético da produção do flavonóide rutina responsável pela resistência das plantas a insetos desfolhadores em cultivares de soja
- Fornecer parâmetros genéticos para apoiar e acelerar os programas de melhoramento, aumentando, assim, a eficiência na seleção de genótipos resistentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no período de 2006 a 2008, no laboratório de resistência de plantas a insetos e em casa-de-vegetação, ambos nas instalações do Centro Nacional de Pesquisa de Soja da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária), localizada nas proximidades do distrito Warta, em Londrina, Paraná.

4.1 GENÓTIPOS UTILIZADOS

Para estudar os mecanismos genéticos responsáveis pela produção dos flavonóides, que contribuem para o nível de resistência aos insetos pragas, foram realizados cruzamentos entre as cultivares com diferentes teores de rutina (IAC 100, BR 16 e Conquista (MG/BR 46)).

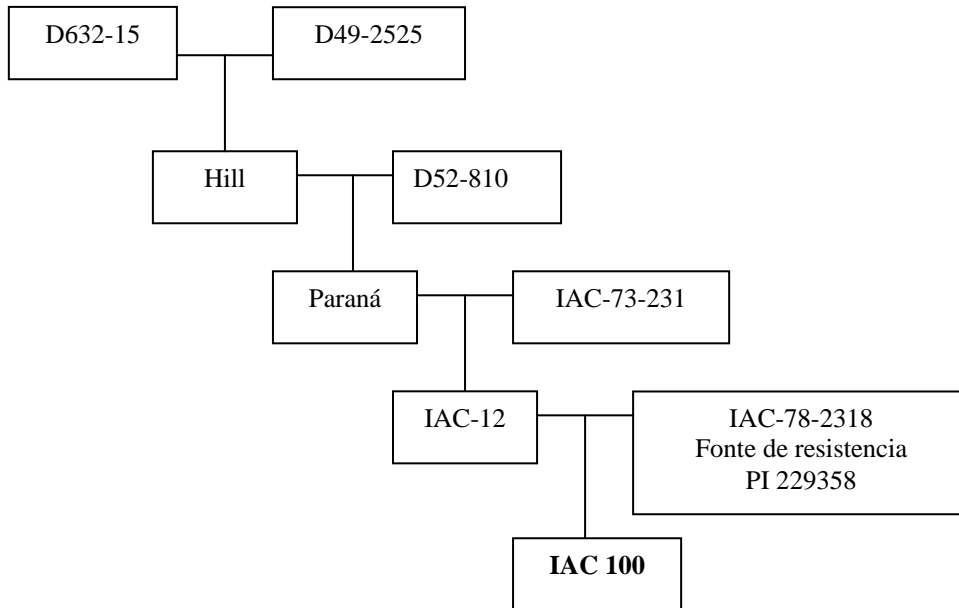
“IAC 100”: considerada resistente a insetos, dentre os cultivares, apresenta altos teores de rutina em seus extratos foliares.

“Conquista”: considerada suscetível a insetos, mas com teores intermediários de rutina em suas folhas, quando em comparação com a cultivar IAC 100 (HOFFMANN-CAMPO, dados não publicados).

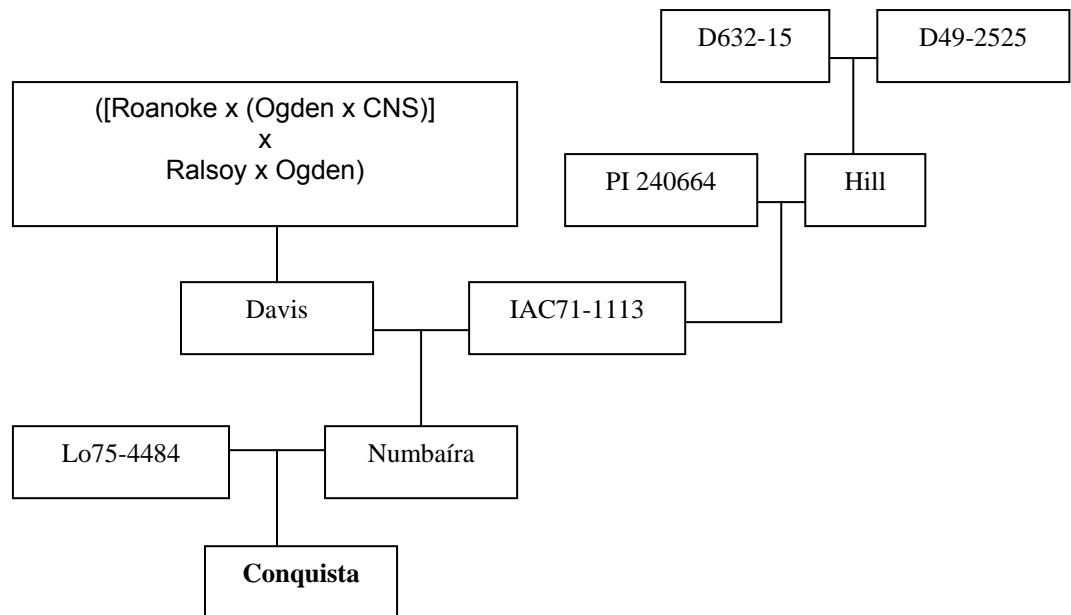
“BR 16”: suscetível a insetos, não apresentando rutina em extratos foliares (PIUBELLI, 2004; SALVADOR, 2008).

As genealogias das três cultivares são mostradas na Figura 1.

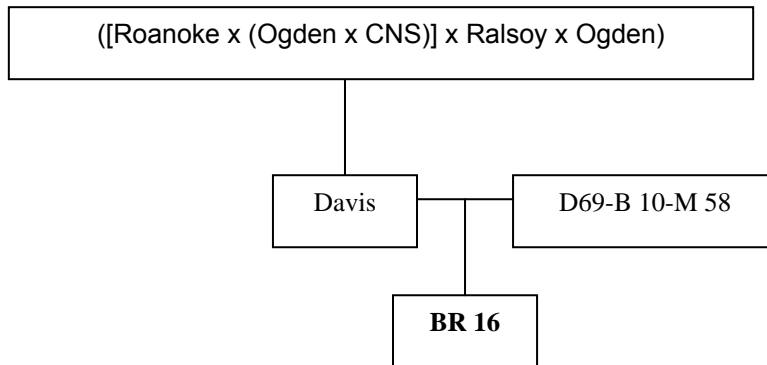
1 - IAC 100



2 - MG/BR 46 (Conquista)



3 - BR 16



... Continuação Figura 1.

Figura 1 – Genealogia dos genótipos de soja utilizados nos ensaios (MIRANDA, 2005).

4.2 MONTAGEM DO EXPERIMENTO

4.2.1 Híbridações e Avanços de Gerações

Na safra 99/00, foram realizadas as híbridações biparentais incluindo as cultivares IAC 100, BR 16 e Conquista para produção das gerações avançadas. Para verificar possível efeito materno ou citoplasmático sobre o caráter em estudo, foram realizados cruzamentos recíprocos. Através de sucessivas sementeiras em casa-de-vegetação pelo método SSD, as gerações foram avançadas. As vagens dos cruzamentos foram colhidas individualmente e cada provável semente F_1 foi cultivada de maio a agosto de 2000, formando a geração F_1 . Plantas F_1 foram colhidas em agosto de 2000 individualmente e as sementes F_2 semeadas em novembro de 2000. Plantas F_2 foram colhidas individualmente em março de 2001 e cultivadas de maio a agosto de 2001 para originar as famílias $F_{2:3}$ (família F_3 originária de planta F_2). Plantas F_3 foram colhidas e parte da semente foi mantida em câmara fria. Na safra 05/06, as sementes mantidas em câmara fria (sementes de plantas F_3) foram plantadas, avançando para geração F_4 . Em 2006 plantas F_4 foram colhidas, e na safra 06/07 foram plantadas, compondo a geração F_5 . Sementes de

plantas F_5 (geração F_6) e dos parentais, com mesma idade fisiológica, foram utilizadas para realização dos ensaios.

4.2.2 Ensaio

Cada cruzamento foi avaliado em ensaios independentes, possuindo três tratamentos cada (as duas gerações parentais e a geração F_6), sob delineamento completamente casualizado. O primeiro ensaio foi plantado entre os dias 17 e 20 de agosto de 2007, sendo contido pelos parentais IAC 100 e Conquista, junto com as 20 famílias da geração F_6 do cruzamento entre elas. Para verificar possível efeito materno ou citoplasmático sobre o caráter em estudo, cruzamentos recíprocos também foram realizados. O segundo ensaio foi plantado entre os dias 10 e 13 de dezembro de 2007 e continha os parentais IAC 100 e BR 16, e a geração F_6 do cruzamento. Nesse ensaio não foram incluídos os cruzamentos recíprocos. Em ambos os ensaios, cada parental foi representado por quinze plantas e cada família por quatro plantas. A parcela experimental nos ensaios foi composta por uma planta por vaso, dispostas em mesas contendo 2 fileiras paralelas distantes 40 cm. Cada fileira continha 20 vasos, num total de 40 vasos por mesa.

O substrato utilizado foi constituído de uma mistura de terra e esterco bovino, tratado com Brometo de Metila. A semeadura foi feita manualmente, colocando 10 sementes por vaso e após germinação, realizou-se o desbaste aleatório para uma planta por vaso. A irrigação foi realizada por gotejamento, seguindo frequência adequada de acordo com o ambiente. O controle de doenças, quando necessário, foi realizado utilizando os mesmos produtos químicos recomendados e os mesmos procedimentos de aplicação adotados para a soja cultivada em áreas comerciais.

4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA

4.3.1 Preparo das amostras

A identificação e quantificação do composto rutina foi realizada utilizando-se o 4º trifólio de cada planta de cada genótipo, colhidos no estágio R1 (FEHR et al, 1977). Para o preparo das amostras, depois de retirados os pecíolos, alíquotas de cada amostra (300 a 600 mg de folha fresca) foram pesadas e maceradas em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e transferidas para tubos de vidro, adicionando-se uma solução de 80% MeOH em água, no volume de 10 vezes a massa da amostra. Os tubos foram levados ao ultrasson por 20 min. Posteriormente, as amostras foram filtradas e secas em nitrogênio gasoso. Após secagem, houve ressolubilização em 1,5 ml de 80% MeOH e colocadas em ultrasson por 12 min. As amostras foram, então, filtradas com membrana 0,45 μ e transferidas para tubos de amostrador automático e analisadas em cromatógrafo Shimadzu, HPLC- Cromatógrafo Líquido de Alta Performance, (Prominience com controlador CBM-20A; detetor SPD-20A; degaseificador DGU 20A5; Bomba LC-20AT; auto sampler SIL-20A e forno CTO 20A).

4.3.2 Quantificação – Análise cromatográfica

Alíquotas de 10 μ L do extrato foram injetadas no HPLC sendo as análises realizadas em coluna de fase reversa (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno), preenchida pelo suporte C18 (partículas de 5 micra). A fase móvel foi composta de 2% de ácido acético (HoAc), solvente A, e uma mistura de metanol, ácido acético e água (MeOH:HoAc:H₂O; 18:1:1), solvente B. O sistema inicial do gradiente linear foi 75% de A e 25% de B, atingindo aos 40 min., a situação inversa, ou seja, 25% de A e 75% de B. Aos 45 minutos, voltou-se à situação inicial, aí permanecendo por 5 min, antes da próxima injeção. O fluxo do solvente foi de 1mL/ min. e a absorção pelo detector UV foi medida a 360nm. O padrão de

flavonóide utilizado foi rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$) (quercitina 3-O-raminoglicosídeo) da marca Sigma. Para a obtenção das áreas da substância padrão, sete concentrações de rutina (0, 01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 mg/ml) foram injetadas em cromatógrafo, conforme descrito anteriormente. Com os valores das áreas da substância padrão e de suas respectivas concentrações, foi construído um gráfico de dispersão e a obtenção de uma equação de regressão linear. Após injeção das amostras, a área da substância rutina foi obtida, aplicando este valor na equação, obteve-se a concentração da substância (mcg/mL) em cada genótipo. A concentração da substância em mcg/g de folha fresca foi calculada através da divisão da concentração obtida (mcg/mL) pela massa da folha de cada genótipo, considerando o volume de ressolubilização e a concentração de água na folha fresca.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICO-GENÉTICAS

Os dados foram analisados através dos “softwares”, como o Sistema de Genética Quantitativa (SGQ) e GENFIT (TOLEDO, 1991), disponíveis na Embrapa. O primeiro determina, para os parentais e as gerações F_6 e RF_6 , os graus de liberdade, as médias, as variâncias totais e as variâncias entre e dentro das famílias. O segundo, com os dados gerados pelo SGQ, ajusta o modelo genético para os componentes de média e variância, dos parentais (P_1 e P_2) e gerações F_6 e RF_6 , permitindo entender a natureza dos efeitos genéticos envolvidos nos cruzamentos.

Utilizou-se também o método do qui-quadrado (χ^2) para verificar a adequação dos modelos genéticos sugeridos.

Este tipo de estudo dará a melhor explicação possível a respeito dos principais efeitos gênicos envolvidos na determinação do caráter.

4.4.1 Componentes Genéticos de Média

Os parâmetros genéticos dos componentes de média foram estimados pelo teste de escala conjunto (CAVALLI, 1952, apud DIAS, 2003), utilizando o programa GENFIT sendo que este teste permite avaliar se o modelo se ajusta aos dados no sentido de oferecer uma estrutura adequada para a compreensão das observações. A adequação do modelo genético é obtida a partir de um teste que possui um número de graus de liberdade igual ao número de gerações menos o número de parâmetros estudados. Quando o número de gerações é igual ao número de parâmetros genéticos, não sobram graus de liberdade para o teste de qualidade de ajuste do modelo genético.

Conjuntos de testes de escala podem ser elaborados para abranger qualquer combinação de tipos de famílias que possa ser encontrada. Este combina efetivamente todo o conjunto de testes de escala num único, oferecendo uma abordagem mais geral, mais adaptável e mais informativa. O método consiste em estimar os parâmetros do modelo, m , $[d]$ e $[h]$ a partir das médias de todos os tipos de famílias a disposição, seguindo por uma comparação destas médias observadas com os seus valores esperados usando as estimativas dos três parâmetros.

Sendo assim, inicialmente foi adaptado um modelo genético simples do tipo aditivo-dominante, envolvendo apenas componentes m , $[d]$ e $[h]$ (Tabela 1). Nesse modelo, m representa a média da distribuição genotípica de todas as linhagens puras extraídas, sem seleção, de um cruzamento, ou o valor médio entre os parentais; $[d]$ é a soma algébrica dos efeitos aditivos de todos os k locos para os quais P_1 e P_2 diferem; e $[h]$ define a soma algébrica dos efeitos de dominância dos mesmos k locos.

O teste conjunto de escala utiliza o método dos quadrados mínimos ponderados (*Weighted Least Squares* – WLS) para estimar os parâmetros genéticos. Nesse método, é necessário fornecer os dados de média e variância observados em cada geração.

Os parâmetros estimados que forem não significativos são eliminados do modelo e os componentes remanescentes são estimados novamente com um novo κ^2 para testar a qualidade do modelo.

Tabela 1 - Componentes genéticos de média: aditivos ($[d]$) e dominantes ($[h]$), dos parentais e da geração segregante F_6 .

Geração	m	[d]	[h]
P_1	1	1	0
P_2	1	-1	0
F_6	1	0	1/32

Fonte: Mather e Jinks (1982).

Para teste não significativo ao nível de 5% de probabilidade, não rejeita-se o modelo, sendo considerado suficiente para explicar a variabilidade genética encontrada. Essa seqüência foi realizada para todos os conjuntos de gerações.

Quando o modelo genético se mostrou insatisfatório para explicar os mecanismos genéticos em controle desta característica, ou seja, apresentou χ^2 significativo ao nível de 5% de probabilidade, foi testado um novo modelo, com a presença de interação não alélica entre os pares de locos, adicionando-se, ao modelo genético, os componentes $[i]$ e $[I]$. O componente $[i]$ representa a interação dos locos em homozigose (epistasia do tipo aditivo x aditivo); e $[I]$, sendo a interação entre locos em heterozigose (epistasia do tipo dominante x dominante) (Tabela 2). O componente $[j]$, que representa a interação entre locos em homozigose e heterozigose não foi inserido no modelo, pois não foram realizados retrocruzamentos, não havendo, portanto, interação desse tipo.

Tabela 2 - Componentes genéticos de média: aditivos ($[d]$), dominantes ($[h]$) e epistáticos ($[i]$, $[l]$) dos parentais e da geração segregante F_6 .

Geração	m	[d]	[h]	[i]	[l]
P_1	1	1	0	1	0
P_2	1	-1	0	-1	0
F_6	1	0	1/32	0	$(1/2)^{10}$

Fonte: Mather e Jinks (1982).

4.4.2 Componentes Genéticos e Ambientais de Variância

Nos componentes de variância, os procedimentos envolvem a realização de contrastes que permitem verificar a existência de divergência genética entre os parentais e inferir se a herança genética dos caracteres é do tipo aditiva ou dominante. Em função das gerações utilizadas, com parentais e geração F_6 , o objetivo principal será verificar a existência de variância genética aditiva em cada cruzamento.

As variâncias podem ser calculadas a partir das famílias produzidas nos experimentos de genética, pois a variação em cada uma das linhagens parentais puras, P_1 e P_2 , é exclusivamente ambiental, ou seja, não-herdável (MATHER; JINKS, 1971), já que essas gerações não têm estrutura de família e são linhas puras, ou seja, todos os indivíduos são geneticamente idênticos (OLIVEIRA, 1984).

A geração F_6 é composta por famílias de progênies e a análise realizada com ela é constituída por: a) uma variância entre famílias, que possui como quadrado médio esperado (QME) a seguinte composição $\sigma_d^2 + k\sigma_e^2$, onde σ_d^2 é o componente de variância dentro das famílias, k é a média harmônica do número de indivíduos dentro das famílias e σ_e^2 é o componente de variância entre famílias; e b) uma variância dentro de famílias, que possui como quadrado médio esperado (QME) somente o componente σ_d^2 .

Da tabela da ANOVA (Tabela 3) para as gerações F_6 , obtêm-se os quadrados médios e as respectivas esperanças dos quadrados médios.

Tabela 3 – ANOVA e esperança dos quadrados médios para efeitos entre e dentro de famílias F_6 .

F.V	g.l	SQ	QM	E(QM)
F6 entre	39	SQE	QME	$\sigma_d^2 + K\sigma_e^2$
F6 dentro	120	SQD	QMD	σ_d^2
Total	159			

Portanto,

$$\begin{aligned}
 QMD = \sigma_d^2 &= V_5 F_6 = V_R F_n = \left(\frac{1}{2}\right)^R D_R + \left(\frac{1}{2}\right)^{2n-R-1} H_R \\
 &= \left(\frac{1}{2}\right)^5 D_5 + \left(\frac{1}{2}\right)^6 H_5 \\
 &= 0,03125D_5 + 0,015625H_5
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 QME = \sigma_d^2 + k\sigma_e^2 &= \frac{1}{32}D_5 + \frac{1}{64}H_5 + k \left\{ \left[\left(\frac{1^1}{2} + \frac{1^2}{2} + \frac{1^3}{2} + \frac{1^4}{2} \right) D \right] + \left[\left(\frac{1^{10}}{2} + \frac{1^9}{2} + \frac{1^8}{2} + \frac{1^7}{2} \right) H \right] \right\} \\
 &= \frac{1}{32}D + \frac{1}{64}H + k \left(\frac{15}{16}D + \frac{15}{1024}H \right) \\
 &= \left(\frac{1}{32} + \frac{15k}{16} \right) D + \left(\frac{1}{64} + \frac{15k}{1024} \right) H
 \end{aligned}$$

O método usado para estimar os componentes de variância das gerações estudadas foi o dos quadrados mínimos ponderados, de acordo com Hayman (1960), apud Mather & Jinks (1982) (Tabela 3), utilizando o programa GENFIT. Este método foi utilizado para todos os modelos ajustados. Quando não significativo algum parâmetro, esse foi eliminado e um novo modelo foi ajustado.

As três gerações foram usadas para ajustar os componentes de variância, sendo testado um modelo incorporando componentes genéticos aditivos (D), de dominância (H) e ambientais (E), das variâncias destas gerações (Tabela 4). Com base no teste F para homogeneidade de variâncias dos parentais foi verificada a significância do efeito da interação genótipo x microambiente. Quando obtido um valor de F significativo o componente ambiental E foi substituído por E₁ e E₂ no modelo. A interação genótipo x microambiente indica a interação diferenciada de cada genótipo com o ambiente ao qual foi submetido (MATHER & JINKS, 1982), não se referindo a microambiente contrastantes (anos, locais e outros).

Tabela 4 - Componentes de variância genética aditiva (D), de dominância (H), de interação genótipo x ambiente (E) e de interação genótipo x micro-ambiente (E₁ e E₂)*, dos parentais e da geração segregante F₆.

Geração	D	H	E	E ₁	E ₂
P1	0	0	1	1	0
P2	0	0	1	0	1
F ₆ entre	$\left(\frac{1}{32} + \frac{15k}{16}\right)$	$\left(\frac{1}{64} + \frac{15k}{16}\right)$	1	0,5	0,5
F ₆ dentro	$\left(\frac{1}{2}\right)^5$	$\left(\frac{1}{2}\right)^6$	1	0,5	0,5

* Na presença de interação genótipo x micro-ambiente serão utilizados E1 e E2.

Fonte: Mather e Jinks (1982).

4.4.3 Coeficiente de Herdabilidade

A herdabilidade pode ser apresentada no sentido restrito, referindo-se à proporção da variância total constituída pela variância genética aditiva, ou sentido amplo, referindo-se à contribuição de toda a variância herdável para a variância total. A herdabilidade no sentido restrito, que é aquela com maior interesse para os programas de melhoramento de autógamias, pode ainda ser ao nível de planta individual ou de média de famílias. Nesse trabalho, a herdabilidade foi estimada no sentido restrito (h^2_r), ao nível de planta individual (h^2_p) e com base na média da família F_6 (h^2_m), a partir dos componentes de variação do conjunto de gerações, utilizando as equações:

$$h^2_{r_p} = \frac{0,5D}{0,5D + 0,25H + \frac{E_1 + E_2}{2}} \quad h^2_{r_m} = \frac{0,5D}{0,5D + 0,25H + \frac{E_1 + E_2}{2n}}$$

Em que:

D : é a variância aditiva;

H : é variância de dominância;

E : é a variância ambiental;

n : é a média harmônica do número de indivíduos que compõem as famílias F_6 .

5 ARTIGO

Artigo a ser submetido à Revista *Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB*

CONTROLE GENÉTICO DA PRODUÇÃO DO FLAVONÓIDE RUTINA EM SOJA COM CARACTERÍSTICA DE RESISTÊNCIA A INSETOS DESFOLHADORES.

Everson Tartari Kunz

Resumo

A rutina é um flavonóide constitutivo encontrado em folhas de genótipos de soja resistentes a insetos. Esse composto afeta a biologia e o comportamento de lagartas de *Anticarsia gemmatalis*. O objetivo desse trabalho foi estudar o controle genético da produção do flavonóide rutina em folhas de soja. A cultivar IAC 100, resistente a insetos e com alta concentração de rutina, foi cruzada com as cultivares Conquista, com média concentração de rutina e BR 16, sem rutina, ambas consideradas suscetíveis a insetos. Os parentais e a geração F₆ foram avaliados quanto à concentração de rutina nas folhas em condições de casa-de-vegetação. O caráter concentração de rutina nas folhas tem herança poligênica com presença de efeitos genéticos aditivos. Os efeitos ambientais são importantes na determinação do caráter, inclusive com interação genótipo x microambiente significativa, tornando necessário o uso de progênies avaliadas em diferentes ambientes para aumentar a eficiência de seleção.

Termos para indexação: *Glycine Max*. *Anticarsia gemmatalis*. Efeitos aditivos. IAC 100

Abstract

Rutin is a constitutive flavonoid found in leaves of insect resistant soybean genotypes. This compost affects the biology and the behavior of the *Anticarsia gemmatalis* caterpillar. The purpose of this work was to study the genetic control of the production of the rutin flavonoid in soybean leaves. The cultivar IAC 100, insect-resistant and with high rutin concentration, was crossed with cultivar Conquista, with intermediate rutin concentration, and with BR 16, without rutin in leaves, both considered susceptible to insects. Rutin concentration in soybean leaves was evaluated on parental and the F₆ generation in greenhouse condition. The trait rutin concentration in soybean leaves is polygenic with presence of additive genetic effects. The environmental effects are important for the trait expression with

significant genotype x microenvironment interaction effect, making necessary the use of progenies evaluated in different environments to improve the selection efficiency.

Index terms: *Glycine max.* *Anticarsia gemmatalis*. Effect additive. IAC 100.

Introdução

A resistência a insetos em soja é devida, principalmente, aos compostos químicos presentes na planta hospedeira (Hoffmann-Campo et al., 1994), como os flavonóides. Os flavonóides são uma classe de metabólitos secundários que possuem diversos efeitos fisiológicos (pré-ingetivos) e comportamentais (pós-ingestivos) sobre os insetos (Hoffmann-Campo et al., 2001; Thoison et al., 2004).

Um dos mecanismos de defesa da soja esta ligado à presença de compostos pré-formados nas plantas. O flavonóide rutina é um composto constitutivo associado à resistência da soja a insetos (Hoffmann-Campo, 2006). Sua presença já foi relatada em folhas de genótipos de soja considerados resistentes a insetos como a PI 227687, a PI 274454 e a cultivar IAC 100 (Piubelli, 2005).

A rutina tem papel importante na defesa contra insetos mastigadores (Hoffmann-Campo et al., 2001, 2006; Simmonds, 2001), como a *Anticarsia gemmatalis*. Esse inseto, conhecido popularmente no Brasil por “lagarta-da-soja”, é uma das principais pragas desfolhadoras da cultura da soja, acarretando grandes prejuízos para essa cultura, podendo causar até 100% de desfolhamento (Hoffmann-Campo et al., 2000). A rutina pode agir reduzindo o crescimento e prolongando o ciclo biológico das lagartas desse inseto (Hoffmann-Campo, 2006).

A identificação e compreensão da forma de ação dos compostos químicos responsáveis pela defesa da planta a insetos, podem ajudar os melhoristas no desenvolvimento de cultivares resistentes a insetos (Hoffmann-Campo, 2006). Esse conhecimento envolve estudos genéticos e avaliações cromatográficas os quais permitem decifrar o controle genético da herança envolvida na produção desses metabólitos secundários. Com estas informações, o melhorista pode traçar a melhor estratégia de melhoramento a ser adotada, facilitando o desenvolvimento de cultivares resistentes que necessitam menos agroquímicos.

O objetivo desse trabalho foi definir o controle genético da produção do flavonóide rutina em soja, com característica de resistência a insetos desfolhadores.

Material e Métodos

Dois parentais (Conquista e BR 16) foram cruzados com o parental IAC 100, para obter 20 famílias F_6 e 20 famílias RF_6 no cruzamento IAC 100 x Conquista e 40 famílias F_6 no cruzamento IAC 100 x BR 16. A IAC 100 foi escolhida por apresentar altas concentrações de rutina nas folhas e é considerada resistente a insetos. A cultivar Conquista tem concentrações intermediárias de rutina e é considerada suscetível a insetos, enquanto a BR 16 não apresenta rutina nas folhas e é também suscetível a insetos.

Dois ensaios foram conduzidos com as gerações parentais e F_6 em condições de casa-de-vegetação na safra 2007/08 no Centro de Pesquisa da EMBRAPA soja em Londrina, PR. Cada parental foi representado por 15 indivíduos e a geração F_6 por 40 famílias com 4 indivíduos por família distribuídos sob delineamento completamente casualizado. No primeiro ensaio, realizado em agosto de 2007, foram incluídos os parentais IAC 100 e Conquista e a geração F_6 (20 famílias do cruzamento mais 20 famílias do recíproco, totalizando 40 famílias). No segundo ensaio, realizado em dezembro de 2007, foram incluídos os parentais IAC 100 e BR 16 e a geração F_6 (40 famílias do cruzamento sem recíprocos). Cada ensaio foi composto por um total de 190 plantas individuais cultivadas em vasos de 5L, cujo substrato era um composto de terra e esterco bovino, tratado com Brometo de Metila. A irrigação foi realizada por gotejamento e o controle de pragas e doenças foi feito conforme as indicações técnicas para a cultura.

No estágio R1, o quarto trifólio de cada planta foi colhido e 300 a 600 mg de folha fresca, sem pecíolo, foi pesado, macerado em nitrogênio líquido e uma solução metanólica MeOH 80% em água, 10 vezes o volume da amostra, foi adicionado junto ao macerado. Cada amostra foi filtrada e seca em nitrogênio gasoso, sendo, posteriormente, resolubilizada em 1,5 ml de MeOH 80% em água. As amostras foram, então, filtradas com membrana 0,45 μ e transferidas para tubos de amostrador automático. Alíquotas de 10 μ L do extrato foram injetadas

automaticamente em cromatógrafo Shimadzu, HPLC - Cromatógrafo Líquido de Alta Performance, sendo as análises realizadas em coluna de fase reversa e a absorção, pelo detector UV, foi medida a 360nm.

Com as médias e variâncias da concentração de rutina nas folhas dos parentais e da geração F_6 foi possível ajustar modelos incluindo as estimativas significativas dos componentes aditivos, dominantes, epistáticos e ambientais (Mather & Jinks, 1982). Testes de qui-quadrado para verificar a qualidade de ajuste dos modelos foram aplicados. Estimativas de herdabilidade foi realizado quando possível.

Resultados e Discussão

Os graus de liberdade, médias e variâncias dos parentais e da geração F_6 de cada ensaio estão representados na Tabela 1.

As médias e variâncias da concentração de rutina nas folhas (em mcg/g) da geração F_6 (11,99 e 191,14, respectivamente) e RF_6 (9,06 e 217,44, respectivamente) indicaram ausência de efeito de recíproco (teste t, $P \leq 5\%$), para o cruzamento IAC 100 x Conquista. Conseqüentemente, com os respectivos valores da geração F_6 e RF_6 , foi realizado um pool, obtendo 40 famílias F_6 .

Observando-se o comportamento do parental IAC 100, comum aos dois ensaios, verifica-se que a média das concentrações de rutina no cruzamento IAC 100 X Conquista foi maior em relação ao outro cruzamento. No entanto, a comparação das médias da IAC 100 nos dois ensaios indica diferença não significativa ($P \leq 5\%$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Graus de liberdade (g.l.), médias (mcg/g de folha) e variâncias (var) para a concentração de rutina em diferentes genótipos de soja e respectiva geração de seus cruzamentos.

Gerações	Concentração de Rutina		
	g.l.	Média	var
IAC 100 x Conquista			
IAC 100	14	23,35	138,32
Conquista	13	4,04	35,58
F ₆ Total	156	11,32	356,93
F ₆ Entre (famílias)	39	-	685,23
F ₆ Dentro (famílias)	117	-	243,82
IAC 100 x BR 16			
IAC 100	12	19,20	429,35
BR 16	14	0,00 ⁽¹⁾	0,00 ⁽¹⁾
F ₆ Total	147	4,27	119,76
F ₆ Entre (famílias)	39	-	131,66
F ₆ Dentro (famílias)	108	-	115,10

⁽¹⁾ Para os ajustes de modelos genéticos foi considerada média = 0,01 e variância = 0,01.

A variância da IAC 100 no segundo ensaio, referente ao cruzamento IAC 100 x BR 16, foi significativamente maior que no outro cruzamento ($P \leq 5\%$). Naquele, 30% das repetições da IAC 100 não apresentaram rutina nas amostras foliares, diferente das amostras da IAC 100 no outro cruzamento, onde todas as repetições apresentaram rutina nas análises. Esse resultado pode ser atribuído aos efeitos ambientais ao qual o segundo ensaio foi submetido. Uma hipótese foi a de que esse ensaio foi conduzido em dezembro, mês em que as temperaturas na casa-

de-vegetação variaram de 20°C a 40°C, e isso pode ter afetado o desenvolvimento normal das plantas.

Alguma diferença entre os ensaios já era esperada, uma vez que foram realizadas em duas épocas distintas. No entanto, a diferença significativa entre as variâncias do parental IAC 100, entre os ensaios, indica que houve maior variância ambiental atuando sobre esse caráter no segundo ensaio. Este ensaio, envolvendo o cruzamento IAC 100 x BR 16, com média menor e variância maior, apresenta condições menos favoráveis para detecção de efeitos genéticos do que o primeiro ensaio.

As médias da maior parte das famílias F_6 (22 famílias no primeiro ensaio e 28 famílias no segundo ensaio) aproximaram-se mais das médias dos parentais suscetíveis a insetos nos dois cruzamentos, sendo que no segundo ensaio a frequência foi maior. Isso é um indicativo que a proporção de famílias F_6 com baixa concentração de rutina nas folhas foi maior que a de famílias com altas concentrações de rutina.

As distribuições de frequências da concentração de rutina nas folhas dos pais e das famílias F_6 dos dois ensaios estão apresentadas na Figura 1. Não foi possível a separação de classes fenotípicas bem definidas para os dois cruzamentos, fazendo com que a segregação na F_6 tenda para uma distribuição contínua, característica de um caráter quantitativo. A ausência de classes fenotípicas bem distintas é um indicativo de que a herança do caráter deve ser complexa, envolvendo múltiplos genes. Esse resultado confirma os de Narvel et al. (2001), o qual postula que a resistência a insetos é quantitativa na expressão e na herança.

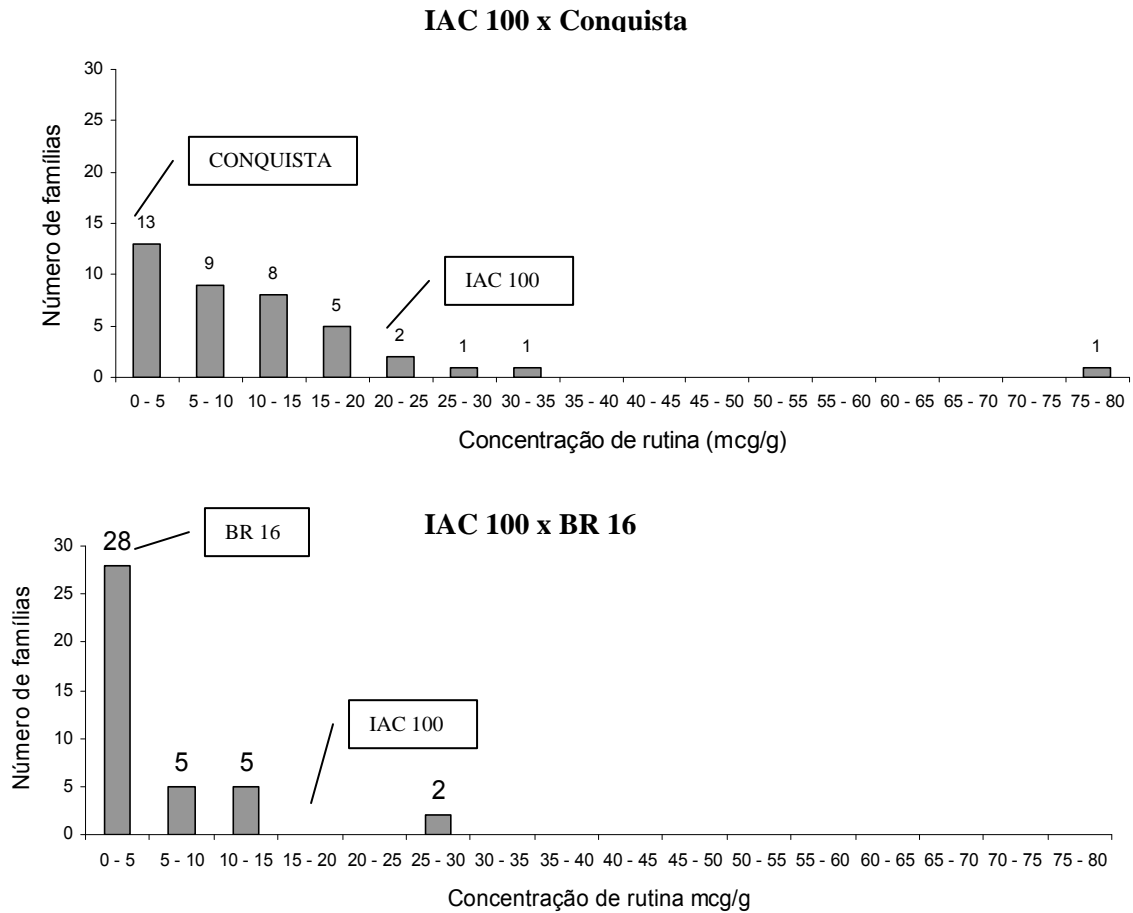


Figura 1 - Distribuição de freqüências da concentração de rutina nas folhas dos indivíduos das famílias F_6 de dois cruzamentos. Os quadrados representam os respectivos pais do cruzamento.

No primeiro ensaio, a variação da concentração de rutina, nas folhas das famílias F_6 , foi de 0,00 mcg/g a 78,80 mcg/g. Cerca de 25% das famílias (10/40) apresentaram valores acima da média dos parentais e poderiam ser selecionadas em programas de melhoramento. Nesse cruzamento foram observadas três famílias F_6 ($f = 3/40$) em classes superiores em relação ao padrão IAC 100. No entanto, quando realizado um teste t ($P \leq 0,05$) para cada uma dessas três famílias em relação à IAC 100, elas não diferem, estatisticamente, da média do padrão IAC 100. O motivo da não significância estatística é devido às elevadas variâncias dentro de cada família. Outras sete famílias F_6 apresentaram médias para rutina pelo menos três vezes maior que o parental Conquista e próximos da média da IAC 100.

No segundo ensaio, duas famílias apresentaram médias em classes superiores à do parental IAC 100, mas não diferiram estatisticamente ($P \leq 5\%$). Sete

famílias apresentaram médias superiores à média dos pais, estando mais próximos ao parental IAC 100, representando 17,50% (7/40), das famílias avaliadas. Esse resultado pode ser importante no melhoramento vegetal, pois essas famílias poderiam ser selecionadas como portadoras de rutina. Novamente, essa proporção de famílias com médias mais elevadas de rutina nas folhas demonstra a possibilidade de sucesso em processos seletivos dentro dos programas de melhoramento para este caráter.

Embora seja possível observar, para os dois ensaios, famílias em classes superiores ao do padrão IAC 100, resistente a insetos, a hipótese de segregação transgressiva resultante da presença de genes distintos para rutina também nos parentais suscetíveis foi descartada estatisticamente por ser não significativo ($P \leq 5\%$). Assim, uma proporção significativa dos genes envolvidos com a produção de rutina nas folhas para esses cruzamentos estão concentrados no parental IAC 100. Os genes presentes no parental Conquista provavelmente também estejam presentes em IAC 100 ou não expressam efeito suficientemente elevado para permitir a detecção deste efeito neste experimento.

Foi observada diferença significativa entre as variâncias entre e dentro de famílias F_6 apenas no primeiro ensaio, sendo a variância entre maior que a variância dentro o que, de acordo com a esperança do quadrado médio, é um indicativo de que existe variabilidade genética entre famílias F_6 para essa característica no cruzamento IAC 100 x Conquista.

Os modelos genéticos ajustados às médias da concentração de rutina nas folhas, incluindo as gerações parentais e F_6 , são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Ajuste dos parâmetros genéticos de médias e variâncias para o caráter concentração de rutina (mcg/g de folha) nos ensaios com os parentais e as plantas F₆ de dois cruzamentos de soja.

	IAC 100 x Conquista	IAC 100 x BR 16
m	12,36 ± 1,13	4,75 ± 0,86
[d]	8,89 ± 1,55	4,74 ± 0,86
X ² /g.l.	1,08/1 ^{n.s.}	3,14/1 ^{n.s.}
Probabilidade	0,30	0,07
<hr/>		
D	127,44 ± 43,33	-
E1	402,00 ± 56,62	253,35 ± 28,41
E2	38,14 ± 14,90	0,1 E-03 ± 0,38
X ² /g.l.	3,50/1 ^{n.s.}	3,37/2 ^{n.s.}
Probabilidade	0,06	0,18

^{ns} Não significativo.

Para ajuste do modelo de médias foi utilizado o modelo reduzido, modelo aditivo-dominante, nos dois ensaios. Os modelos genéticos ajustados às médias revelaram a presença de efeitos aditivos [d] significativos para os dois ensaios realizados. A presença desse efeito comprova a divergência genética entre os pais. Quanto maior o valor de [d], maior é a associação dos genes com efeito de acréscimo à característica em um dos parentais, e dos genes com decréscimo no outro (Mather & Jinks, 1982).

A estimativa de m para a concentração de rutina no primeiro ensaio foi quase o triplo da estimativa obtida no segundo ensaio, apesar da diferença entre os parentais ser semelhante nos dois ensaios. A menor média para produção de rutina nas folhas da IAC 100, no segundo ensaio, também ocorreu ainda com mais intensidade na geração F₆ (4,27 mcg/g, contra 11,32 mcg/g) (Tabela 1), o que baixou significativamente a estimativa de m (4,75 mcg/g, contra 12,36 mcg/g) (Tabela 2) e

também de $[d]$. Fatores ambientais devem ter favorecido a expressão do caráter no primeiro ensaio, tanto nos parentais como nas famílias F_6 , ajudando na detecção dos feitos genéticos.

No caso dos efeitos de dominância $[h]$, eles foram não significativos ($P \leq 5\%$), embora o conjunto de gerações utilizadas (parentais e F_6) não sejam adequados para estimar esses efeitos. Para estimar com maior precisão a presença dos efeitos de dominância $[h]$, gerações menos avançadas como F_1 ou F_2 seriam mais apropriadas. Efeitos epistáticos, que indicariam interações não alélicas, principalmente do tipo aditivo-aditivo $[i]$, também foram não significativos permitindo o ajuste de um modelo aditivo o qual não foi rejeitado pelo teste de Qui-quadrado ao nível de 5% de significância.

Os modelos genéticos ajustados às variâncias da concentração de rutina nas folhas, incluindo as gerações parentais e F_6 , são mostrados na Tabela 2.

A variância genética aditiva (D) foi significativa no primeiro ensaio, referente ao cruzamento IAC 100 x Conquista. Estes resultados estão de acordo com Chiari et al. (2006), que relata que o melhoramento para o acúmulo de isoflavonóides, uma classe dos flavonóides, deve ser explorada na variância genética aditiva.

A interação genótipo x microambiente (presença de E_1 e E_2 nos modelos de variância) esteve presente nos modelos de variância dos dois ensaios, pois apenas E, não foi suficiente para explicar a variância ambiental. Essa interação ocorre quando os genótipos respondem diferentemente as variações micro-ambientais. No caso desses dois ensaios, a cultivar IAC 100 apresentou as maiores variâncias (Tabela 1) quando comparada aos outros dois parentais com menores médias para concentração de rutina. A presença de genes para rutina na cultivar IAC 100 provavelmente permite que esse genótipo responda com maior intensidade aos estímulos ambientais o que não acontece para a cultivar BR 16, o qual simplesmente não apresenta resposta ($var = 0$) ou acontece com menor intensidade com a cultivar Conquista ($var = 35,6$).

O melhor material genético para ser explorado em programas de melhoramento foi produzido no primeiro ensaio, com efeitos genéticos aditivos significativos tanto no modelo de médias $[d]$ como no de variância (D), pois quanto maior a variabilidade genética, maior é o progresso com a seleção. A presença de D para esse cruzamento indica a possibilidade de seleção de genótipos superiores

para concentração de rutina e a probabilidade de detecção de QTL com efeitos aditivos, através de marcadores moleculares. Já no segundo ensaio, a menor expressão do caráter e a menor precisão experimental não permitiu detectar efeitos aditivos ao nível de variância, apenas ao nível de médias.

A estimativa de herdabilidade no sentido restrito é um parâmetro genético que foi utilizado para estimar a participação do componente genético aditivo no desempenho das plantas F_6 . Não foram estimadas as herdabilidades no sentido amplo pelo fato de que, na geração F_6 , a participação dos efeitos de dominância é praticamente nulo, pois com o aumento da homozigose, os efeitos aditivos vão aumentando, enquanto os de dominância diminuem, sendo que a herdabilidade no sentido amplo envolve toda a variância genética (aditiva e dominante), enquanto a herdabilidade no sentido restrito considera apenas a variância genética aditiva, aquela que é fixada pela seleção (Ramalho et al., 1993).

As estimativas de herdabilidade no sentido restrito foram de 23% ao nível de indivíduo e 53% ao nível de progênie, para o primeiro ensaio, indicando que a seleção de plantas individuais não é tão efetiva na obtenção de indivíduos com altas concentrações de rutina quanto à seleção baseada em média de famílias, pois a variabilidade genética é maior entre famílias. Níveis intermediários e baixos de herdabilidade indicam a presença, provavelmente, de uma base genética relativamente complexa com maior número de genes envolvidos, indo de acordo com Yan et al. (2008), que verificou a presença de 5 genes sendo expressos constitutivamente em plantas de soja resistentes a insetos, quando comparadas a plantas de soja suscetíveis.

Para o segundo ensaio, a herdabilidade foi nula, pois não foi verificada, no modelo genético de variância, a presença de variância aditiva nem variância de dominância, mas apenas interação genótipo x micro-ambiente. Em plantas autógamas, como a soja, onde normalmente o produto comercial apresenta elevado nível de homozigosidade, a existência de variância aditiva significativa tem fundamental importância nos processos de seleção para o caráter. Quando existe uma diferença grande entre a herdabilidade ao nível de indivíduo e de progênie, como aconteceu no primeiro ensaio, essa deve ser atribuída à grande contribuição ambiental. Para que essa diferença diminua e a herdabilidade aumente, pode-se introduzir mais variação gênica nas populações, mas também estabilizar o ambiente onde os indivíduos se desenvolvem (Mather & Jinks, 1982).

Conclusões

1. O caráter concentração de rutina nas folhas tem herança poligênica com presença de efeitos genéticos aditivos os quais podem ser explorados nos programas de melhoramento.
2. Há forte influência ambiental na expressão do caráter indicando a necessidade de maior controle ao longo das avaliações, trabalhando-se com progênies ao invés de indivíduos e aumentando o número de repetições.

Referências

CHIARI, L. et al. Inheritance of isoflavone contents in soybean seeds. **Euphytica**, v.150, n.1-2, p.141-147, 2006.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MAZZARIN, R. M.; LUSTOSA, P. R. Mecanismos de resistência de genótipos de soja: teste de não-preferência para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (LEP.: NOCTUIDAE). **Pesq. Agro. Bras.**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 513-519, 1994.

HOFFMANN-CAMPO, C. B., et al. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Circular Técnica Embrapa Soja, Londrina, n.30, 2000.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; HARBORNE, J. B; MCAFFERY, A. R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomol. Exp. Applic.** v.98, p. 181-194, 2001.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. et al. Detrimental effect of rutina on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesq. Agro. Bras.**, v. 41, p. 1453-1459, 2006.

MATHER, K.; JINKS, J. L. **Biometrical genetics**. 3.ed. London, 1982.

NARVEL, J. M. et al. A retrospective DNA marker assessment of the development of insect resistant soybean. **Crop Sci**, v. 41, p.1931–1939, 2001.

PIUBELLI, G. C. et al. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*. **Journal of Chemical Ecology**. v. 31, p. 1515-1531, 2005.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; ZIMMERMANN, M. J. O. **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento de feijoeiro**. Goiânia: UFG, 1993.

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

THOISON, O. et al. Insect antifeedant compounds from *Nothofagus dombeyi* and *N. pumilio*. **Phytochemistry**, v.65, p.2173-2176, 2004.

TRILLER, C; TOLEDO, J. F. F. Using the F3 generation for predicting the breeding potential of soybean crosses. **Journal Brazilian of genetics**, v.19, p. 289-294, 1996.

YAN, L. et al. Soybean defense responses to the soybean aphid. **New Phytologist**, v.179, p. 185-195, 2008.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Para estudos futuros, os grupos de progênies que apresentaram as maiores e as menores médias, para concentração de rutina nas folhas, podem ser avaliados fenotipicamente em ensaios com lagarta à campo ou em bioensaios realizados em laboratório, para verificar se as famílias com maior média se destacam quanto à resistência, e isso indicaria se essas famílias são aptas a serem selecionadas em programas de melhoramento, tendo como base apenas o teor de rutina nas folhas.
- Para detectar um QTL relacionado ao caráter presença de rutina, estudos com marcadores moleculares poderão ser realizados utilizando os parentais IAC 100 x Conquista, pois apresentaram variância genética aditiva significativa. No entanto, a população segregante utilizada para estudos com marcadores deverá ser maior que a utilizada nesse estudo, a fim de viabilizar o mapeamento do(s) QTL(s).
- Pelo fato da característica concentração de rutina nas folhas ter apresentado alta influência ambiental, com herdabilidades que variaram de 23% ao nível de planta à 53%, ao nível de média de famílias, a seleção sobre plantas individuais não é recomendada, sendo indicado a seleção sobre progênies com pelo menos quatro repetições.
- A presença de efeitos aditivos significativos e herdabilidade intermediária para média de família permitem, ao melhorista, fazer seleção de progênies em gerações mais precoces, como F_4 , por exemplo.

REFERÊNCIAS

- ABIN - Agencia Nacional de Inteligencia. Brasil. 2008. Disponível em: <<http://www.abin.gov.br/modules/articles/article.php?id=1739>>. Acesso em: 20 jul. 2008.
- AGE - Assessoria de Gestão Estratégica. 2008. Brasília. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERAL/AGRICULTURA_PECUARIA/PROJECoes_AGRONEGOCIO/RESUMO%20EXECUTIVO%20PROJECoes%20AGRONEGOCIO%20%202006-07%20A%202017-18.PDF>. Acesso em: 13 fev. 2008.
- AGRAWAL, A. A. Specificity of induced resistance in wild radish: causes e consequences for two specialist and two generalist caterpillars. **Oikos**, Cambridge, v. 89, p. 493- 500, 2000.
- BALDWIN, I. T. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. **Plant Physiol**, v. 127, p. 1449-1458, 2001.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanism of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environ. Exp. Bot.**, v. 48, p. 75–92, 2002.
- BENTO, J. M. S. Perdas por insetos na agricultura. **Ação Ambiental**. v. 4, p. 19-21, 1999.
- BERNAYS, E. A. Relationship between deterrence and toxicity of plant secondary metabolites for the grasshopper *Schistocerca americana*. **J. Chem. Ecol.** v. 17, p. 2519-2526, 1991.
- BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. Plant secondary compounds and grasshoppers: beyond plant defences. **Chem. Ecol.** v. 26, p. 1773–1794, 2000.
- BHATTACHARYA, P. K.; RAM, H. H. Inheritance and biochemical basis of resistance to *Spilosoma obliqua* Walker in interspecific crosses of soybean. **Plant Breeding**, v. 114, p. 366-368, 1995.
- BIRKETT, M. A. et al. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proc. Natl. Acad. Sci: USA**, v. 97, p. 9329-9334, 2000.
- BLANEY, W. M.; SIMMONDS, M. S. J. Electrophysiological activity in insects in response to antifeedants. **Tropical Development and Resources Institute**, London, 1983.
- BOLETIM de Pesquisa de Soja. Fundação MT – Rondonópolis, 2007. v.11.
- BOWERS JÚNIOR, G. R. Registration of crockett soybean. **Crop Sci**, v. 30, p. 427, 1990.

CASTIGLIONI, E. A. R.; VENDRAMIM, J. D. Não-preferência para alimentação e oviposição de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, em genótipos de soja. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 72, n. 1, p. 99-112, 1997.

CAVALI, J. L.; DIAS, W. P. **Genética da resistência da soja à raça 4⁺ do nematóide de cisto. *Heterodera glycines***. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras.

CHALKER-SCOTT, L.; KRAHMER, R. L. Microscopic studies of tannin formation and distribution in plant tissues. In: HEMINGWAY, R. W.; KARCHESY, J. J. (eds). **Chemistry and significance of condensed tannins**. New York: Plenum Press, 1989. p. 345–368.

CHIARI, L. et al. Inheritance of isoflavone contents in soybean seeds. **Euphytica**, v. 150, n. 1-2, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/q820482508783273/>>. Acesso em: 20 jul. 2008.

CHEN, K. et al. Termite feeding deterrent from japanese larch wood. **Bioresource Technol**, v. 95, p. 129-134, 2004.

CLARK, W. J.; HARRIS, F. A.; MAXWELL, F. G.; HARTWIG, E. E. Resistance of certain soybean cultivars to bean leaf beetle, striped blister beetle, and bollworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 65, p. 1669-1672, 1972.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos – décimo levantamento, julho 2008**. Brasília: CONAB, 2008. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo_safra.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2008.

CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2006.

DUYN, J. W. et al. Resistance in soybeans to the Mexican bean beetle. I. Sources of resistance. **Crop Sci.**, v. 11, p. 572-573, 1971.

EDWARDS, P. J.; WRATTEN, S. D. Ecologia das interações entre insetos e plantas. São Paulo: EDUSP, 1980.

ELLISOR, L. O.; GRAHAM, L. T. A recent pest of alfafa. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, v. 30, n. 2, p. 278-280, 1937.

ERMAKOV, A. I. Rich rutin (vitamin P) sources. Byull. Usesoyuz Inst. Rasteniievodstva. **Chemical Abst.**, v. 3, p. 3-9, 1958.

FEHR, W. R. et al. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill. **Crop Sci.**, v. 11, p. 929-931, 1971.

FORDYCE, J. A.; AGRAWAL, A. A. The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defense of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. **Journal Animal Ecol**, v. 70, p. 997-1005, 2001.

- FREY, M. et al. An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, n. 26, p. 14801–14806, 2000.
- FUGI, C, G, Q. **Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* hübner, 1818 em genótipos de soja com diferentes graus de resistência a insetos.** 2003. 59f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico, Campinas – SP.
- GATEHOUSE, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytologist**: v. 156, p. 145–169, 2002.
- GAZZONI, D. L.; HULSMeyer, A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Efeito de diferentes doses de rutina e quercitina na biologia de *Anticarsia gemmatalis*. **Pesq. Agro. Bras**, v.32, p. 673-681, 1997.
- GILMAR, D. F. et al. Resistance in soybeans to the southern green stink bug. **Crop Sci**, v. 22, p. 573-576, 1982.
- GRIFFITH, J. Q.; KREWSON, C. F.; NAGHSKI, J. **Rutin and related flavonoids.** Easton, Pennsylvania, USA, 1955.
- HARBORNE, J. B. Variation in and functional significance of phenolic conjugation in plants. Recent advances in Phytochemistry. **Plant phys. and biochem.**, v. 12, p. 457-474, 1977.
- HARBORNE, J. B.; GRAYER, R. J. Flavonoids and insects. In: HARBORNE, J. B (ed). **The flavonoids: advances in research since.** London: Chapman & Hall, 1993.
- HARTWIG, E. E.; LAMBERT, L.; KILEN, T. C. Registration of 'Lamar' soybean. **Crop Sci**, v. 30, p. 231, 1990.
- HARUTA, M. et al. Kuntz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Mol. Biol**: v. 46, p. 347-359, 2001.
- HAUKIOJA, E.; OSSIPOV, V.; LEMPA, K. Interactive effects of leaf maturation and phenolics on consumption and growth of a geometric moth. **Entomol. Exp. Appl.**, v.104, p. 125-136, 2002.
- HEDIN, P. A. Developing research trends in the chemistry of plant resistance to pests. In: GREEN, M. B.; HEDIN, P. A. (Ed). **Natural resistance of plants to pests: roles allelochemicals.** Washington: American Chemical Society, 1986. p. 1-14.
- HERZOG, D. C.; TODD, J. W. Sampling Velvetbean Caterpillar on Soybean. In: KOGAN, M.; HERZOG, D. C. ed. **Sampling methods in soybean entomology.** New York: Springer Verlag, 1980. p. 107-40.
- Hill, C. B.; LI, Y.; HARTMAN, G. L. A single dominant gene for resistance to the soybean aphid in the soybean cultivar Dowling. **Crop Sci**, v. 46, p. 1601–1605, 2006.
- HINDS, W. E.; OSTERBERGER, B. A. The soybean caterpillar in Louisiana. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, v. 24, n. 6, p. 1168-1173, 1931.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MAZZARIN, R. M.; LUSTOSA, P. R. Mecanismos de resistência de genótipos de soja: teste de não-preferência para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (LEP.: NOCTUIDAE). **Pesq. Agro. Bras.**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 513-519, 1994.

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

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; GAZZONI, D. L.; TOLEDO, J. F. F. Comparação de métodos para avaliação de linhagens de soja (*Glycine max* Merrill) resistentes a percevejos (Hemiptera: Pentatomidae). **Pesq. Agro. Bras.** v. 31, n. 5, p. 305-316, 1996.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. et al. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. (Circular Técnica, n.30).

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; HARBORNE, J. B.; MCAFFERY, A. R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomol. Exp. Applic.** v. 98, p. 181-194, 2001.

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

HOFFMANN-CAMPO, C. B. et al. Detrimental effect of rutina on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesq. Agro. Bras.** v. 41, p. 1453-1459, 2006.

ISMAN, M. B.; DUFFEY, S. S. Toxicity of tomato phenolic compounds to the fruitworm, *Heliothis zea*. **Entomol. Exp. Appl.** v. 31, p. 370-376, 1982.

JUNG, W. et al. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 208–212, 2000.

KIIHL, R. A. S.; BAYS, I. A.; ALMEIDA, L. A. Soybean breeding for the brazilian tropics. In: MIRANDA, Z. F. S. **Base genética de cultivares de soja no Brasil**. Londrina, PR, 286p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, 2005.

KILEN, T. C.; LAMBERT, L. Evidence for different genes controlling insect resistance in three soybean genotypes. **Crop Sci**: v. 26, p. 869-871, 1986.

KILEN, T. C.; LAMBERT, L. Genetic control of insect resistance in soybean germplasm PI 417061. **Crop Sci**., v. 38, p. 652–654, 1998.

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

KOGAN, M. Plant resistance in pest management. In: METCALF, R. L.; LUCKMANN, W. H. **Introduction to insect pest management**. New York: Wiley Interscience, 1982. p. 93-134.

- KOGAN, M.; PAXTON, J. Natural inducers of plant resistance to insects. In: HEDIN, P. A. **Plant resistance to insects**. Washington D.C.: American Chemical Society, 1983. p. 153-171.
- KUBO, I.; HANKE, F. G. Chemical methods for isolating and identifying phytochemicals biologically active in insects. In: MILLER, J. R.; MILLER, T. A. (Eds.). **Insect- plant interactions**. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 225-249.
- LIMA, A. C. S.; LARA, F. M. Resistência de genótipos de soja à mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotrop. Entomol.** v. 33, n. 1, p. 71-75, 2004.
- LOURENÇÃO, A. L.; ROSSETTO, C. J.; MIRANDA, M. A. C. Resistência de soja a Insetos: IV. Comportamento de cultivares e linhagens em relação à *Hedilepta Indicata* (Fabr.). **Bragantia**, Campinas, v. 44, n. 1, p. 149-157, 1985.
- LOURENÇÃO, A. L.; MIRANDA, M. C. A. Resistência de soja a insetos: VIII. IAC 78-2318, linhagem com resistência múltipla. **Bragantia**, v. 46, n. 1, p. 65-72, 1987.
- LOURENÇÃO, A. L.; COSTA, A. S.; PARRA, J. R. P.; AMBROSANO, G. M. B. Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* Hübn. em soja sadia e infectada com o vírus do mosaico comum (SMV). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, n. 1, p. 47-57, 1996.
- LUEDDERS, V. D.; DICKERSON, W. A. Resistance of selected soybean genotypes and segregating populations to cabbage looper feeding. **Crop Sci.** v. 17, p. 395-397, 1977.
- MACHADO, V. O. F. et al. Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de soja (*Glycine max* Merrill). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 29, n. 1, p. 39-41, 1999.
- MAGRINI, E. A.; BOTELHO, P. S. M.; SILEIRA, N. S. Biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja. **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 3, p. 547-555, 1999.
- MARKHAM, K. R. Flavones, flavonols and their glycosides. In: DEY, P. M., HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, 1989. p.197-235.
- MATHER, K.; JINKS, J. L. **Biometrical genetics**. 3.ed. London, 1982.
- MEKSEM, K. et al. Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content. **J. Biomed. Biotechnol.** v. 1, p. 38-44, 2001.
- MIRANDA, M. A. C. de. et al. Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-24, resistente a insetos. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, p. 29-37, 2003a.
- MIRANDA, M. A. C. de. et al. Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-23, resistente a insetos. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, p. 19-27, 2003b.

- MIRANDA, Z. F. S. **Base genética de cultivares de soja no Brasil**. 2005. 871f. v.1. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual de Londrina.
- MOORE, J. P. et al. The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3,4,5 tri-*O*-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical induced oxidation. **The Biochemical Journal**, v. 385, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1134698>>. Acesso em: 23 maio 2008.
- MOSCARDI, F. **Effect of soybean crop phenology on development, leaf consumption and oviposition of *Anticarsia gemmatalis* Hübner**. Gainesville, 1979. 139p. (Ph. D. – University of Florida).
- NARVEL, J. M. et al. A retrospective DNA marker assessment of the development of insect resistant soybean. **Crop Sci**, v. 41, p. 1931–1939, 2001.
- OLIVEIRA, C. J.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MAZZARIN, R. M. Aspectos biológicos e nutricionais de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner), 1818 (Lep. Noctuidae) em diversos genótipos de soja. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, n. 3, p. 547-552, 1993.
- OLIVEIRA, M. F. **Análise e previsão do potencial genético de um cruzamento de soja usando vários delineamentos em três épocas de semeadura**. 1994. 114p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Pr.
- ORTEGA, G. G. **Química e toxicidade do Timbó *Ateleia glazioviana* Baillon, Leguminosae-Papilionoideae**. Porto Alegre, 185p. (Mestrado em Análise, Síntese e Controle de Medicamentos) Programa de Pós-graduação em Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1985.
- PAINTER, R.H. Insect resistance in crop plants. New York: MacMillan, 1951.
- PANIZZI, A. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. **Trends in Entomology**, v. 1, p. 71-88, 1997.
- PASCALE, A. J. Tipos agroclimáticos para el cultivo de la soya en la Argentina. **Revista de la Facultad de Agronomía e Veterinaria**, Buenos Aires, v. 17, p. 31-38, 1969.
- PIUBELLI, G. C., et al. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 5, p. 1223-1233, 2003.
- PIUBELLI, G. C. **Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais**. 2004. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- PIUBELLI, G. C. et al. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 1515-1531, 2005.

- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; ZIMMERMANN, M. J. O. **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento de feijoeiro**. Goiânia: UFG, 1993.
- REYMOND, P. et al. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 12, p. 707-719, 2000.
- REYNOLDS, G. W.; SMITH, C. M. Effects of leaf position, leaf wounding, and plant age of two soybean genotypes on soybean looper (Lepidoptera, Noctuidae) growth. **Environmental Entomology**, College Park, v. 14, n. 4, p. 475-478, 1985.
- ROSSETTO, C. J. et al. Integration of resistance cultivar and date of plant for cultivation of soybean with reduced use of insecticides. In Conferência Mundial de Investigación en soja, 4. 1989. **Proceedings. Association Argentina de la Soja**, Buenos Aires, v. 4, p.1582-7, 1989.
- ROWAN, G. B. et al. 1991. Soybean cultivar resistance to defoliating insects. **Crop Sci.**, v. 31, p. 678–682, 1991.
- SALVADOR, M. C. **Efeito de genótipos de soja e de flavonóides na biologia e no intestino médio de *Anticarsia gemmatalis***. 2008. 116 f. Dissertação (Mestrado em agronomia) – Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- SHARMA, H.; NORRIS, D. M. Chemical basis of resistance in soya bean to cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **J. Sci. Food Agr.**, v. 55, p. 353-364, 1991.
- SHAVER, T. N.; LUKEFAHR, M. F. Effect of flavonoid pigment and gossypol on growth and development of the bollworm, tobacco budworm and pink bollworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 62, p. 512-513, 1969.
- SIMMONDS, M. S. J. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. **Phytoch.** v. 56, p. 245-252, 2001.
- SIMMONDS, M. S. J. Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. **Phytoch**, v. 64, p. 21-30, 2003.
- SISSON, V. A., et al. Evidence of inheritance of resistance to the Mexican bean beetle (*Epilachna varivestis*) in soybeans. **Crop Sci**, v. 16, p. 835–837, 1976.
- SONDHEIMER, E. Chlorogenic acid and related depsides. **Botanical Review**, v. 30, p. 646-667, 1964.
- SOSA-GOMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genet. Mol. Biol.** v. 27, n. 3, p. 378–384, 2004.
- STAMP, N. E.; YANG, Y. Response of insect herbivores to multiple allelochemicals under different thermal regimes. **Ecology**, v. 77, p. 1088-1102, 1996.

STAMP, N. E.; HORWATH, K. L. Interactive effects of temperature and concentration of the flavonol rutin on growth, molt and food utilization of *Manduca sexta* caterpillars. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 64, p. 135-150, 1992.

STAMP, N. E.; SKROBOLA, C. M. Failure to avoid rutin diets results in altered food utilization and reduced growth rate of *Manduca sexta* larvae. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 68, p. 127-142, 1993.

TARRAGÓ, M. F. S.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, S.; BARBIN, D. Influência de fatores ecológicos na flutuação populacional das lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, e *Rachiplusia nu* (Guen.) em Santa Maria-RS. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 6, n. 2, p. 180-193, 1977.

TECNOLOGIAS de produção de soja – Paraná – 2003. Londrina: Embrapa Soja, 2002.

THOISON, O. et al. Insect antifeedant compounds from *Nothofagus dombeyi* and *N. pumilio*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2173-2176, 2004.

TOLEDO, J. F. F. Programa de computador para estimar parâmetros genéticos, componentes de médias e variâncias pelo método dos quadrados mínimos ponderados. **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 26, p. 1023-1029, 1991.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, p. 147-157, 2006.

TURNIPSEED, S. G.; KOGAN, M. Soybean entomology. **Annual Review of entomology**, Palo Alto, v. 21, p. 247-282, 1976.

USDA. United status Department Of agricultura. 2008. **Foreing Agricultural Service**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/wap/circular/2008/08-06/productionfull06-08.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2008.

VALLE, G. E.; LOURENÇÃO, A. L. Resistência de genótipos de soja a *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 31, p. 285-295, 2002.

WILLE, J. E. **Entomologia agricola del Peru**. Lima: Estacion Experimental Agrícola de la Molina, 1943.

YAN, L. et al. Soybean defense responses to the soybean aphid. **New Phytologist**, v. 179, p. 185-195, 2008.