



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NORBERTO APARECIDO DA CRUZ

**DESENVOLVIMENTO BIOLÓGICO E ALTERAÇÕES
MORFOFISIOLÓGICAS NO INTESTINO MÉDIO DA
LAGARTA DA SOJA *Anticarsia gemmatalis* RESISTENTES AO
BACULOVÍRUS *AgMNPV* ALIMENTADAS COM
GENÓTIPOS DE SOJA**

Londrina
2014

NORBERTO APARECIDO DA CRUZ

**DESENVOLVIMENTO BIOLÓGICO E ALTERAÇÕES
MORFOFISIOLÓGICAS NO INTESTINO MÉDIO DA
LAGARTA DA SOJA *Anticarsia gemmatalis* RESISTENTES AO
BACULOVÍRUS *AgMNPV* ALIMENTADAS COM
GENÓTIPOS DE SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador(a): Prof. Dr^a. Ângela Maria Ferreira
Falleiros

Co-Orientador(a): Dr^a. Clara Beatriz Hoffmann-
Campo

Londrina
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C957d Cruz, Norberto Aparecido da.
Desenvolvimento biológico e alterações morfofisiológicas no intestino médio da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* resistentes ao baculovírus AgMNPV alimentadas com genótipos de soja / Norberto Aparecido da Cruz. – Londrina, 2014.
142 f. : il.

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

1. Lagarta da soja – Teses. 2. Inseto – Intestino médio – Morfologia – Teses. 3. Soja – Resistência aos insetos – Teses. 4. Plantas transgênicas – Teses. 5. Histoquímica – Teses. I. Falleiros, Ângela Maria Ferreira. II. Hoffmann-Campo, Clara Beatriz. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 595.78

NORBERTO APARECIDO DA CRUZ

**DESENVOLVIMENTO BIOLÓGICO E ALTERAÇÕES
MORFOFISIOLÓGICAS NO INTESTINO MÉDIO DA LAGARTA DA
SOJA *Anticarsia gemmatalis* RESISTENTES AO BACULOVÍRUS
AgMNPV ALIMENTADAS COM GENÓTIPOS DE SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina

BANCA EXAMINADORA

Orientadora. Dra. Ângela Maria Ferreira Falleiros
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Daniela Oliveira Pinheiro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Fernanda Pacheco Lassance
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Maria Cristina Neves de Oliveira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
EMBRAPA Soja

Dra. Sheila Michele Levy
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 24 de Fevereiro de 2014.

Aos meus pais Galdino Fernandez e Josefa Pereira
pelos ensinamentos, dedicação, carinho, apoio
durante todos esses anos

Aos meus irmãos Márcia, Márcio e Vanilda pelo
companheirismo e apoio.

Amo vocês

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua eterna bondade, grandiosidade infinita, proteção e conforto durante os momentos difíceis dessa jornada.

Agradeço a minha orientadora Ângela Maria Ferreira Falleiros não só pela constante orientação durante esse anos, mas sobretudo pela sua amizade, confiança, paciência e ensinamentos oferecidos na parte acadêmica como de vida.

A Doutora Clara Beatriz Hoffmann-Campo pela sua co-orientação, contribuição e apoio para a realização dos trabalhos com sucesso e êxito, muito obrigado.

A professora Sheila Michele Levy, agradeço a amizade, ensinamentos e dicas para a realização desse trabalho.

A Universidade Estadual de Londrina e Departamento de Pós Graduação pela oportunidade em cursar e concluir o Doutorado em Agronomia, aos professores pelos conhecimentos transmitidos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos durante a realização do curso.

Ao Departamento de Histologia do Centro de Ciências Biológicas pelo espaço, equipamentos cedidos para a realização do processamento e análises dos materiais, e as técnicas do laboratório Andréia e Renata pela ajuda no preparo de soluções e outros reagentes muito obrigado.

Ao Laboratório de Apoio de Ensino e Pesquisa da UEL e ao técnico João por permitir usar as dependências e equipamentos dos laboratórios nos momentos importantes.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura e ao técnico Osvaldo pela ajuda no processamento e na ajuda na captura de imagens dos materiais, fica aqui minha gratidão.

A EMBRAPA Soja Londrina por proporcionar o estágio realizado durante esses anos, espaço físico, materiais para realização com sucesso dos trabalhos, fica aqui meu eterno agradecimento.

Ao Laboratório de Criação Massal de Lagartas, da EMBRAPA Soja pelo fornecimento dos ovos e das larvas de *Anticarsia gemmatilis* para a realização de todos os experimentos.

Ao Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da EMBRAPA Soja pelo espaço cedido para a realização dos bioensaios de pressão de seleção.

Ao Laboratório de Ecologia Química da EMBRAPA Soja pelo auxílio na realização das extrações foliares e pelo fornecimento dos equipamentos e reagentes utilizados em todo o processo.

A Área e Laboratório de Biometria da EMBRAPA Soja por auxiliar nas análises estatísticas apresentadas nesse trabalho em especial a Doutora Maria Cristina Neves de Oliveira pela enorme paciência, ensinamentos estatísticos que foram úteis para ajudar a interpretar todos os dados apresentados.

Aos técnicos e funcionários de laboratórios da EMBRAPA Soja Ivanilda, Miguel, Sérgio, Jovenil, Fábio Paro, Giovani, Moisés, João Alves, Neiva, Alvino, Tânia entre outros sou grato pela imensa colaboração e ajuda durante esses anos..

Aos colegas de estágio e laboratório pela ajuda e pelos momentos de descontração durante esses anos José, Tatiana, Mayara, Pâmela, Marcos, Tássia, Mariana, Simone, Allan, Marcela, Lillian, Louise, Maurício, Denise, Pablo muito obrigado.

Aos ex-companheiros de república Mário, Ricardo, Tiago, Cláudio, Orismar, Danilo, Mateus, Fred e Pedro e aos atuais companheiros Adriano, Gustavo e Carlos Alberto que foram e são a minha família aqui em Londrina.

Aos novos amigos conquistados Bruno, Murilo, Carlos Bejatto, Luiz Fernando, Leandro, Robson, Juninho, Rodrigo, Henrique, Rafael, Renato, Gilmar, Jean, Cris, Sabrina, Maria Betteto, Fabíola, Talita, Jéssica, Renata, Carol, entre vários outros que compartilharam de muitos bons momentos durante esses anos.

Ao grupo especial de amigos Adriano (Tio Dri), Fausto (Perci), Tiago (Cumprido), Maico (Tibiriçu), Débora (Jodinei), Karine (Pombinha), Carla (James), Mariana (Mari) e Taís (Hóris) que proporcionaram os melhores momentos durante esses últimos tempos, muito obrigado pelo companherismo e pelas viagens.

As famílias Mello, Mantovani e Moraes por terem me acolhido como membro e parte de suas famílias fica aqui minha eterna e imensa gratidão e o meu agradecimento por todo apoio e carinho proporcionado.

Muito obrigado a todos !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

**“O verdadeiro líder não forma seguidores, forma
outros líderes”
(Augusto Cury)**

CRUZ, N. A. **Desenvolvimento biológico e alterações morfofisiológicas no intestino médio da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* resistente ao baculovírus AgMNPV alimentadas com genótipos de soja.** 2014. 142 f. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* é uma das principais pragas da cultura da soja e devido a sua importância torna-se desejável o aumento da resistência da soja ao ataque da lagarta. Para o seu controle alguns métodos são empregados como a utilização de plantas resistentes a insetos; transgênicas com característica de resistência a insetos e tolerância a outros fatores e os inseticidas a base de nucleopoliedrovírus. O baculovírus infecta a lagarta e quando encontra condições ideais, reduz a população da praga, podendo ser utilizado como bioinseticida, no entanto, as lagartas podem desenvolver resistência à infecção. O intestino médio (IM) é considerado o órgão alvo do processamento da ingesta destes produtos, onde os mesmos, após seu processamento poderão causar distúrbios prejudicando o desenvolvimento dos insetos. Poucos são os estudos realizados em relação às alterações da morfologia, principalmente na histologia e histoquímica do IM, em diferentes gerações de larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. O presente estudo objetivou: identificar, quantificar e verificar os efeitos dos metabólitos secundários foliares presentes nos genótipos de soja e na variedade transgênica BRS 359 RR, os aspectos biológicos e morfológicos de diferentes gerações larvais de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. As gerações resistentes foram obtidas através de bioensaios de pressão de seleção, no qual, as larvas foram tratadas com genótipos de soja “in natura” BRS 257, BRS 16 Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687 e BRS 359 RR. Os ovos de *A. gemmatalis* foram colocados em caixa gerbox contendo folha de soja dos respectivos tratamentos até a eclosão. Para os ensaios de biologia as larvas de 2^o/3^o ínstar foram acondicionadas individualmente em placas de Petri contendo um folíolo retirado de folhas no estágio V5 de cada tratamento e acondicionadas em laboratório em B.O.D. As larvas foram tratadas e avaliadas os parâmetros biológicos diariamente até o estágio de pupa. Para a histologia e histoquímica os IM das larvas de 3^o/4^o instar foram coletados, fixados em Karnovsky; processados para técnicas histológicas e histoquímicas específicas e analisados ao microscópio de luz. Os genótipos resistentes a insetos Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687 e a soja transgênica BRS 359 RR, influenciaram negativamente nos aspectos biológicos das larvas, e causaram alterações morfológicas no IM, principalmente na camada epitelial, e na sua composição histoquímica das células. As alterações promovidas pelos genótipos com características de resistência a insetos estão relacionados principalmente aos flavonoides rutina e genistina, encontrados na sua composição química foliar em diferentes concentrações. A soja transgênica BRS 359 RR não apresentou os flavonoides em sua composição, porém a presença de outros compostos pode ter influenciado negativamente nessas larvas. Dessa forma podemos inferir que os genótipos PI 229358 e PI 227687 são recomendados para o programa de melhoramento de plantas, enquanto que as cultivares IAC 100, Dowling e BRS 359 RR são recomendadas para o plantio em campo, pois todos estes tratamentos promovem alterações que influenciam na quebra da resistência das larvas de *A. gemmatalis* em relação ao vírus.

Palavras-chave: Morfologia. Histoquímica. Plantas resistentes. Transgênicos. Nucleopoliedrovirus

CRUZ, N. A. **Biological development and changes morphophysiological in the midgut velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* resistant to baculovirus *agmpv* fed with genotypes of soybean**. 2014. 142 p. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* is a major pest of soybean and due to its importance becomes desirable to increase the resistance of soybean caterpillar attack. To control some methods are employed as the use of insect-resistant plants; transgenic trait with resistance to insect and tolerance and other factors to insecticides based nucleopolyhedrovirus. The baculovirus infects the caterpillar and when it finds optimal conditions reduces the pest population, can be used as bioinsecticide, however, the worms may develop resistance to infection. The midgut (IM) is considered the target organ processing the ingestion of these products, where even after processing may cause disturbances, negatively impairing our the development of insects. Few studies have been conducted in relation to the alteration morphology, especially in histology and histochemical, mainly in the IM, in different generations of larvae of *A. gemmatalis* resistant to *AgMNPV*. The present study aimed to identify, quantify and analyse the effects of foliar secondary metabolites in soybean genotypes and transgenic variety BRS 359 RR, in biological and morphological aspects of different generations of larval *A. gemmatalis* resistant *AgMNPV*. Resistant generations were obtained from bioassays of selection pressure, in which the larvae were treated with soybean genotypes "in natura" BRS 257, BRS 16 Dowling, PI 229358 and PI 227687 IAC 100 and BRS 359 RR. The eggs were placed in *A. gemmatalis* in gerbox boxes containing soybean leaves their treatments until hatching. For bioassays larvae 2nd/3rd instar larvae were placed individually in Petri dishes containing one leaflet taken from leaves V5 stage of each treatment maintained and put at laboratory BOD. Larvae were fed and their biological parameters were daily evaluated until the pupal stage. For histology and immunohistochemistry IM larvae 3rd/4th instar were collected, fixed in Karnovsky; processed for histological and immunohistochemical techniques specific and analyzed using by light microscopy. The resistant genotypes Dowling, PI 229358 and PI 227687 IAC 100 and the transgenic soybean BRS 359 RR, negatively influenced the biological aspects of larvae, and caused morphological changes in IM, mainly in the epithelial layer, and in the histochemical composition of cells. The changes caused by genotypes with characteristics of insect resistance mainly related to the flavonoids rutin and genistin, found in its foliar chemical at different concentrations. Transgenic soybean BRS 359 RR did not presented these flavonoids in its composition, but the likely other compounds may have negative influence these larvae biology. Thus we can conclude that PI 229358 and PI 227687 genotypes are recommended for the program of plant breeding to improve the resistance of plant to *A. gemmatalis*, while IAC 100, Dowling and BRS 359 RR cultivars are recommended planting in the field, because all these treatments promote changes that influence the breakdown strength of the larvae of *A. gemmatalis* compared to the virus.

Keywords: Morphology. Immunohistochemistry. Resistant plants. Transgenic. Nucleopolyhedrovirus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 3.1** –Relação entre peso de pupa (mg) e tempo de alimentação (dias) de larvas da 40^a geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV..... 49
- Figura 3.2** –Relação entre alimento consumido (mg) e tempo de alimentação (dias) de larvas da 40^a geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV..... 50
- Figura 3.3** –Relação entre quantidade o peso seco de pupa (mg) e o peso seco inicial (mg) da 40^a geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja..... 51
- Figura 3.4** –Relação entre peso de pupa (mg) e alimento ingerido (mg) da 40^a geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja 52
- Figura 3.5** –Relação entre peso de pupa (mg) e alimento digerido (dias) da 40^a geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja 53
- Figura 3.6** –Relação entre peso de fezes (mg) e alimento consumido ou consumo (mg) da 40^a geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja..... 54
- Figura 3.7** –Concentração (ng/mg) (média ± EP) de flavonoides nos genótipos de soja..... 55
- Figura 4.1** –Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 15^a geração de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina e Eosina (H-E). Barra = 10µm..... 81
- Figura 4.2** –Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 25^a geração de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina Harris e Eosina. Barra = 10µm 82
- Figura 4.3** –Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 40^a geração de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina e Eosina (H-E). Barra = 10µm..... 83
- Figura 4.4** –Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 180^a geração de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina e Eosina (H-E). Barras = 20µm 84

- Figura 4.5** –Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 15^a (A, B, C, D) e 25^a (E, F) gerações de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV.Histoquímica para detecção de polissacarídeos neutros (PAS). Tratamentos BRS 257 (A); BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); BRS 257 (E) e PI 229358 (F) Barras = 10µm 85
- Figura 4.6** –Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 40^a geração de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A); BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica para detecção de polissacarídeos neutros (PAS). Barra = 10µm..... 86
- Figura 4.7** –Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 180^a geração de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A); BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica para detecção de polissacarídeos neutros (PAS). Barra = 10µm..... 87
- Figura 4.8** –Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 15^a (A, B, C) e 40^a (D, E, F, G) gerações de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Histoquímica para detecção de glicogênio após digestão pela α -amilase. Barra = 10µm..... 88
- Figura 5.1** –Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 25^a (A, B, C) e 40^a (D, E, F) gerações de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina Harris e Eosina (H-E). Barras = 10µm..... 112
- Figura 5.2** –Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 25^a (A, B, C) e 40^a (D, E, F, G) geração de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os diferentes genótipos. Histoquímica para detecção de polissacarídeos neutros (PAS) e exclusão do glicogênio. Barra = 10µm..... 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Genótipos de soja resistentes e as concentrações de flavonoides em ng/mg.....	39
Tabela 3.2 – Tempo de desenvolvimento total (dias) (Média ± EP) e porcentagem de mortalidade total no desenvolvimento da 40ª geração de <i>A. gemmatalis</i> resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja.....	46
Tabela 3.3 – Peso seco inicial de larvas de 2º/3º instar (mg), peso seco de pupa (mg), consumo foliar (mg), peso seco de fezes (mg), alimento digerido (mg), tempo total de alimentação (dias) (Média ± EP) da 40ª geração de <i>A. gemmatalis</i> resistente ao AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja.....	47
Tabela 3.4 – Análise de Covariância (ANCOVA) para avaliação dos efeitos dos tratamentos no ajuste de peso de pupa pelas covariáveis tempo de alimentação (a) peso inicial (c), alimento digerido (d) alimento consumido (e); alimento consumido; pela covariável tempo de alimentação (a), peso de fezes pelas covariável alimento consumido (e) na 40ª geração de <i>A. gemmatalis</i> resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV.....	48
Tabela 3.5 – Concentração (ng/mg) (média ± EP) de flavonoides nos genótipos de soja.....	55
Tabela 4.1 – Gerações de <i>Anticarsia gemmatalis</i> resistente ao AgMNPV, concentração do vírus e taxa de resistência.....	70
Tabela 4.2 – Genótipos de soja resistentes e as concentrações de rutina e genistina em ng/MG.....	71
Tabela 4.3 – Avaliação das alterações causadas pelos flavonoides rutina e genistina na membrana peritrófica e nas células colunares (Co) de quatro gerações larvais de <i>Anticarsia gemmatalis</i> resistentes ao nucleopoliedrovírus AgMNPV.....	74
Tabela 4.4 – Avaliação das alterações causadas pelos flavonoides rutina e genistina nas células caliciformes (Ca) regenerativas (Cr) de quatro gerações larvais de <i>Anticarsia gemmatalis</i> resistentes ao nucleopoliedrovírus AgMNPV.....	75

Tabela 4.5 – Avaliação da reação do PAS para detecção de polissacarídeos neutros na membrana peritrófica (MP) e células colunares (Co) de quatro gerações larvais de <i>Anticarsia gemmatalis</i> resistentes ao nucleopoledrovírus AgMNPV	77
Tabela 4.6 – Avaliação da reação do PAS para detecção de polissacarídeos neutros nas células caliciformes (Ca) e regenerativas (Cr) de quatro gerações larvais de <i>Anticarsia gemmatalis</i> resistentes ao nucleopoliedrovírus AgMNPV	78
Tabela 4.7 – Avaliação da amilase para detecção de glicogênio nas células colunares de quatro gerações larvais de <i>Anticarsia gemmatalis</i> resistentes ao nucleopoledrovírus AgMNPV	79
Tabela 4.8 – Avaliação da amilase para detecção de glicogênio nas células caliciformes de quatro gerações larvais de <i>Anticarsia gemmatalis</i> resistentes ao nucleopoliedrovírus AgMNPV	80
Tabela 5.1 – Gerações de <i>A. gemmatalis</i> resistente ao AgMNPV, concentração do vírus e taxa de resistência (porcentagem).....	105
Tabela 5.2 – Genótipos de soja resistentes e as concentrações de rutina e genistina em ng/MG.....	106
Tabela 5.3 – Avaliação das alterações causadas pela ingesta da cultivar de soja resistente a insetos (IAC 100) e da cultivar transgênica (BRS 359 RR), em relação ao controle (BR 16) no epitélio do IM de duas gerações de larvas resistentes ao AgMNPV	109
Tabela 5.4 – Avaliação das alterações causadas pela ingesta da cultivar de soja resistente a insetos (IAC 100) e da cultivar transgênica (BRS 359 RR), em relação ao controle (BR 16) no epitélio do IM de duas gerações de larvas resistentes ao AgMNPV	109
Tabela 5.5 – Resultados da reação do PAS para detecção de polissacarídeos neutros no intestino médio (IM) de duas gerações de larvas resistentes de <i>A. gemmatalis</i> ao AgMNPV	110
Tabela 5.6 – Resultados da digestão pela alfa amilase para detecção de glicogênio no intestino médio (IM) em duas gerações de larvas resistentes de <i>A. gemmatalis</i> ao AgMNPV	111

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	ASPECTOS GERAIS	18
2.2	CONTROLE COM ANTICARSIA GEMMATALIS MÚLTIPLO NUCLEOPOLIEDROVÍRUS (AGMNPV)	20
2.3	PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS (TRANSGÊNICAS).....	23
2.4	RESISTÊNCIA DE PLANTAS A INSETOS.....	26
2.5	CANAL ALIMENTAR DE LARVAS DE ANTICARSIA GEMMATALIS.....	29
2.6	RESISTÊNCIA DE ANTICARSIA GEMMATALIS AO NUCLEOPOLIEDROVÍRUS (AGMNPV).....	31
3	ARTIGO A: ASPECTOS BIOLÓGICOS DA 40ª GERAÇÃO DE Anticarsia gemmatalis (HÜBNER: 1818) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) RESISTENTES AO NUCLEOPOLIEDROVIRUS AgMNPV EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA	35
3.1	RESUMO	35
3.2	ABSTRACT	36
3.3	INTRODUÇÃO.....	37
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.5	RESULTADOS	45
3.6	DISCUSSÃO	55
3.7	CONCLUSÕES.....	65
4	ARTIGO B: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM GERAÇÕES LARVAIS, DOS EFEITOS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA NO INTESTINO MÉDIO DE Anticarsia gemmatalis (HÜBNER, 1818) RESISTENTES AO VÍRUS AgMNPV	66
4.1	RESUMO	66
4.2	ABSTRACT	67
4.3	INTRODUÇÃO.....	68
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	70

4.5	RESULTADOS	73
4.6	DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	81
4.7	DISCUSSÃO	89
4.8	CONCLUSÕES	99
5	ARTIGO C: EFEITOS DA SOJA CONVENCIONAL, RESISTENTE A INSETOS E TRANSGÊNICA NO INTESTINO MÉDIO EM GERAÇÕES DE LARVAS DE <i>Anticarsia gemmatilis</i> RESISTENTES AO VÍRUS AgMNPV: ANÁLISE COMPARATIVA	101
5.1	RESUMO	101
5.2	ABSTRACT	102
5.3	INTRODUÇÃO	103
5.4	MATERIAL E MÉTODOS	105
5.5	RESULTADOS	108
5.6	DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	112
5.7	DISCUSSÃO	114
5.8	CONCLUSÕES	120
7	CONCLUSÕES GERAIS	121
	REFERÊNCIAS	123

1 INTRODUÇÃO

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Hübner:1818), é considerada uma das importantes pragas da cultura da soja e se alimenta principalmente das folhas de soja, reduzindo a área foliar, podendo causar redução na produção final de grãos.

Seu controle é realizado através do uso de produtos fitossanitários como sendo considerado o mais eficiente e o mais difundido entre os produtores, devido ao seu rápido efeito em campo. Entretanto, o seu uso indiscriminado tem desencadeado desequilíbrio ecológico, seleção de populações de pragas resistentes a diversas moléculas, contaminação do ambiente e intoxicação dos agricultores.

Visando a redução desses problemas a integração de métodos de controle no combate as pragas denominado de Manejo Integrado de Pragas (MIP) em que as associações dos métodos mais simples (como os tratos culturais) até a utilização de uma tecnologia mais avançada no uso das plantas geneticamente modificadas (transgênicas) vêm garantindo o controle das pragas e proporcionando o sucesso na produção de grãos.

O MIP visa a redução do número de aplicações de produtos fitossanitários em campo, evitando dessa forma o impacto negativo sobre a população de insetos benéficos presentes na cultura, além de proporcionar a redução dos custos finais de produção garantindo uma maior rentabilidade para o produtor e reduzir a contaminação do ambiente e dos alimentos. Seguindo essa filosofia, a junção entre o método de controle biológico utilizando produtos seletivos “natural life” e os bioinseticidas (baculovírus) associados com a utilização de cultivares resistentes e transgênicas, podem ser consideradas como uma forma ideal para o controle de pragas, apresentando algumas características físicas, morfológicas e químicas consideradas essenciais para essa função. O baculovírus é formulado a base do nucleopoliedrovírus AgMNPV, de ocorrência natural na cultura da soja, que age de forma sistêmica, após ingestão desses poliedros pelas larvas, controlando essa praga e agindo de forma persistente no campo.

Outro método de controle é o uso de plantas resistentes e transgênicas, as quais podem apresentar algumas características físicas, morfológicas e químicas consideradas essenciais para essa função. Dentre essas características pode-se chamar a atenção principalmente para a composição química foliar, em que a presença de substâncias químicas possam tornar essas plantas tóxicas, deterrentes e repelentes para as diversas ordens de insetos pragas (LARA, 1991).

Dentre os diversos compostos químicos existentes e produzidos naturalmente pelas plantas, existe um grupo que é resultado do produto do metabolismo secundário das plantas e são chamados de flavonoides, que são responsáveis por afetar a sobrevivência, crescimento, comportamento, a fecundidade ou a fertilidade dos diversos insetos pragas (KUBO; HANKE, 1986; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Desses flavonoides pode-se destacar a rutina e genistina, os quais podem agir negativamente nos insetos. Sabe-se que após a sua ingestão, formam ácidos graxos através da hidrólise de fosfolipídios das membranas, alterando desta forma as barreiras e a permeabilidade das membranas celulares, ocasionando a inibição da digestão (GAZZONI; HÜLSEMEYER; HOFFMANN-CAMPO, 1994).

Esses flavonoides foram identificados pela primeira vez em genótipos de soja como a PI 227687, PI 229358 e PI171451 que apresentavam resistência a algumas espécies de insetos desfolhadores (HOFFMANN-CAMPO; HARBONE; McCAFFERY; et al., 2001).

Em *A. gemmatalis* a associação da rutina e genistina apresentaram efeitos adversos na fisiologia e na biologia dos insetos, provocando a antibiose, redução da sobrevivência, prolongamento do ciclo biológico, e em alguns casos tem elevado a mortalidade em larvas resistentes ao AgMNPV (GAZZONI; HÜLSEMEYER; HOFFMANN-CAMPO, 1997; PIUBELLI, 2004). Em bioensaios realizados com essa mesma espécie foi observada alterações em relação a alguns índices nutricionais dos insetos tendo sido verificado o prolongamento do estágio larval (GAZZONI; TUTIDA, 1996; PIUBELLI et al., 2005).

Esses compostos e as diversas moléculas químicas e biológicas agem diretamente no intestino médio (IM) dos insetos, provocando infecção e diversas alterações decorrentes da ingestão desses compostos, principalmente camada epitelial deste órgão. O IM é considerado a principal via de acesso dos alimentos e dos diversos produtos em geral, e responsável pela absorção dos nutrientes e dos demais compostos.

Além dos flavonoides sabe-se que o vírus (AgMNPV) também agem no IM das larvas de *A. gemmatalis* provocando alterações fisiológicas e biológicas. Esse fato associado aos poucos trabalhos na literatura pertinente que correlacionem os efeitos dos genótipos na quebra da resistência desta praga, os objetivos desse trabalho foram:

- a) verificar os efeitos dos flavonoides rutina e genistina e da soja transgênica (BRS 359 RR) no IM de gerações resistentes (variando de duas a quatro gerações) de larvas de *A. gemmatalis* através da microscopia de luz;

- b) identificar através de técnicas histoquímicas, a composição química constitutivas das células epiteliais nessas gerações;
- c) quantificar, identificar e verificar os efeitos dos flavonoides presente nos genótipos de soja e da variedade transgênica BRS 359 RR, nos aspectos biológicos e fisiológicos da 40^a geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma planta oleaginosa muito valorizada no mercado internacional, devido a sua comercialização e produção de grãos e dos subprodutos oriundos dos grãos, como farelo, óleos, dentre outros, e que são utilizados na alimentação humana, animal e também no setor industrial.

Essa planta de modo geral é cultivada em várias regiões do território brasileiro e independente do clima apresenta como característica fenológica o ciclo de desenvolvimento de 100 a 160 dias aproximadamente, no qual dependendo do grupo de maturação pertencente pode ser dividida em precoce, semi-precoce, médio, semi-tardio e tardio (FEHR; CAVINESS, 1977; VERNETTI, 1983; FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

Durante o desenvolvimento, independente do grupo de maturação e da cultivar, essa planta apresenta dois estágios, sendo o 1º denominado de vegetativo e o 2º de reprodutivo (FEHR; CAVINESS, 1977).

Durante o seu desenvolvimento, a soja pode sofrer a interferência de alguns fatores que prejudicam e/ou limitam a sua produção final como: clima (chuva, temperatura, fotoperíodo), solos (adubação e fertilidade), variedades (recomendadas para cada região), plantas daninhas (competição inicial ou interferência na colheita), doenças (limitantes na redução de área foliar), pragas (parte aérea, raízes e vagens) e manejo da cultura (DEGRANDE; VIVAN, 2012).

Entre os fatores limitantes podemos destacar uma das principais pragas da parte aérea, a lagarta da soja *A. gemmatalis*, pertencente à ordem Lepidoptera, que apresenta o seu desenvolvimento biológico do tipo holometábolo. Esse inseto pode apresentar aproximadamente 47 dias de desenvolvimento (ovo: três dias; larva: 15 dias; pupa: nove dias e adulto: 20 dias) e dependendo dos fatores climáticos ou nutricional podem ultrapassar ou reduzir esse número de dias (FORD et al., 1975; GALLO et al., 2002; HERZOG; TODD, 1980).

Dentre os estágios de desenvolvimento da praga, o larval é considerado o mais prejudicial para a cultura da soja, pois é durante este período que as larvas atacam desde as folhas mais novas das plantas, reduzindo a área fotossintética, muito importante para o

estágio reprodutivo da soja, ou dependendo da infestação podem atacar até as hastes mais finas das plantas (DEGRANDE; VIVAN, 2012; GALLO et al., 2002; GAZZONI; YORINORI, 1995; SOSA-GÓMEZ et al., 2006).

As larvas recém-eclodidas apresentam coloração verde-clara, com hábito mastigador, se alimentando inicialmente das cascas dos ovos e posteriormente de folhas jovens, onde, inicialmente raspam o parênquima foliar ocasionando apenas pequenas manchas claras nas folhas, sendo considerado como período de baixo consumo foliar (DEGRANDE; VIVAN, 2012; GALLO et al., 2002).

Porém, com o desenvolvimento (maiores que 15 mm de comprimento), essas larvas consomem o limbo foliar e as nervuras, deixando pequenas perfurações nas folhas, mas ainda deixam as nervuras centrais e laterais intactas (HERZOG; TODD, 1980; WATSON, 1916). Entretanto é a partir do 4º ao 5º instar que essas larvas apresentam a maior capacidade de desfolha, e em alguns casos, dependendo do nível de infestação podem causar 100% de desfolha, pois estas larvas ficam mais vorazes e mais ativas chegando a consumir em média 100 a 150cm² de área foliar, provocando a redução da área foliar e da taxa fotossintética (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; SOSA-GÓMEZ et al., 2006).

Os maiores danos podem ocorrer no período de estiagem, onde o ressurgimento dessas larvas pode causar o chamado ataque tardio, o qual é considerado o mais danoso, pois durante esse período essas larvas atacam folhas jovens e adultas, e acaba coincidindo com o período após a floração, o qual é determinante para o enchimento das vagens (GAZZONI; YORINORI, 1995).

Dessa maneira para controlar essa e outras pragas que surgem durante o ciclo de desenvolvimento da soja e para manter uma produção de qualidade, muitos dos agricultores lançam mão da utilização do uso de produtos fitossanitários (fungicidas, herbicidas, acaricidas e inseticidas), e muitos desses produtos são de amplo espectro de ação, ou seja, não seletivos e dessa forma acabam interferindo negativamente em populações de insetos benéficas a cultura da soja.

Durante várias décadas o número de aplicações realizadas durante o ciclo da soja variava entre 3 a 10 aplicações por safra, e muitas aplicações eram realizadas de forma inadequada e às vezes desnecessária (GAZZONI et al., 1988). Esse alto número de aplicações desencadeava uma série de efeitos adversos como a contaminação dos solos, rios, intoxicação dos próprios agricultores, ressurgência de pragas, surgimento de pragas secundárias e desequilíbrio ecológico entre outros.

Visando reduzir o número de aplicações e a contaminação ambiental, o Brasil adotou e adaptou um programa baseado no modelo utilizado nos Estados Unidos, que consiste na utilização e associação de várias táticas de controle de pragas, e chegou a um modelo de controle considerado ideal para as condições climáticas brasileira e eficaz, esse modelo acabou denominado de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (GEIER, 1966; KENNEDY, 1967; METCALF, 1976; STERN et al., 1959).

Geralmente as táticas de controle abrange a associação ou a interação de diversos métodos de controle como: uso de inimigos naturais (predadores e parasitóides), o levantamento e monitoramento de pragas através do sistema de amostragem, a aplicação de inseticidas seletivos ou “natural life”, a utilização dos níveis de danos econômicos de insetos, uso do potencial dos patógenos existentes na cultura, utilização de plantas resistentes e de plantas e/ou cultivares geneticamente modificados (transgênicos) (CAMERON, 1971; CLAUSEN, 1972; HOY, 1976; KOGAN, 1976; MADDOX, 1976; VAN DEN BOSCH, 1971; RUESINK; KOGAN, 1994).

Assim, o MIP é caracterizado como um programa simples de manejo que utiliza a associação de todas estas táticas de controle buscando reduzir as perdas causadas pelas pragas e também pelos números excessivos de aplicações, de modo efetivo, economicamente viável e ecologicamente compatível com o meio ambiente (DEGRANDE; VIVAN 2012).

Entre os métodos de controle utilizados na prática do MIP, podemos destacar o controle com a utilização de agentes entomopatogênicos que auxiliam no controle de pragas utilizando bactérias (*Bacillus thuringiensis*); fungo (*Nomurae rileyi*) e o vírus da família Baculoviridae que atacam principalmente a lagarta da soja; a utilização de plantas resistentes e o uso de plantas geneticamente modificadas (CASTRO et al., 1999; DEGRANDE; VIVAN, 2012; KOGAN, 1976; VALLADARES-INGLIS; SOUZA; SHILER, 1998).

2.2 CONTROLE COM ANTICARSIA GEMMATALIS MÚLTIPLO NUCLEOPOLIEDROVÍRUS (AGMNPV)

Durante a implantação do MIP da soja, pesquisas e programas para as principais pragas foram desenvolvidos e implantados em campo. Entretanto, um programa teve destaque na década de 80, no qual um vírus de ocorrência natural na própria cultura realizava o controle de uma importante lagarta desfolhadora, *A. gemmatalis*. Esse vírus de

baixa incidência (cerca de 10%) acabou sendo então incorporado no MIP com grande sucesso e acabou implantado no controle dessa lagarta em várias regiões produtoras (MOSCARDI, 1983).

Esse vírus teve seu primeiro relato em 1962 na cultura da alfafa no Peru. No Brasil, sua primeira ocorrência foi em lavouras de soja em Campinas no ano de 1972 e posteriormente em outras regiões (SOSA-GÓMEZ, 1995). A partir de 1979 foram então implantados os primeiros programas de pesquisa pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja) em associação com a Emater e associação de produtores da região, para a utilização do vírus isolados a partir de lagartas mortas de *A. gemmatalis* (CASTRO et al., 1999; MOSCARDI, 1983).

O *Anticarsia gemmatalis* nucleopoliedrovírus AgMNPV foi utilizado e testado em campo nas safras de 1980/81 e 1981/82 em propriedades comerciais no Paraná e no Rio Grande do Sul. Os resultados foram satisfatórios, pois uma única aplicação era o suficiente para o controle da lagarta da soja, enquanto que a aplicação convencional com produtos químicos eram necessárias cerca 1,3 aplicações em média para controlar as lagartas (MOSCARDI; CÔRREA-FERREIRA, 1985).

O Baculovirus é um vírus de poliedrose nuclear (VNPAg) ou também chamado de AgMNPV, pertencente ao gênero Nucleopoliedrovírus e família Baculoviridae.

A família Baculoviridae é representada por dois gêneros: nucleopoliedrovírus (VPN) e o granulovírus (VG). O primeiro é considerado o maior grupo de vírus dos artrópodes cerca de 20, sendo a maioria isolada da ordem Lepidoptera (TANADA; KAYA, 1993; VALICENTE, 2009). Entretanto, esse vírus é detectado em outras ordens de insetos: Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera, Neuroptera, Trichoptera (BILIMORA, 1991; O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1992).

Ambos os gêneros são compostos basicamente por um capsídeo de forma arredondada. Esse capsídeo é um “core” cilíndrico de DNA e proteína. Dentro desse nucleocapsídeo a fita dupla de DNA se associa com essa proteína básica formando o “core” cilíndrico (CASTRO et al., 1999; MOSCARDI; SOUZA, 2002; VALICENTE, 2009).

O gênero VPN é dividido em dois subgêneros: o “Vírus de Simples Nucleocapsídeo” (SNPV) o qual apresenta um capsídeo por envelope e são responsáveis pela transmissão de célula para célula ou transmissão sistêmica em um mesmo indivíduo; e o segundo chamado de “Vírus de Múltiplos Nucleocapsídeos” (MNPV). No qual são encontrados vários nucleocapsídeos em um envelope comum. Os VG por sua vez possuem apenas um capsídeo por envelope, e as oclusões virais são granulares contendo um ou

raramente dois ou mais vírions por grânulo (GRANADOS; FEDERICI, 1986; HUNTER-FUJITA et al., 1998; VALICENTE, 2009).

Essas oclusões das partículas virais em matriz proteica são extremamente importantes, pois garante a proteção e a transmissão horizontal de inseto para inseto. Dessa forma as oclusões virais podem ser consideradas estruturas de resistência a qual permite que a infectividade do vírus fora do hospedeiro, além de serem importantes para a formulação de bioinseticidas que podem ser utilizados para o controle de pragas (BLISSARD; ROHRMANN, 1990; HUNTER-FUJITA et al., 1998).

A principal rota de infecção do AgMNPV é por via ingestão e a digestão dos poliedros virais que penetram no epitélio intestinal e se multiplicam no núcleo das células. Com a ingestão dos poliedros, a massa proteica é dissolvida no intestino médio dos insetos devido ao pH altamente alcalino (8-11), ocorrendo a liberação dos vírions no lúmen intestinal. Estas partículas infectivas, atravessam a membrana peritrófica do intestino médio, penetram nas células epiteliais mediadas por receptores específicos localizados na membrana de suas microvilosidades (FEDERICI, 1997; GRANADOS; FEDERICI, 1986; KAWANISHI et al., 1972).

Esses nucleocapsídeos são transportados até o núcleo, onde então libera o DNA iniciando o processo de replicação viral. Após a infecção primária, as partículas infectivas atravessam a membrana basal, atingem a hemolinfa e inicia a infecção secundária ou sistêmica, onde atinge outros tecidos como corpo gorduroso, sistema sanguíneo entre outros. A forma oclusa de vírus só começa a ser produzida nos estádios finais de infecção, onde ocorre o envelopamento dos vírions e a produção de novos poliedros (FLIPSEN et al., 1995; MOSCARDI, 1983; VALICENTE, 2009; VOLKMAN, 1997).

As lagartas infectas apresentam mudanças comportamentais e morfológicas que levam a morte do inseto. Estas lagartas apresentam um aspecto descolorido, ficam debilitadas, perdem a capacidade de alimentação (em torno do quarto dia após a infecção), a mobilidade e após o sétimo dia após a aplicação do produto biológico as lagartas morrem (GAZZONI et al., 1981; MOSCARDI, 1983; MOSCARDI; SOUZA, 2002).

A lagarta recém morta apresenta o corpo com coloração amarelo-esbranquiçado, com textura mole, e com o passar dos dias ocorre o escurecimento desse tegumento, com rompimento e a liberação de vírus sobre as folhas, possibilitando novos ciclos de infecção (FEDERICI, 1997; MOSCARDI, 1983; MOSCARDI; SOUZA, 2002).

Apesar do fato do vírus ser altamente eficiente alguns fatores levaram a pouca utilização ou mesmo o próprio desuso em campo pelos produtores, e também o

desinteresse por parte de empresas particulares que visam a produção e comercialização desse produto. Entre os diversos fatores pode-se citar: o ciclo total de infecção desde a ingestão dos poliedros pelo inseto até a sua morte que tem duração média de sete a dez dias; a alta especificidade do vírus (geralmente uma espécie praga por cultura); alta sensibilidade dos poliedros virais à radiação solar o qual desativa o vírus entre dois a cinco dias após aplicação levando então essa alta sensibilidade dos poliedros a necessidade da adição de protetores solares às formulações onerando os custos de produção (MOSCARDI; SOUZA, 2002; DEGRANDE; VIVAN; 2012).

2.3 PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS (TRANSGÊNICAS)

Plantas geneticamente modificadas (transgênicas) são uma alternativa para o manejo (MIP), pois apresentam em sua estrutura características favoráveis e responsáveis pela manutenção da resistência das plantas aos diversos fatores adversos que prejudicam o desenvolvimento da planta.

A modificação genética a qual a planta é submetida é caracterizada principalmente pela introdução de DNA exógeno em suas células, através da engenharia genética, visando a expressão de genes heterólogos ou também da sua superexpressão ou supressão de genes endógenos nas plantas.

Essa tecnologia de transformação era muito complexa, e por isso as primeiras plantas geneticamente modificadas *Bt* surgiram em 1987, quando houve a inserção de genes *cry* que codificavam a síntese de proteínas inseticidas em plantas de tomate (proteína Cry 1Ab); e tabaco (proteína Cry 1Ac), entretanto, essas plantas apresentavam baixos níveis de expressão dos genes *cry* o que levou ao aperfeiçoamento das técnicas aplicadas (FISCHOFF et al., 1987).

Para auxiliar nesse aperfeiçoamento, vem sendo aplicado diferentes métodos de transformação genética através de métodos químicos como a transformação genética mediada por Polietilenoglicol (PEG) e lipossomos; métodos físicos através da microinjeção, a eletroporação, aceleração ou bombardeamento de partículas ou projéteis, biolística ou biobalística; métodos biológicos através do uso de vetores virais e bacterianos, como a agroinfecção e o sistema *Agrobacterium* (SANFORD, 1988; 1990).

A partir desses processos de melhoramento o uso de plantas *Bt* tem acompanhado uma crescente na agricultura mundial desde 1996, porém, o primeiro cultivo liberado para comercialização no Brasil foi apenas em 2005, com a liberação do algodão que

expressava a proteína Cry1 Ac de *Bt* (Bollgard[®]). Somente em 2010 foi liberado a soja MON87701 X MON89788 (Bt/RR2) *Glycine max* (L.) Merrill, com genes que codificam a expressão da proteína Cry 1Ac de *Bt* e a proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3 fosfato sintase (EPSPs) de *Agrobacterium* sp., que confere tolerância ao herbicida Glifosato (Roundup[®]) (PARROT et al., 1994; STEWART Jr. et al., 1996; JOUANIN et al., 1998; MAcRAE et al., 2005; HOMRICH et al., 2008).

Além da liberação comercial da soja e algodão outras culturas como milho, arroz, batata e canola obtiveram a liberação da utilização dessas plantas *Bt*, que auxiliam no manejo integrado de pragas (STEWART Jr. et al., 1996; MAcRAE et al., 2005;).

Grover et al. (1999) Herbers e Sonnewald, (1999); Yuan e Knauf (1997) relataram que os principais objetivos da transformação genética eram: aumentar a resistência vegetal em relação aos herbicidas e patógenos em geral; promover o aumento da tolerância a estresses abióticos; melhorar a qualidade nutricional do produto vegetal e produzir proteínas e biopolímeros de interesse técnico e farmacêutico.

Na transformação genética vegetal são utilizados, além dos genes de interesse, os também denominados marcadores de seleção para cada característica de interesse e genes repórteres. Os genes marcadores de seleção são capazes de conferir resistência ou tolerância a antibióticos e a herbicidas permitindo a seleção do material transgênico de interesse, enquanto que os genes repórteres codificam proteínas cuja presença ou atividade enzimática são facilmente percebidas e mensuráveis, denotando a condição transgênica de células, tecidos e organismos (WALDEN; WINGENDER, 1995).

Dessa forma o gene da bactéria *Bt* de grande interesse, é introduzida nas culturas devido ao seu amplo espectro de utilização como bioinseticida em várias culturas agronomicamente importantes. Essa bactéria apresenta algumas características que se assemelha a outras bactérias, pois espécie pode manter um período de latência na forma de endospóros sob condições desfavoráveis. Durante a esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam nas extremidades dos esporos sob a forma de cristais (PEFERÖEN, 1997).

Os cristais são compostos de várias proteínas Cry ou *Insecticidal Crystal Proteins* (ICPs) ou Proteínas Inseticidas em Formas de Cristais, que apresentam como principal característica a atividade tóxica específica, contra larvas de lepidópteros, dípteros, coleópteros (HONGY; ZINIU; WANGXI, 2000).

O modo de ação dessas proteínas é considerado um processo complexo e pode ser caracterizado em larvas de lepidópteros, no qual as ICPs constituintes dos cristais são

protoxinas solubilizadas (pH alcalino) e proteoliticamente convertidas em pequenos polipeptídeos no trato do intestino médio das larvas. Nesse processo, ocorre a remoção de um peptídeo amino-terminal, composto de 25-30 aminoácidos, aproximadamente. Esses polipeptídeos associam-se a sítios específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino médio, provocando a lise osmótica das células por meio da formação de poros na membrana celular (SCHNEPF et al., 1998; BRAVO et al., 2004;).

Outro modelo foi descrito por Broderick; Raffa e Haldesman (2006), no qual os autores descrevem que as lesões causadas pelas ICPs no intestino médio, possibilitaram a colonização da hemolinfa pela microbiota enterobacteriana residente levando o inseto à morte devido a uma infecção generalizada.

No caso de plantas com características de resistência ao herbicida glifosato (Roundup[®]), a inserção desse gene se deve a algumas características: como a utilização desse produto no campo há mais de 30 anos; amplo espectro de ação, flexibilidade e facilidade na aplicação, eficiência no controle de plantas daninhas. O glifosato age de forma acumulativa nas regiões meristemáticas das plantas tratadas, por ser um produto sistêmico de rápida translocação das folhas para as raízes, rizomas e meristemas apicais via floema, juntamente com outros fotoassimilados. Porém, em comparação com outros herbicidas seus sintomas fitotóxicos são relativamente lentos. A penetração da molécula de glifosato nas células é mediada por proteínas transportadoras de fosfato, presentes na membrana plasmática (FRANZ; MAO; SIKARSKI; 1997; MONQUERO et al., 2004; RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

O glifosato atua na inibição da síntese de aminoácidos aromáticos, apresenta propriedade de quelatização de metais, bloqueia a enzima EPSP (5 enolpiruvilshikimate-3-fosfatase) sintase, a qual catalisa a formação da enzima EPSP fosfoenolpiruvato (PEP) e shikimate 3-fosfato (S3P), sendo o único herbicida capaz de inibir esta enzima, bloqueando assim a síntese de três aminoácidos aromáticos: o triptofano, a fenilalanina e a tirosina (ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004).

A principal soja transgênica produzida e comercializada no mercado é a soja “Roundup Ready” conhecida como RR, que apresenta o gene que garante a proteção dos efeitos adversos causados pelo herbicida glifosato. Essa planta permite a aplicação do produto durante toda a fase de desenvolvimento vegetativo, causando danos apenas em plantas daninhas ou invasoras nas culturas.

Desde a liberação da soja transgênica, atualmente existem várias cultivares de soja RR disponíveis no mercado que apresentam resistência não só apenas para o glifosato

como também para outros fatores. Pode-se citar a cultivar de soja BRS 359 RR que além de apresentar a tecnologia “Roundup Ready”, também é resistente a algumas doenças (Cancro da Haste, Podridão Parda da Haste, Podridão Radicular de Fitófora, Mosaico Comum da Soja), ao nematóide *Rotylenchulus reniformis*, apresenta também resistência moderada a Mancha “Olho de Rã”, Oídio e ao nematoide de galha *Meloidogyne incognita* além da tolerância ao vírus da necrose da haste.

2.4 RESISTÊNCIA DE PLANTAS A INSETOS

Dentre os isoflavonoides, o grupo das isoflavonas é destacado por apresentar importantes funções biológicas: propriedades estrogênicas (MURPHY, 1982); anticancerígenas (COWARD et al., 1993); antimicrobiana devido a ação fitoalexinas (NAIM et al., 1974) e antioxidante considerada a mais importante entre as propriedades (ESAKI et al., 1998; NAIM et al., 1976; SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

As isoflavonas estão presentes em sementes e folhas de soja e apresentam quatro formas químicas: as agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína); os β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina); os derivados glicosilados acetilados (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina e 6''-O-acetilglicitina) e os glicosilados malonilados (6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina, 6''-O-malonilglicitina) (LEE et al., 2003).

De acordo com Hoffmann-Campo, Mazzarin e Lustosa (1994), na soja os compostos fenólicos (flavonoides), são geralmente mais abundantes nos genótipos com característica de resistência às pragas, e dependendo de sua concentração estes compostos podem ser atraentes, deterrentes, repelentes, ou tóxicos às pragas (PIUBELLI et al., 2005). Nos Estados Unidos foram identificadas três introduções de soja (PI 229358, PI 171451 e PI 227687), que apresentavam resistência à múltipla espécies de pragas, mas sem relacionar o que causava essa resistência (CLARK et al., 1972; HATCHETT; BELAND; HARTWING, 1976). Posteriormente, foi identificado a presença do flavonoide rutina, em folhas do genótipo PI 227687, caracterizado por promover a defesa de plantas à larvas de lepidópteros (HOFFMANN-CAMPO, 1995).

Com esses resultados foram então realizados uma série de estudos com o objetivo de avaliar a resistência da geração F2 descendentes do cruzamentos entre essas PIs com variedades comerciais. Dessa forma foi comprovado que as progênes sofriam menos danos por coleópteros e larvas de lepidópteros, concluindo que havia a transferência do

caracter resistência para essas progênes (CLARK et al., 1972; REZENDE; ROSSETTO; MIRANDA, 1980).

Esses compostos presentes nas plantas possuem diferentes modos de ação sobre os efeitos em herbívoros, no qual, a ativação ocorre por oxidação e pode levar a precipitação de proteínas (HARBORNE, 1991; APPEL, 1993).

Durante o processo de oxidação ocorre a formação de radicais livres, geralmente formados no citoplasma, mitocôndrias ou membrana celular, e os seus principais alvos são as proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Erenel; Erbas e Aricioglu (1993) e Rice-Evans e Burdon (1993), descreveram alguns radicais livres formados durante essa oxidação como, radicais do oxigênio ou espécies reativas do oxigênio (íon superóxido O_2^-); hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), alcóxila (RO^\cdot), peróxila (ROO^\cdot), peridroxila (HOO^\cdot) entre outros.

Appel (1993) descreveu que os radicais livres de hidroxila (OH^\cdot) possuem ação tóxica, além de serem responsáveis pela ruptura da membrana e distúrbios do metabolismo no epitélio intestinal. Em larvas de lepidópteros a ligação covalente do ácido clorogênico com proteínas monoméricas inibe a absorção de aminoácidos (FELTON et al., 1989; FELTON; DUFFEY, 1991).

O modo de ação dos flavonoides está relacionada à formação de ácidos graxos pela ação de fosfolipase A2, responsável pela hidrólise de fosfolípidos presentes nas membranas celulares, com a liberação do ácido araquidônico (KUBO; HANKE, 1986; LARA, 1991; SILVA et al., 2002; OMYILAGHA; GROTEWOLD, 2004; LOPES et al., 2005). Eles interagem e penetram nas bicamadas lipídicas das membranas, alterando as barreiras e a permeabilidade das membranas celulares (LIMA et al., 1999; SILVA et al., 2001). Outras funções seriam relacionadas à atuação na expressão de receptores de membrana, como agentes antibacterianos e antivirais e inibidores de enzimas proteolíticas (TOLEDO et al., 2003).

Para o melhor entendimento dos efeitos destes flavonoides nos insetos, foram realizados testes de preferência alimentar em larvas *A. gemmatalis* com alguns genótipos de soja, e foram observados os maiores índices de rejeição pelas lagartas para os genótipos: BR82-12547, IAC74-2832, PI 227687, PI 229358, PI 274454 (HOFFMANN-CAMPO; MAZZARIN; LUSTOSA, 1994).

Posteriormente foram identificadas a presença de sete flavonoides na PI 227687, uma das mais utilizadas nos programas de resistência a insetos, o que poderia indicar uma maior toxicidade desta cultivar e explicar a rejeição do inseto.

Dentre os flavonoides, a rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo) e a genistina (genisteína 7-O- β -D-glicosídeo) são reconhecidas por desempenharem papel muito importante na defesa da planta a larvas de lepidópteros (HOFFMANN-CAMPO, 1995; HOFFMANN-CAMPO; HARBONE; McCAFFERY, 2001; PIUBELLI et al., 2005). Estes dois flavonoides foram identificados em extratos de folhas de PI 227687, PI 274454 e outros genótipos resistentes a insetos (PIUBELLI et al., 2005).

A rutina é um flavonoide não volátil que exerce efeito negativo no comportamento e na fisiologia de alguns insetos. Esse composto ocasiona a inibição da digestão em insetos herbívoros, devido à ruptura da membrana celular e por distúrbios de metabolismo no epitélio intestinal (PIUBELLI et al., 2005; CRUZ, 2010).

Outros estudos indicam que esta substância pode ocasionar efeito antibiótico e/ou não consumível em *Manduca sexta* (Linnaeus) (STAMP; SKROBOLA, 1993), *Heliothis virescens* (Fabricius) (HOFFMANN-CAMPO, 1995) e *Tricoplusia ni* (Hübner) (HOFFMANN-CAMPO; HARBONE; McCAFFERY, 2001). Em larvas de *A. gemmatalis* as doses crescentes de rutina promoveram efeitos adversos no desenvolvimento biológico principalmente no prolongamento do estágio larval além de provocar um incremento na porcentagem de mortalidade (GAZZONI; HÜLSEMEYER; HOFFMANN-CAMPO, 1997).

A genistina é considerada uma isoflavona que apresenta alto grau na capacidade antioxidante, além do efeito anti-estrogênico (BARNES, 1995; RUIZ-LARREA et al., 1997). Esse isoflavonoide apresenta propriedades biológicas, sendo as mais importantes relacionadas às atividades antifúngicas e bactericidas das fitoalexinas, e a atividade inseticida de rotenoides (WILLIAMS; HARBORNE, 1989). Essas características foram observadas através de bioensaios com *A. gemmatalis*, no qual resultou no prolongamento do estágio larval, devido ao baixo valor nutricional que a genistina em associação com a rutina proporciona para o desenvolvimento das larvas (GAZZONI; TUTIDA, 1996; FUGI, LOURENÇÃO; PARRA, 2005).

Além das alterações biológicas, bioensaios realizados com alguns genótipos de soja, comprovaram que a genistina, quando avaliada isoladamente ou em associação com a rutina, promoveram alterações negativas na morfologia e fisiologia do epitélio intestinal de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV (CRUZ, 2010). Tanto larvas suscetíveis quanto resistentes essas alterações foram mais intensas no tratamento PI 227687. Além disso, as larvas resistentes apresentaram grandes alterações quando tratadas como o genótipo IAC 100.

A ação de uma substância química de defesa da planta na atividade biológica e fisiológica do inseto é raramente estudada de forma independente de outros produtos químicos na mistura.

O pouco conhecimento de como atuam a rutina e a genistina nos insetos mastigadores, bem como os mecanismos de interação destas substâncias na redução da resistência em larvas de *A. gemmatalis*, reforçam a necessidade de maiores estudos sobre o intestino médio destes insetos, considerado o local de atuação dos flavonoides e também a principal via de acesso dos inseticidas biológicos (AgMNPV) e químicos.

2.5 CANAL ALIMENTAR DE LARVAS DE ANTICARSIA GEMMATALIS

Devido a diversidade de alimentos presente no ambiente, os insetos de um modo geral apresentam aparatos bucais e digestórios para cada tipo de dieta. Em insetos com alimentação líquida, este canal é caracterizado por ser longo, estreito e enrolado, além de apresentar uma estrutura especial a câmara filtro, que tem a finalidade de retirar o excesso de água e concentrar nutrientes e substâncias antes de iniciar a digestão, encontrados geralmente em insetos sugadores de seiva (GALLO et al., 2002).

Em insetos com alimentação basicamente sólida, o canal é descrito como um tubo reto, longo ou curto, com musculatura envolvente para proteção contra abrasão ou ferimentos mecânicos, sendo característicos de larvas de lepidópteros, orthópteros e baratas (GULLAN; CRANSTON., 2007).

De modo geral, o canal alimentar é formado por três regiões morfofuncionais distintas, além de serem delimitados por válvulas (cardia e pilórica) (CHAPMAN, 1998). A primeira região é descrita como anterior ou estomodeu, a qual é responsável principalmente pela ingestão, armazenamento, trituração e transporte do alimento; a segunda região é a mediana ou mesêntero onde são produzidas as enzimas digestiva e ocorre absorção do alimento e também dos inseticidas químicos e biológicos, e por fim, a região posterior ou proctodeu que é responsável pela absorção de água, sais minerais e outras moléculas formada nos túbulos de Malphigi e do material remanescente (CHAPMAN, 1998).

Em larvas de *A. gemmatalis*, o intestino médio é formado da luz para a periferia, por uma camada acelular denominada de membrana peritrófica, seguida por uma camada epitelial e pela camada muscular envolvente (LEVY et al., 2004; 2005; 2009).

A membrana peritrófica, possui a função de proteger o epitélio contra abrasão do conteúdo intestinal e atuar como barreira permeável às enzimas digestivas e aos produtos da digestão, além de formar uma barreira que impede a penetração de microrganismos na cavidade do corpo e na hemocele (EISEMANN; BINNINGTON, 1994; WANG; GRANADOS, 2001).

A membrana peritrófica é composta por fibrilas de quitina dispostas em uma matriz proteica-glicoproteica (peritrofina) e de um polímero linear N-acetyl-D-glucosamina. A membrana é secretada geralmente em larvas de lepidópteros pelas células colunares, em toda a extensão do intestino médio, o qual divide o lúmen intestinal em dois compartimentos, o espaço ectoperitrófico, localizado entre a membrana e o epitélio; e o espaço endoperitrófico, onde se localiza o bolo alimentar (HARPER; HOPPKINS, 1997; HARPER; GRANADOS, 1999).

A membrana é ausente em Hemiptera e Tysanoptera insetos que se alimentam de líquidos, e em adultos de várias espécies de lepidópteros (GULLAN; CRANSTON, 2007). Porém, em alguns casos é evidenciado a presença de um gel peritrófico que possui as mesmas funções da membrana (TERRA, 2001).

O epitélio do intestino médio em lepidópteros é pseudoestratificado prismático com bordadura estriada, formado por quatro tipos celulares: as células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (CIOFFI, 1979; CHIANG; YEN; PENG, 1986; BINDER; BOWERS, 1994; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; LEVY et al., 2004).

Estas células possuem características morfológicas e funcionais peculiares. As células colunares apresentam a superfície apical com microvilosidades, projeções citoplasmáticas e um núcleo alongado. São abundantes no epitélio do intestino médio, apresenta como principais funções a secreção de enzimas digestivas, de compostos que irão compor a membrana peritrófica e absorção de produtos provenientes da digestão (RICHARDS; DAVIES, 1994).

As células caliciformes apresentam cavidade em formato de cálice, margeado internamente por projeções citoplasmáticas tipo microvilosidades, contendo em seu interior mitocôndrias. O núcleo é basal e estas células auxiliam as células colunares na homeostasia iônica e na absorção de metabólitos (CHAPMAN, 1998; BILLINGSLEY; LEHANE; 1996).

As células regenerativas são observadas na base do epitélio, individualmente ou em grupos. Estas células apresentam citoplasma escasso, núcleo central e poucas organelas presentes (DE PRIESTER, 1971; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999; LEVY et al.,

2004). Essas células estão relacionadas principalmente com o processo de renovação epitelial, no qual, as células eliminadas são substituídas por outras desenvolvidas a partir dos “ninhos” de células regenerativas (CHAPMAN, 1998; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999). Estas células podem variar em relação a sua quantidade, de acordo com a aproximação do processo de metamorfose (ecdise) e do estágio de desenvolvimento (TERRA; FERREIRA, 1996).

As células endócrinas encontram-se localizadas na base do epitélio. De modo geral estas células apresentam citoplasma claro com grande quantidade de grânulos citoplasmáticos. Suas funções estão relacionadas com o controle hormonal, movimentos peristálticos, digestão, diurese, desenvolvimento e reprodução (BROWN; RAIKHEL; LEA, 1985; PRATT et al., 1989; WOODHEAD et al., 1989; COAST; KAY, 1994; SCHOOFS; VAN DEN BROECK; DE LOOF, 1993; PATEL; HAYES; COAST, 1995).

Além dessas características, estas células possuem semelhanças funcionais em relação as células endócrinas encontradas em vertebrados, ou seja, são células neurosecretoras que são responsáveis pela síntese e liberação de hormônios polipeptídeos (IWANAGA et al., 1981; MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984).

Toda essa arquitetura do epitélio é sustentado por uma membrana basal contínua de origem conjuntiva e pela camada muscular constituída pelos músculos longitudinais e circulares. A principal função da camada muscular é manter os alimentos ingeridos em constante movimento no interior do intestino médio facilitando a digestão , encaminhando esse “bolo alimentar” para o intestino posterior (LANE; DALLAI; ASHHURST, 1996; GALLO et al., 2002).

2.6 RESISTÊNCIA DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* AO NUCLEOPOLIEDROVÍRUS (*AGMNPV*)

A estratégia mais antiga para o controle de populações de insetos, e ainda a mais utilizada, é baseada no uso de substâncias de origem natural ou sintética, que visam eliminar essas populações em qualquer fase do seu ciclo de desenvolvimento (RITTER, 1997).

Basicamente são utilizados produtos químicos, agentes biológicos que induzam a morte ou interrupção do ciclo biológico e a repelência desses insetos, e muitas vezes a aplicação destes produtos uma única vez, não é o suficiente para controlar ou reduzir a população de praga na cultura a níveis desejáveis que promovam danos econômicos (GULLAN; CRANSTON, 2007).

Dessa forma, os produtores através de metodologias consideradas inadequadas, promovem novas aplicações do mesmo princípio ativo modificando apenas a dose, levando a seleção de uma população resistente.

Os insetos apresentam várias estratégias e mecanismos que permitem a redução da sensibilidade a determinado inseticida. Entre elas as modificações comportamentais, no qual o inseto reconhece a presença de determinado composto químico e evita o contato com o mesmo; a redução da penetração cuticular (inseticidas de contato) associada a modificações na sua composição; a resistência metabólica através de alterações na metabolização dos produtos por enzimas com característica desintoxicante e as alterações nos sítios alvos de ação (STONE; BROWN, 1969; MBOGO et al., 1996; HEMINGWAY, 2000; MATHENGE et al., 2001; FFRENCH-CONSTANT; DARBON; GOFF, 2004).

A resistência é o desenvolvimento de uma habilidade numa determinada linhagem de algum organismo, para tolerar doses de um determinado produto tóxico, que é letal para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie, ou seja, é um processo estritamente genético com mutações que afetam as proteínas alvos dos inseticidas e/ou seu metabolismo e essas características são transferidas para as próximas gerações (LARA, 1991; LI, SCHULER; BEREMBAUM, 2007).

Considerando os mecanismos que promovem a resistência à inseticidas podemos relacionar: (1) os fatores genéticos - número de alelos resistentes, frequência e intensidade da resistência, dominância dos alelos resistentes, valor adaptativo dos indivíduos resistentes; (2) fatores bioecológicos – como número de gerações por ano, taxa de reprodução, modo de reprodução, mobilidade da espécie, hábito alimentar, presença de refúgio para a população suscetível e presença de inimigos naturais efetivos da praga; (3) fatores operacionais – característica do composto químico (grupo, persistência, seletividade e formulação), e as características da aplicação (nível de controle, método de aplicação, estratégia para o uso de produtos químicos) (GALLO et al., 2002; GULLAN; CRANSTON, 2007).

Os casos de resistência em campo são geralmente relacionados a produtos químicos. A resistência dos insetos a produtos químicos podem ser classificadas em 4 tipos. A resistência metabólica a organoclorados, piretróides, organofosforados, carbamatos, é relacionada ao aumento da detoxificação desses inseticidas promovida pelas enzimas: glutationa-S-transferases (GSTs), esterases (ESTs) e citocromo P450 (CYPs) (HEMINGWAY, 2000; PERRY; BATTHERHAM; DABRON, 2011).

A resistência por modificação nos sítios alvos dos inseticidas ocorre pela substituição de um aminoácido por outro. Esse fato é evidenciado quando ocorre uma substituição do aminoácido alanina por um de serina no receptor de GABA, o qual confere resistência aos inseticidas ciclodienos. Esta mutação já é encontrada em *Drosophila melanogaster* (Meigen), *Aedes Aegypti* (Linnaeus) e em vários outros insetos resistentes ao inseticida (THOMPSON; SHOTKOSKI; FFRENCH-CONSTANT, 1993; FFRENCH-CONSTANT et al., 1998).

A resistência a compostos reguladores de crescimento, ainda é pouco evidenciada, entretanto, os altos níveis de resistência a metopreno foram observados no mosquito *Ochlerotatus nigromaculis* (Ludlow) (CORNEL et al; 2002) e em *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann) (DAME; WITCHTERMAN; HORNBLY 1998). Um gene denominado *Met* (de “Methoprene-tolerant”) foi identificado em *D. melanogaster* resistentes ao composto metopreno (WILSON et al., 2006).

E por fim, a resistência cruzada e múltipla. Esta refere-se aos casos nos quais um único mecanismo de defesa confere resistência a inseticidas de uma mesma classe ou a inseticida de classes diferentes. No qual Brogdon et al. (1999) relataram a resistência cruzada a DDT e a piretroides em *Anopheles albimanus* (Wiedemann) da Guatemala, sendo associada à alta atividade de oxidases do tipo CYP. E a resistência múltipla de defesa contra inseticidas através de mecanismos de resistência múltiplos e coexistentes (MILANI, 1963; BUSVINE, 1968).

Além da resistência dos insetos evidenciada em produtos químicos, em algumas plantas geneticamente modificadas que contém o gene *Bt* foram identificadas populações resistentes. Essas populações foram encontradas em bioensaios em casa de vegetação com populações de *Heliothis zea* (Boddie) na cultura do algodão transgênico nos Estados Unidos, porém os indivíduos evoluíram resistência dominante à toxina Cry1Ac e não desenvolveram resistência a outra toxina Cry2Ab (TABASHNIK et al., 2008).

No caso dos produtos biológicos não foram relatadas a presença de populações resistentes em campo, entretanto, Abot et al (1995) realizando ensaios envolvendo pressão de seleção em larvas de *A. gemmatalis* com o vírus AgMNPV, observaram um processo de rápida seleção a esse entomopatógeno. Essa resistência desenvolvida em relação ao vírus de certa forma é semelhante à resistência aos inseticidas químicos, ou seja, é esperado um crescimento exponencial em relação ao vírus AgMNPV por parte dessas larvas em condições de campo (ABOT et al., 1996).

Os resultados levaram os pesquisadores a questionar quais os mecanismos de resistência desenvolvidos pelo inseto. Muitos fatores foram relacionados, entretanto, a possibilidade pode estar relacionada a defesa diferencial (MOSCARDI, 1986; ABOT; et al., 1995). Levy et al. (2005) atribuíram esse fator de resistência a diferenciação no intestino médio, no qual ao comparar populações de larvas de *A. gemmatalis* resistentes e suscetíveis ao vírus, verificaram que a população resistente apresentava uma maior concentração de células regenerativas, e uma maior quantidade de protusões citoplasmáticas nas células colunares.

Além de diversos fatores pode-se ressaltar também o sistema imunológico dos insetos, no qual, através de estruturas como os hemócitos presentes na hemolinfa dos insetos, podem estar associados a defesa contra o vírus e demais patógenos (NEGREIRO; ANDRADE; FALLEIROS, 2004).

Como o IM é considerado o principal local de digestão e absorção de nutrientes e compostos químicos e biológicos, com nosso trabalho esperou encontrar informações sobre o efeito dos compostos fenólicos rutina e genistina presentes em plantas resistentes, no epitélio intestinal em diferentes níveis de resistência de *A. gemmatalis* ao AgMNPV.

Assim podemos entender como as plantas estão influenciando na redução da resistência ao vírus. Concomitantemente, avaliamos o efeito da soja transgênia RR na morfologia do IM de larvas resistentes ao AgMNPV, para duas gerações. Outro foco do nosso trabalho diz respeito às interferências que a rutina e genistina e a soja RR possa proporcionar no desenvolvimento biológico na 40ª geração resistente AgMNPV.

3 ARTIGO A:

ASPECTOS BIOLÓGICOS DA 40ª GERAÇÃO DE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER: 1818) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) RESISTENTES AO NUCLEOPOLIÉDROVÍRUS AgMNPV EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA.

3.1 RESUMO

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*, é uma das principais pragas da soja e, quando não controlada pode causar sérios prejuízos. A praga pode ser controlada de forma eficiente utilizando-se plantas resistentes sendo o método considerado ideal por apresentar sinergismo aos demais métodos de controle. As plantas apresentam em sua composição metabólitos secundários que podem torná-las tóxicas e repelentes prejudicando o desenvolvimento dos insetos em geral. O objetivo do presente trabalho foi identificar e quantificar os efeitos dos compostos químicos foliares presentes em genótipos de soja convencionais e na variedade transgênica BRS 359 RR, nos aspectos biológicos da 40ª geração larval de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. O experimento foi conduzido no Laboratório de Entomologia e Ecologia Química da Embrapa Soja Londrina/PR, com uma população larval obtida através de bioensaios de pressão de seleção. Larvas de 2º/3º instar foram acondicionadas individualmente em placas de Petri contendo um folíolo retirado de folhas no estágio V5 de cada tratamento, no total de 50 lagartas foram mantidas em laboratório, em B.O.D. Foram avaliados os seguintes parâmetros: peso inicial, peso de pupa, o que refletiu negativamente no ganho de peso e no crescimento. O crescimento, o desenvolvimento e a eficiência na conversão do alimento em biomassa foram calculados, através da análise de covariância (ANCOVA). O genótipo PI 229358 foi responsável pela maior mortalidade 32%, tempo de alimentação e desenvolvimento prolongado. Larvas alimentadas com folhas do genótipo IAC 100 apresentaram peso inicial consumo, refletindo negativamente no peso de pupas e apresentando 12% de mortalidade, eficiências de conversão do alimento digerido e ingerido em biomassa. A PI 227687 influenciou negativamente no consumo. As larvas alimentadas com Dowling, apresentava o maior peso de fezes, menor peso de pupa influenciado pela assimilação menor do alimento. PI 229358, IAC 100 e PI 227687 e BRS 359 RR influenciaram negativamente no desenvolvimento biológico das larvas. As alterações causadas pelos genótipos com características de resistência a insetos podem estar relacionadas aos flavonoides rutina e genistina encontrados na sua composição química foliar que variavam em concentração nos diferentes genótipos. A soja transgênica BRS 359 RR não ou a qualidade nutricional dessas plantas apresentou flavonoides na sua composição, assim a presença de outros compostos podem ter influenciado negativamente no desenvolvimento das larvas.

Palavras chave: Lagarta da soja. Mortalidade. BRS 359 RR. Flavonoides.

**BIOLOGICAL ASPECTS OF THE 40th GENERATION *Anticarsia gemmatalis*
(HÜBNER: 1818) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NUCLEOPOYHEDROVIRUS
AgMNPV RESISTANT IN DIFFERENT SOYBEAN CULTIVARS.**

3.2 ABSTRACT

The velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, is a major pest of soybean and if not controlled can cause great to these crop damage. This pest can efficiently be controlled using resistant plants. This method is considered ideal for presenting synergism with other methods of control. Plants have metabolites in their composition that can render them toxic and repellents impeding in the development of insects, in general. The aim of this study was to evaluate the effect of chemical compounds present in leaves of soybean genotypes on the biological aspects of the 40th generation of larval *A. gemmatalis* resistant AgMNPV. The experiment was conducted at the Laboratory of Entomology and Chemical Ecology of Embrapa Soybean, located at Londrina/PR. The larval population was obtained through the method of selection pressure. Larvae of 2nd/3rd instar larvae were placed individually in Petri dishes containing one leaflet removed at V5 of each treatment, a total of 50 larvae per treatment was maintained at laboratory B.O.D. The following parameters were evaluated: initial weight, pupal weight, mortality, consumption, feeding time and development. The growth, development, efficiency of food assimilation and conversion in biomass were calculated by ANCOVA analysis. Larvae fed BRS 359 RR leaves had the lowest consumption, resulting in lower pupal weight, also reflecting in weight gain and growth of insects. PI 229358 genotype caused the highest mortality, feeding time and development; the cycle was delayed. Larvae fed on IAC 100 leaves presented lowest initial weight, less consumption, lower efficiency in assimilation and conversion of food into biomass, negatively reflecting in the weight of pupae. Leaves PI 227687 caused negative influence on insect consumption. Feeding on Dowling leaves negatively affected the food assimilation, likely caused by a big production of feces resulting in the insect final weight. The results that PI 229358, PI 227687 and IAC 100 and soybean BRS 359 RR influenced negatively the biological parameters of *A. gemmatalis*. These effects promoted by genotypes with characteristics of insect resistance may be related to the flavonoids rutin and genistin found in varied concentration on soybean leaves. Transgenic soybean BRS 359 RR did not have the nutritional quality of these plants, but likely other compounds may have negative influence on the larvae development.

Keywords: Velvetbean caterpillar. Mortality. BRS 359 RR. Flavonoids.

3.3 INTRODUÇÃO

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner: 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), é um inseto holometábolo que apresenta diferentes estágios de desenvolvimento, passando, de modo geral por cinco estádios larvais, até a sua completa metamorfose (FORD et al., 1975; GALLO et al., 2002; SOSA-GÓMEZ et al., 2006). Porém, dependendo das condições climáticas, planta hospedeira e do valor nutricional do alimento essas larvas podem atingir de cinco a sete ínstars (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005; MOSCARDI et al., 1981; WATSON, 1916).

É considerado uma das principais pragas desfolhadoras da cultura da soja e, quando não controladas de forma eficaz, podem provocar o desfolhamento parcial ou total da planta, provocando perdas significativas na produção final de grãos (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

A fase larval é considerada a mais importante, pois acarreta os principais danos na soja. As larvas consomem desde a sua eclosão o limbo foliar deixando pequenas perfurações nas folhas. Entretanto, a partir do quarto ínstar, apresentam a maior capacidade de desfolha, são mais vorazes e consomem completamente as folhas, o consumo médio de 100 a 150 cm² de folhas (SOSA-GÓMEZ et al., 2006). Após o quarto ínstar as lagartas consomem 95% do alimento durante todo o seu desenvolvimento (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Para combater essa praga a maioria dos produtores baseia-se exclusivamente em produtos químicos. Porém, a maioria desses produtos considerados não seletivos. Pois agem de forma negativa, diminuindo as populações de insetos benéficos, provocando o ressurgimento da população da praga, a seleção de insetos resistentes e a contaminação do ambiente.

Buscando a redução dos efeitos negativos causados pela aplicação excessiva de produtos químicos, várias táticas de controle de *A. gemmatalis* têm sido estudadas, entre elas: o controle biológico, a utilização de produtos seletivos e bioinseticidas a base de AgMNPV, o uso de plantas resistentes. A utilização de plantas resistentes entre as táticas de controle é considerada como ecologicamente recomendável, pois apresenta alta compatibilidade, sinergismo com o controle químico, biológico e cultural (HOY, 1976; KOGAN, 1976; METCALF, 1976; KOGAN, 1986).

A utilização de plantas geneticamente modificadas surgem como alternativas para o controle dessa praga (FISCHOFF et al., 1987).

Muitos são os fatores que contribuem para a manifestação dessas características de resistência em plantas, entre eles pode-se citar: a anatomia das plantas que apresentam células epidérmicas mais espessas e com maior grau de lignificação e/ou silicificação; alterações fisiológicas e bioquímicas que provocam maior produção de substâncias químicas ou metabólitos secundários que causem repelência ou inibição da herbivoria da praga (KOGA; ORTMAN, 1978; LARA, 1991).

Características que conferem resistência foram identificadas nos genótipos de soja PI 227687, PI 229358 e PI 171451. Estes apresentaram resistência a algumas espécies de insetos desfolhadores, como em *Diabrotica speciosa* (Germar), *Heliothis virescens* (Fabricius), *Trichoplusia ni* (Hübner), *Pseudoplusia includens* (Walker), *A.gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005; HATCHETT; BELAND; HARTWING, 1977; HOFFMANN-CAMPO 1995; HOFFMANN-CAMPO; HARBONI; MCCAFFERY, 2001; REZENDE; ROSSETO; MIRANDA, 1980; ROSSETO; MIRANDA, 1981). As plantas resistentes apresentam em sua composição química foliar substâncias químicas (metabólitos) que podem torná-las tóxicas e repelentes para os insetos (LARA, 1991). Dentre estas substâncias químicas os flavonoides rutina e genistina são reconhecidos por desempenharem importante função na defesa da planta às larvas de lepidopteros (HOFFMANN-CAMPO 1995; PIUBELLI et al., 2005; SALVADOR, 2008). Extratos de folhas de PI 227687 contendo os dois compostos causaram maior impacto na biologia de *T. ni* (HOFFMANN-CAMPO; HARBONE; MCCAFFERY, 2001).

Compostos fenólicos agem na formação de ácidos graxos pela hidrólise de fosfolipídios das membranas, alterando as barreiras e a permeabilidade dessas membranas celulares, promovendo a inibição da digestão, devido a formação de pontes de hidrogênio, ou pela formação de ligações covalentes, com proteínas digestivas (APPEL, 1993). Em larvas de lepidopteros, a ligação covalente do ácido clorogênico com proteínas monoméricas, por exemplo, inibe a absorção de aminoácidos (FELTON et al., 1989; FELTON; DUFFEY, 1991).

Em *A. gemmatalis* a rutina apresenta efeitos adversos na fisiologia e na biologia causando, redução da sobrevivência, e em alguns casos elevado a mortalidade em larvas resistentes ao AgMNPV (GAZZONI; HÜLSEMEYER; HOFFMANN-CAMPO, 1997; PIUBELLI, 2004; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). Em bioensaios realizados com a mesma espécie foram observadas o prolongamento do estágio larval, devido ao baixo valor nutricional proporcionado para o desenvolvimento das larvas alimentadas como genótipo IAC

100 provavelmente devido a presença de metabólitos presentes nesse genótipo (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005; GAZZONI, TUTIDA, 1996).

Este trabalho tem por objetivos identificar, quantificar e avaliar os efeitos dos compostos químicos foliares presentes nos genótipos de soja e na variedade transgênica BRS 359 RR, nos aspectos biológicos da 40ª geração larval de *A. gemmatalis* resistentes ao nucleopoliedrovírus AgMNPV durante o desenvolvimento larval.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Genótipos Utilizados

Foram utilizados os seguintes genótipos de soja: BRS 257 e BR 16 (suscetível a insetos), Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687 (resistentes a insetos) e BRS 359 RR (transgênica resistente ao glifosato). A descrição da genealogia e as concentrações de flavonoides dos genótipos testados estão descritos na Tabela 3.1

Tabela 3. 1 – Genótipos de soja resistentes e as concentrações de flavonoides em ng/mg:

Genótipos	Genealogia	Concentração (ng/mg)	
		Rutina	Genistina
1. BRS 257	BR93-32109 x BR94-23396	0,0	0,0
2. BR 16	D69-1310-M58 (D49-772 x D49-2491) x 'Davis'	0,0	6,57
3. Dowling	Semmes x PI 200492	0,0	9,85
4. PI 229358	Tóquio, Japão	7,87	66,94
5. IAC 100	'IAC 12' x IAC 78-2318	17,36	88,52
6. PI 227687	Okinawa, Japão	35,81	33,80
7. BRS359 RR	AL83RS x BRS262	0,0	0,0

Fonte: VALLE e LOURENÇÃO (2002); ARRABAL (informação pessoal)

Foram semeadas cinco sementes em dez vasos por tratamento, totalizando 70 vasos com capacidade de cinco litros de terra. A irrigação foi por gotejamento e para garantir plantas em estágio V5, durante todo o desenvolvimento das larvas, foram realizados três plantios escalonados, totalizando 210 vasos. Os vasos, após semeadura foram dispostos em mesas, e distribuídos de acordo com o delineamento experimental estatístico (inteiramente

casualizado), em casa de vegetação do tipo telada com incidência de luz durante o dia na Embrapa Soja Londrina-PR. Não foi realizada adubação de cobertura e aplicações de produtos fitossanitários para não influenciar na biologia das lagartas.

Ao atingirem o estágio V5 (FEHR; CAVINESS, 1977), as folhas foram coletadas no laboratório foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 5%, enxaguadas com água destilada e secas em papel filtro, antes de serem oferecidas para as lagartas.

3.4.2 Quantificação de Rutina e Genistina

3.4.2.1 Preparo das amostras

Para verificar se a resistência dos genótipos estudados se deve às substâncias químicas neles presentes foi realizada a análise foliar, com a identificação e quantificação dos compostos rutina e genistina. O 5º trifólio de cada genótipo no estágio V5 foi utilizado para o preparo das amostras. Depois de retirados os pecíolos, alíquotas de cada amostra (300 a 500 mg) foram pesadas e moídas em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido, transferidas para tubos de vidro, adicionado-se MeOH 80%, no volume de 10 vezes a massa da amostra. Os tubos foram levados ao ultrasson por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram filtradas e secas em nitrogênio gasoso. Após secagem, as amostras foram ressolubilizados em 1,5 ml de 80% MeOH. As amostras foram, então, transferidas para tubos de amostrador automático e analisadas em cromatógrafo líquido de alta performance (Shimadzu, HPLC).

3.4.2.2 Análises cromatográficas

Alíquotas de 10µL foram injetadas no HPLC sendo as análises realizadas em coluna de fase reversa C18 (250 mm de comprimento 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 micrômetros). O método utilizado teve como fase móvel um gradiente com 2% ácido acético (HOAc) em água (A) e uma mistura de metanol, ácido acético e água, na proporção de 18:1:1 (MeOH:HOAc:H₂O) (B). O sistema inicial do gradiente era composto de 75% da solução A e 25% da solução B. Aos 40 minutos, o sistema foi invertido e, voltando aos 45 minutos, à situação inicial, permanecendo até completar 50 minutos de corrida. O fluxo do solvente foi de 1mL/ min. e a absorção de UV foi medida a 260 nm.

Os padrões de flavonoides utilizados foram rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$) (quercitina 3-*O*-raminoglicosídeo) e genistina ($C_{21}H_{20}O_{10}$) (genisteína, 7-*O*- β -D-glicosídeo), ambos da marca Sigma. Para a obtenção das áreas das substâncias padrões, sete concentrações de rutina (0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,32 e 0,64 mg/ml) e quatro de genistina (0,01, 0,02, 0,04 e 0,08 mg/ml) foram injetadas em cromatógrafo, conforme descrito anteriormente. Com os valores das áreas das substâncias 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 das substâncias rutina e genistina foi obtida, aplicando este valor na equação, obtendo-se a concentração das substâncias (mg/ml) em cada genótipo. A concentração das substâncias em mg/g de folha foi obtida através da divisão da concentração obtida (mg/ml) pela massa da folha de cada genótipo, considerando o volume de ressolubilização.

3.4.3 Obtenção dos Insetos

Para a instalação desse bioensaio foi utilizada a 40ª geração da população de *A. gemmatalis* resistente ao AgMNPV. Essa geração de larvas foi obtida através de bioensaios de pressão de seleção.

3.4.3.1 Bioensaio de pressão de seleção

A partir de uma concentração estimada a partir dos bioensaios de pressão de seleção e da taxa de resistência realizados anteriormente, com o objetivo de obter 80% de mortalidade e 20% de sobreviventes (Concentração Letal – CL_{80}) de acordo com os procedimentos de Abot et al (1996), foi quantificada e preparada uma solução do vírus LDB₈₀ com concentração de 160000 cpi/mL. Uma alíquota de 30 mL da solução foi inoculada em 270 mL dieta artificial (HOFFMANN-CAMPO; OLIVEIRA; MOSCARDI, 1985), e mantida em temperatura ambiente.

Ao atingir o estado semi-sólido, a dieta inoculada era cortada em pequenos pedaços, acondicionados em pequenos copos plásticos, e em seguida era adicionadas de três a quatro larvas de *A. gemmatalis* de 2º instar (pertencente a AgRV₃₉), totalizando 1500 larvas inoculadas. As bandejas contendo esses copos eram levadas para estufas incubadoras do tipo B.O.D., com temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa em torno de $70 \pm 20\%$ e fotoperíodo de 14 horas dia/10 horas escuro. Ao 3º dia pós-inoculação, essas larvas eram avaliadas e as

que apresentavam sintomas de infecção pelo vírus ou mesmo mortas pelo mesmo eram descartadas.

Ao atingirem o estágio de pupa, os insetos sobreviventes (resistentes) eram contabilizados, alocadas em gaiolas de acrílico, para emergirem e acasalarem, obtendo-se dessa forma a 40^a geração. As gaiolas eram forradas com papel sulfite para ovoposição. Diariamente os papéis eram recolhidos, sendo os locais com posturas recortados em pequenos pedaços, contendo aproximadamente 100 ovos e armazenadas.

3.4.4 Instalação e Condução do Bioensaio

As posturas obtidas eram fixadas na tampa da caixa gerbox, totalizando quatro gerbox por tratamento (genótipo). Na base dessas caixas era colocado papel filtro, contendo também uma folha “in natura” do respectivo tratamento. Para manter a umidade dessas folhas, foi colocado no seu pecíolo um pequeno pedaço de algodão umedecido.

Após eclosão as larvas, foram mantidas em folhas frescas dos respectivos genótipos até atingirem o segundo instar, quando então elas foram pesadas para obtenção do peso inicial e individualizadas em placa de Petri. Para a obtenção do peso seco inicial das larvas, foi retirada uma alíquota de cinco larvas por tratamento, que após serem pesadas, foram mortas e secas em estufa por 72h a 60°C e novamente pesadas para obtenção do peso seco. Com esses valores obteve-se um fator de correção médio, que foi calculado pela divisão entre peso médio seco e fresco das larvas. Esse fator de correção foi multiplicado pelo peso fresco de cada larva do experimento, obtendo-se assim, o seu peso seco inicial.

O folíolo de soja de cada tratamento devidamente pesados para calcular o consumo final. Os tratamentos foram mantidos em câmara do tipo B.O.D., sob condições controladas de temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo 14h luz/10h escuro, e distribuído de acordo com o delineamento experimental inteiramente casualizado. As larvas foram avaliadas diariamente, onde eram observados fatores como a mortalidade, tempo de desenvolvimento de cada estágio, além do consumo foliar e a necessidade de reposição das folhas.

Os folíolos fornecidos para as larvas foram lavados em solução de hipoclorito de sódio a 5% (cinco minutos), enxaguadas em água destilada (cinco minutos) e pesadas antes de serem oferecidos para as larvas. Para obter o peso seco do alimento foi coletada uma alíquota de cinco amostras de cada tratamento, armazenados em sacos de papel identificados e colocados em estufa por 72h à 60°C. Dessa forma obteve-se o fator de

correção médio que foi calculado pela divisão do peso seco médio e fresco do alimento. O alimento remanescente foi coletado, como no procedimento inicial colocado em pequenos sacos de papel e seco em estufa a 60°C por 72 horas para obtenção do peso seco do alimento remanescente. O fator de correção foi calculado como descrito na fase anterior.

Ao atingirem o estágio de pré-pupa, o alimento foi retirado, as fezes remanescentes eram coletadas, armazenadas em copos de plásticos com tampas identificadas, e levadas para estufa (60°C por 72 horas) para obtenção o peso seco de fezes para calcular o alimento digerido. As pré-pupas eram mantidas na placa de Petri até atingirem o estágio de pupa, quando eram pesadas, 48h após a transformação, acondicionadas em copos plásticos identificados e armazenados em estufa a 60° por 72h para obter o peso seco de pupa.

3.4.5 Análise Estatística

3.4.5.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado para a biologia de *A. gemmatalis* foi o inteiramente casualizado com sete genótipos de soja (BRS 257, BR 16; Dowling; PI 229358; IAC 100; PI 227687 e BRS 359 RR) e 50 repetições, totalizando 350 parcelas experimentais (aspectos biológicos). As variáveis respostas mensuradas no experimento (relacionado aos aspectos biológicos de *A. gemmatalis* foram: mortalidade de larvas por instar e total; peso fresco e seco inicial de larvas, peso de pupa (seco e fresco), consumo e peso de fezes. Os valores dessas variáveis foram expressos em mg e também foi considerado o tempo de alimentação e tempo de desenvolvimento de cada instar e total (dias).

3.4.5.2 Métodos de análises estatísticas para as variáveis mensuradas

Os métodos estatísticos para todas as variáveis deste estudo foram realizadas em diferentes etapas: na primeira foram realizadas as análises exploratórias para avaliar as pressuposições da Análise de Variância (ANOVA) como: a mortalidade e a independência dos erros (SHAPIRO; WILK, 1965; PARENTE, 1984); não aditividade do modelo (TUKEY, 1949) e homogeneidade de variâncias (BURR; FOSTER, 1972). Na segunda foram realizados os testes de comparações múltiplas de médias na ANOVA pelos testes de Tukey (BANZATO; KRONKA, 2006) e teste de médias ajustadas de Tukey-Kramer para ANCOVA (KRAMER, 1956). A ANCOVA foi usada para os casos das variáveis respostas mensuradas estarem

interferindo ou interagindo nas suas relações com as variáveis respostas. A última etapa foram também realizados os testes de (χ^2), estatísticas descritivas e desvios padrão para cada genótipo. O nível de significância considerado para os testes utilizados foi o de ($p \leq 0,05$) com excessão do teste de homogeneidade de variâncias que esse nível foi de ($p \leq 0,01$).

3.4.5.3 Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV

A mortalidade foi analisada pelo teste de qui-quadrado (χ^2) de Cochran-Mantel-Haenszel (GIOLO, 2012), ao nível de 5% de probabilidade. Os softwares estatísticos nas análises foram o SAS – Statistical Analysis System, versão 9.2 (2001), Sanest para DOS (ZONTA; MACHADO; SILVA JUNIOR, 1982). Para os cálculos das esperanças do Quadrado Médio o efeito dos tratamentos foi fixo com exceção do efeito da repetição que foi aleatório.

A análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para estimar o crescimento, consumo, ganho de peso, eficiência na conversão do alimento, conforme proposto por Raubenheimer e Simpson (1992). Todas as análises de covariância foram realizadas utilizando-se os pesos secos.

O crescimento e o consumo para cada tratamento foram obtidos através do ajuste, respectivamente, do peso de pupa e quantidade de alimento consumido pelo tempo de alimentação. O ganho de peso foi estimado através do peso de pupa pela covariável peso inicial. O peso de pupa posteriormente foi ajustado pela quantidade de alimento ingerido e/ou consumido e digerido (quantidade de alimento consumido menos a quantidade de fezes produzidas pelas lagartas) para obter a eficiência na conversão do alimento ingerido e digerido em biomassa. A assimilação desses alimentos foi obtida através da correção da quantidade de fezes produzidas pela covariável quantidade de alimento consumido.

Após a realização da ANCOVA, quando a interação entre a covariável e o tratamento foi significativa, considerou-se o efeito dos tratamentos ajustados pela covariável, porém, quando essa interação (covariável x tratamento) não foi significativa, utilizou-se o modelo de linhas paralelas, considerando somente o efeito dos tratamentos.

3.4.5.4 Extração de flavonoides

Para a realização das análises de compostos secundários o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, dos sete tratamentos (BRS 257, BR 16,

Dowling, PI 229358, IAC 100, PI 227687 e BRS 359 RR) com seis repetições, totalizando 42 unidades experimentais ou parcelas.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Mortalidade, Tempo de Desenvolvimento, Peso Seco Inicial, Peso de Pupa, Alimento Consumido, Peso de Fezes, Alimento Digerido e Tempo de Alimentação da 40ª Geração De *A. gemmatalis* Resistentes ao AgMNPV

Ao avaliar os efeitos dos tratamentos na mortalidade das larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV da 40ª geração, observou-se que o efeito foi variável durante os diferentes instares larvais. No desenvolvimento total do inseto a mortalidade foi maior no genótipo PI 229358 com 32% de mortalidade, a testemunha por sua vez obteve 16% de mortalidade, sendo o segundo valor de mortalidade entre os demais tratamentos, e o genótipo IAC 100 obteve 12%, no qual essas diferenças foram comparadas com o valor de $\chi^2_{(5;0,05)} = 59,79$ (Tabela 3.2). Os maiores valores ocorreram no quarto instar que apresentou mortalidade em todos os tratamentos, com exceção da soja BRS 359 RR que não provocou mortalidade. Estes valores foram obtidos quando as larvas foram tratadas com o genótipo PI 229358 (24%), BRS 257 (16%) e PI 227687 (10%). No decorrer do desenvolvimento a mortalidade foi decrescendo em todos os tratamentos, com exceção do genótipo PI 229358, que manteve mortalidade até o sexto instar, inclusive nos estágios de pré-pupa (2,7%) e pupa (5,4%). Para considerar a mortalidade nestes estágios foram consideradas duas características morfológicas: a não transformação das larvas em pupa (quando não ocorria a liberação da cápsula cefálica e do tegumento) e a segunda característica a presença de pupas deformadas (deformação abdominal).

Tabela 3.2 –Tempo de desenvolvimento total (dias) (Média \pm EP) e porcentagem de mortalidade total no desenvolvimento da 40ª geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja.

Tratamentos	Dias de Desenvolvimento Total	Mortalidade Total (%)
BRS 257	10,69 \pm 0,22 ab	16,00
BR 16	10,57 \pm 0,18 b	8,00
Dowling	10,87 \pm 0,18 ab	8,00
PI 229358	11,57 \pm 0,28 a	32,00
IAC 100	11,43 \pm 0,30 ab	12,00
PI 227687	11,36 \pm 0,17 ab	10,00
BRS 359 RR	11,06 \pm 0,17 ab	2,00
Valor de F	2,97*	--
CV%	11,5	--
χ^2	--	59,79***

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05). *P<0,05; **P<0,01;***P<0,001

O tempo de desenvolvimento das larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV foi afetado pelos tratamentos e observado na ANOVA (Tabela 3.1). O efeito foi maior quando foram alimentadas com o genótipo PI 229358 (11,60 dias), em comparação com a testemunha BRS 257 (10,70 dias) considerando o desenvolvimento total. Em todos os instares o mesmo tratamento PI 229358, proporcionou o prolongamento dos estádios larvais.

Nas variáveis: peso inicial das larvas de (2º/3º instar), peso de pupas, consumo foliar, peso de fezes e alimento digerido houve interferência significativa dos diferentes tratamentos conforme apresentado na ANOVA (Tabela 3.3).

O peso inicial foi influenciado negativamente pelo tratamento IAC 100, no qual a lagarta apresentou menor peso em comparação aos demais genótipos (0,33 mg), refletindo num menor peso de pupa (24,22 mg) em relação a testemunha BRS 257 (30,17 mg).

Larvas alimentadas em folhas da PI 229358 apresentaram o maior peso inicial (0,65 mg), peso de pupa semelhante ao obtido pelas larvas que consumiram folhas da testemunha (BRS257 e BR 16). Ainda esses indivíduos se alimentaram por um tempo mais longo em relação aos demais.

Além do tratamento IAC 100, larvas quando alimentadas em folhas da Dowling e BRS 359 RR resultaram em menores peso de pupas (25,35 e 22,84 mg) respectivamente. O menor peso de pupa observado nas larvas alimentadas com BRS 359 RR

pode estar relacionado, ao fato das larvas desse tratamento ter consumido a menor quantidade de alimento (consumo foliar) entre os demais genótipos (196,86 mg), proporcionando dessa maneira, a menor quantidade de alimento digerido (109,99 mg).

As larvas provenientes do tratamento IAC 100 foram as que obtiveram o maior consumo foliar com (268,45 mg), proporcionando dessa forma a maior quantidade de alimento digerido (184,86 mg) superior ao valor apresentado na testemunha BRS 257 (125,14 mg).

A maior e as menores quantidades de fezes foram produzidas pelas larvas alimentadas em folhas dos genótipos Dowling (102,55 mg), PI 229358 (80,32 mg) e PI 227687 (80,88 mg) conforme apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Peso seco inicial de larvas de 2º/3º instar (mg), peso seco de pupa (mg), consumo foliar (mg), peso seco de fezes (mg), alimento digerido (mg), tempo total de alimentação (dias) (Média ± EP) da 40ª geração de *A. gemmatalis* resistente ao AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja.

Tratamento	Peso Seco Inicial (mg)	Peso Seco de Pupa (mg)	Consumo Foliar (mg)	Peso seco de fezes (mg)	Alimento Digerido (mg)	Tempo de Alimentação Total (dias)
BRS 257	0,44 ± 0,012 bc	30,17 ± 1,04 a	217,26 ± 7,56 cd	92,04 ± 3,07 abc	125,14 ± 6,95 b	9,27 ± 0,20 b
BR 16	0,50 ± 0,013 b	25,86 ± 1,06 bc	233,10 ± 8,14 bc	96,93 ± 3,30 ab	136,17 ± 7,65 b	9,02 ± 0,16 b
Dowling	0,41 ± 0,010 c	25,35 ± 0,77 c	216,58 ± 9,35 cd	102,55 ± 3,55 a	127,37 ± 9,10 b	9,33 ± 0,18 b
PI 229358	0,65 ± 0,027 a	28,51 ± 1,22 ab	247,86 ± 6,60 abc	80,32 ± 3,83 c	167,54 ± 8,17 a	10,23 ± 0,26 a
IAC 100	0,33 ± 0,019 d	24,22 ± 1,08 c	268,45 ± 7,57 a	83,60 ± 3,37 bc	184,86 ± 6,88 a	9,76 ± 0,24 ab
PI 227687	0,41 ± 0,018 c	26,29 ± 1,03 abc	258,86 ± 7,19 ab	80,88 ± 2,82 c	177,98 ± 6,59 a	9,83 ± 0,16 ab
BRS 359 RR	0,48 ± 0,01 bc	22,84 ± 0,69c	196,86 ± 5,73 d	87,07 ± 2,55 cb	109,99 ± 5,62b	9,15 ± 0,16 ab
Valor de F	29,90***	6,59***	12,01***	6,96***	16,34***	4,61*
CV%	21,79	22,06	19,40	20,99	30,07	11,96

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05), *P<0,05; **P<0,01;***P<0,001.

3.5.2 Crescimento, Consumo Ganho de Peso, Eficiência na Conversão do Alimento Ingerido e Digerido em Biomassa e Assimilação na Conversão do Alimento

Ao analisar a interação entre o tempo de alimentação (covariável) em relação a todos aos tratamentos oferecidos para as larvas de *A. gemmatalis*, pode ser observado que não houve interação significativa (Tabela 3.4 a). Ambos os fatores tratamento e a covariável tempo de alimentação foram significativos de forma independente, pois, não há uma relação entre elas (Figura 3.1).

A relação entre o peso de pupa e o tempo de alimentação (crescimento) pode ser representada pelo modelo de linhas paralelas, observando-se uma tendência positiva no crescimento das larvas em todos os tratamentos, ou seja, maior tempo de alimentação resultando em maior tempo de alimentação resultando em maior peso. A testemunha BRS 257 apresentou a maior média em peso de pupa (30,42 mg) em relação aos demais genótipos como observado no gráfico de colunas inserido na Figura 3.1.

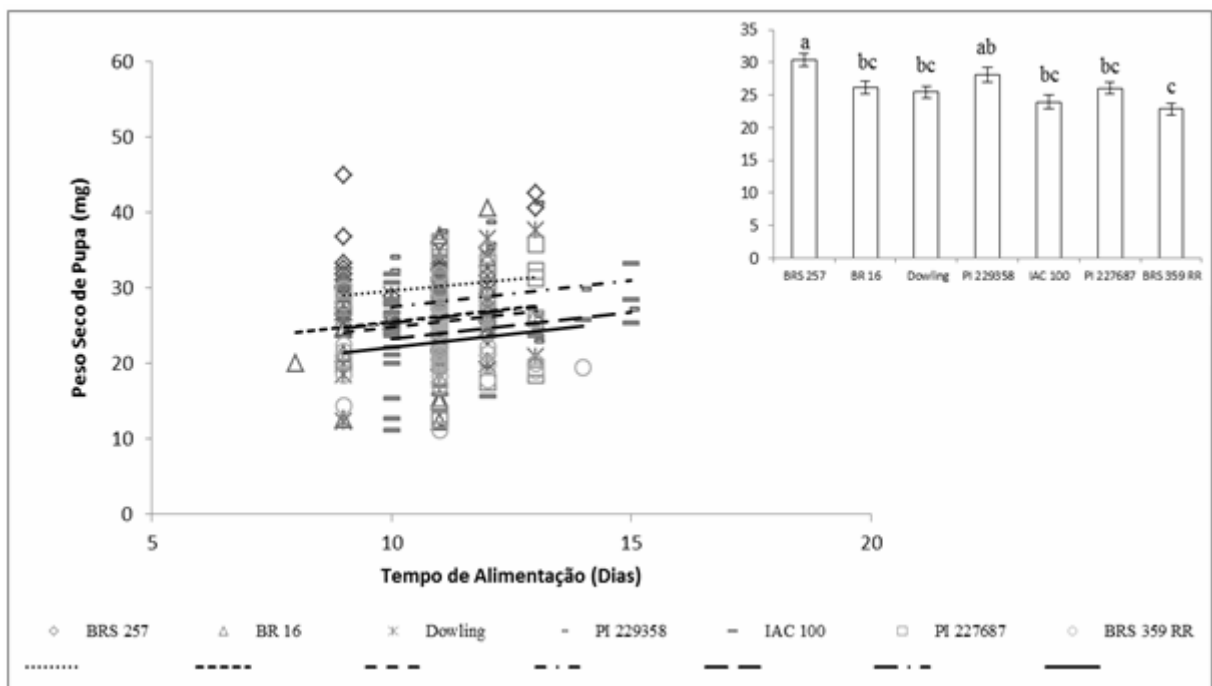
Tabela 3.4 –Análise de Covariância (ANCOVA) para avaliação dos efeitos dos tratamentos no ajuste de peso de pupa pelas covariáveis tempo de alimentação (a) peso inicial (c), alimento digerido (d) alimento consumido (e); alimento consumido; pela covariável tempo de alimentação (a), peso de fezes pelas covariável alimento consumido (e) na 40ª geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV.

Variação	GL	Valor de F		
		Peso de Pupa	Alimento Consumido	Peso de Fezes
(a) Tempo de Alimentação (covariável)	1	6,65 ^{***}	--	--
Tratamento (genótipos)	6	5,93 [*]	--	--
Tempo de Alimentação x Tratamento	6	0,57 ^{ns}	--	--
Resíduo	231	--	--	--
Tratamento (genótipos)	6	6,72 ^{***}	--	--
Tempo de Alimentação	1	6,00 [*]	--	--
Resíduo	237	--	--	--
(b) Tempo de Alimentação (covariável)	1	--	51,48 ^{***}	--
Tratamento (genótipos)	6	--	1,42 ^{***}	--
Tempo de Alimentação x Tratamento	6	--	1,60 ^{ns}	--
Resíduo	229	--	--	--
Tratamento (genótipos)	6	--	13,81 ^{***}	--
Tempo de Alimentação	1	--	50,71 ^{***}	--
Resíduo	235	--	--	--
(c) Peso Inicial (covariável)	1	2,19 ^{***}	--	--
Tratamento (genótipos)	6	6,55 ^{***}	--	--
Peso Inicial x Tratamento	6	0,58 ^{ns}	--	--
Resíduo	231	--	--	--
Tratamento (genótipos)	6	6,62 ^{***}	--	--
Peso Inicial	1	2,21 ^{ns}	--	--
Resíduo	237	--	--	--
(d) Alimento Digerido (covariável)	1	7,14 [*]	--	--
Tratamento (genótipos)	6	2,21 [*]	--	--
Alimento Digerido x Tratamento	6	0,60 ^{ns}	--	--
Resíduo	231	--	--	--
Tratamento (genótipos)	6	7,21 [*]	--	--
Alimento Digerido	1	16,46 ^{***}	--	--

Resíduo	237	--	--	--
(e) Alimento Consumido (covariável)	1	19,49 ^{***}	--	15,44 [*]
Tratamento (genótipos)	6	0,48 ^{ns}	--	2,22 ^{***}
Alimento Consumido x Tratamento	6	0,42 ^{ns}	--	1,37 ^{ns}
Resíduo	231	--	--	--
Tratamento (genótipos)	6	7,11 ^{***}	--	7,38 ^{***}
Alimento Consumido	1	19,78 ^{***}	--	15,30 ^{***}
Resíduo	237	--	--	--

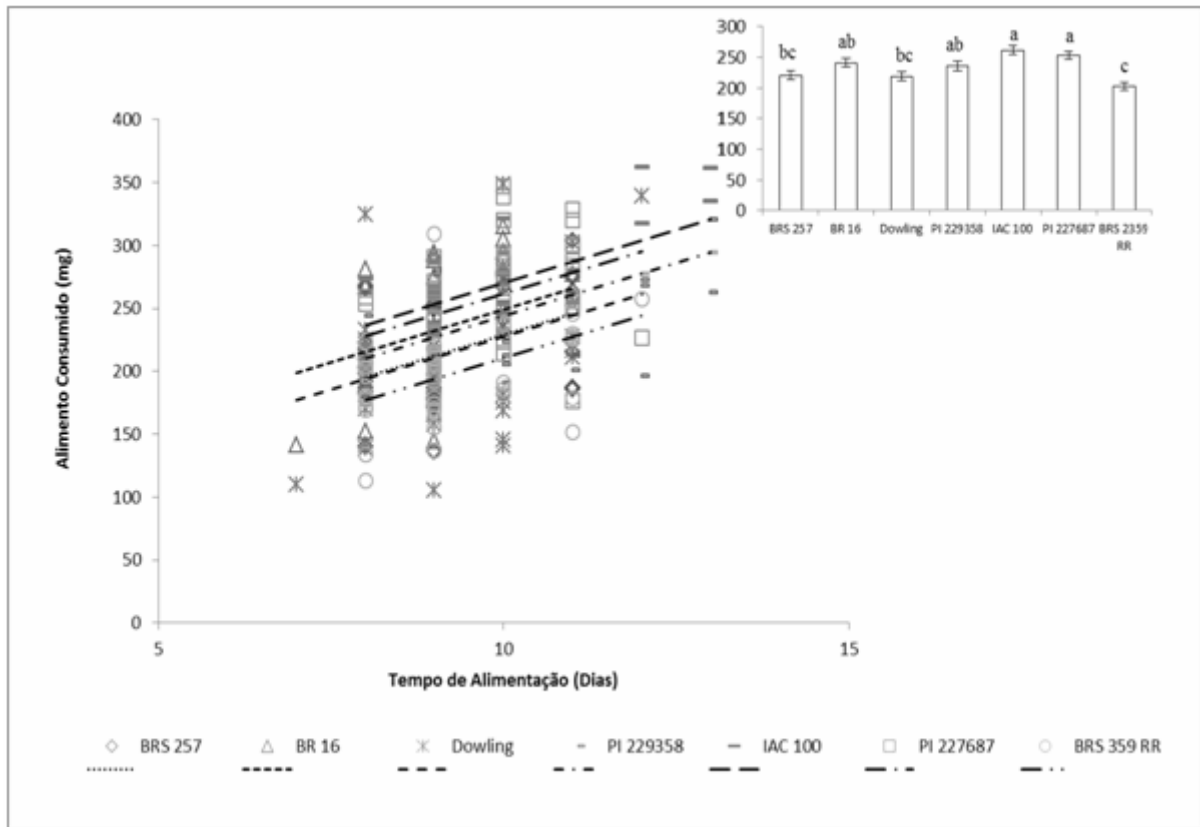
*P<0,05; **P<0,01;***P<0,001; ns – não significativo.

Figura 3.1 –Relação entre peso de pupa (mg) e tempo de alimentação (dias) de larvas da 40ª geração de *A. gemmatilis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV.



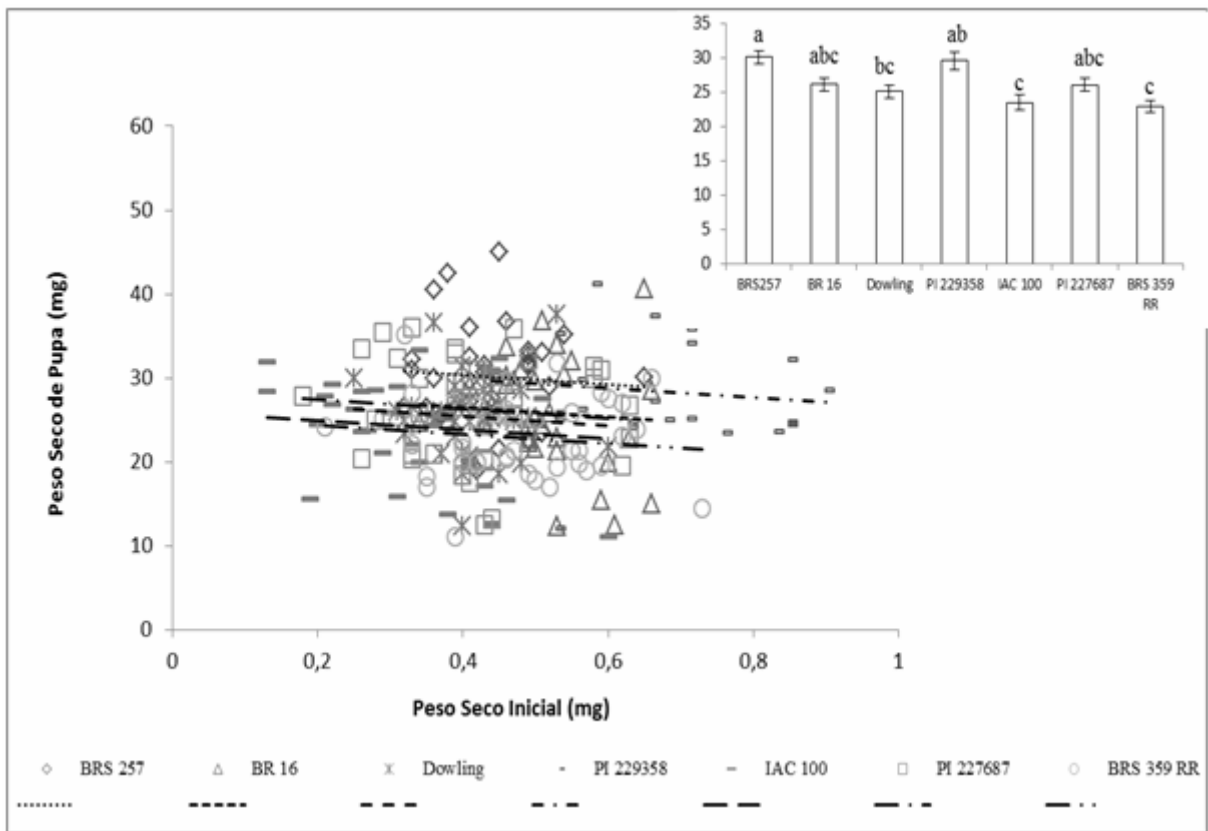
Os dados apresentados para o consumo na Tabela 3.4 b, mostram que não houve interação significativa entre a covariável tempo de alimentação e os tratamentos. Dessa forma, a relação pode ser representada através do modelo de linhas paralelas (Figura 3.2). O efeito do tratamento e do tempo de alimentação foi significativo, mostrando que o consumo foi influenciado pela covariável (tempo de alimentação) e pelos tratamentos de forma independente. Os maiores consumos pode ser observado em larvas tratadas com folhas de IAC 100 e PI 227687 em relação aos tratamentos BRS 257, Dowling e BRS 359 RR, conforme representado no gráfico de colunas inserido na Figura 3.2.

Figura 3.2 – Relação entre alimento consumido (mg) e tempo de alimentação (dias) de larvas da 40ª geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV.



A análise para ganho de peso foi realizada através do ajuste da variável peso de pupa pela covariável peso inicial das larvas. Não houve efeito significativo para a interação entre a covariável (peso inicial) e os demais fatores (Tabela 3.7 c). Assim sendo assume-se que os dados obtidos na ANOVA são válidos a relação pode ser representada pelo modelo de linhas paralelas, no qual, pode ser observado que o ganho de peso ocorre de forma constante em todos os tratamentos, e houve apenas efeito significativo dos tratamentos (Figura 3.3). O maior ganho de peso pode ser observado em larvas tratadas com folhas de BRS 257 em relação aos demais genótipos.

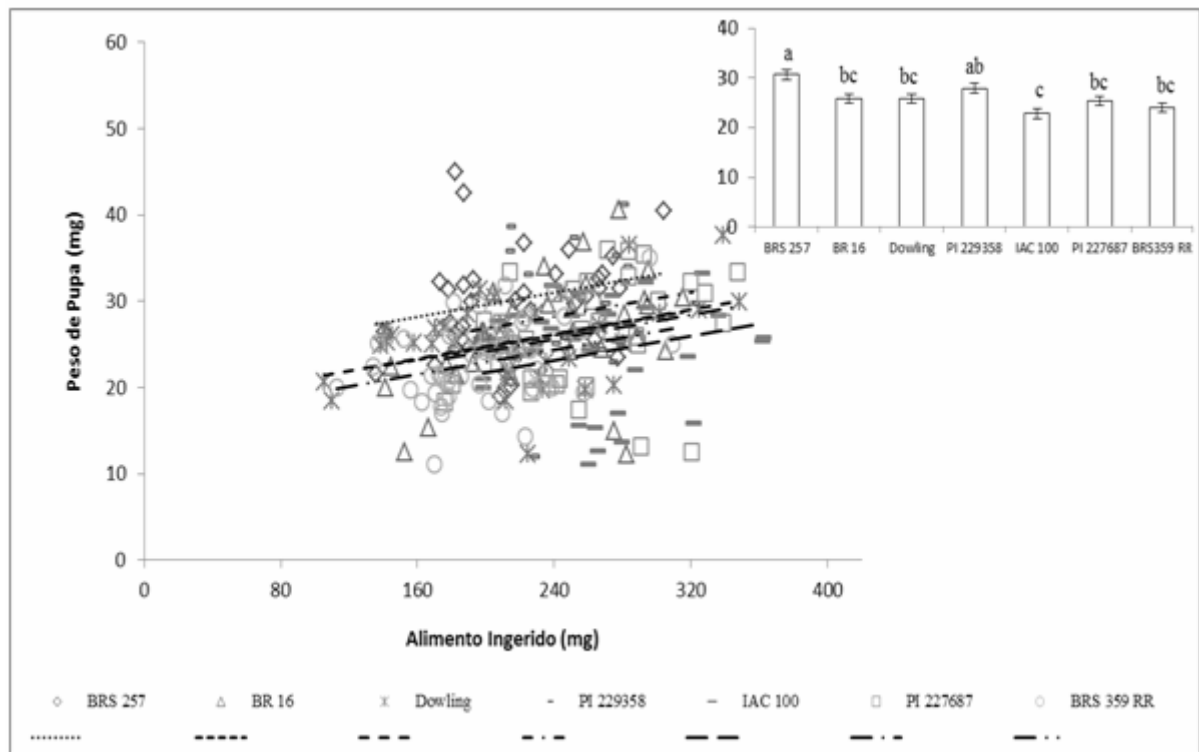
Figura 3.3 – Relação entre quantidade o peso seco de pupa (mg) e o peso seco inicial (mg) da 40ª geração de *A. gemmatilis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja.



Durante o desenvolvimento larval, as quantidades de alimento ingerido dos diferentes tratamentos não apresentaram efeito significativo na interação com o peso de pupa (Tabela 3.8 e). Entretanto, o efeito das variáveis foi independente, ou seja, para o tratamento (genótipo) e o alimento ingerido e/ou consumido.

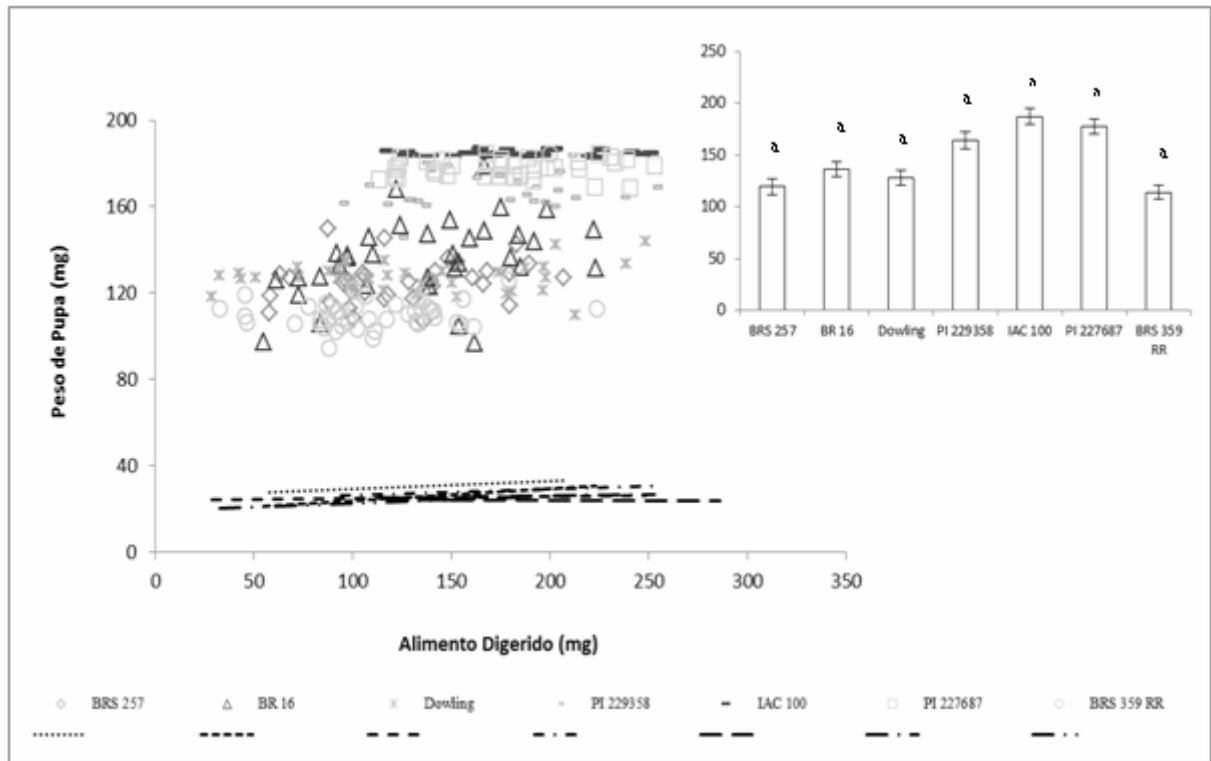
Na Figura 3.4 observa-se a relação positiva entre os tratamentos, entretanto, as larvas do genótipo IAC 100, não foi eficiente na conversão do alimento em biomassa, apresentou menor média (o peso de pupa foi o menor 22,92 mg) entre os tratamentos.

Figura 3.4 – Relação entre peso de pupa (mg) e alimento ingerido (mg) da 40ª geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja.



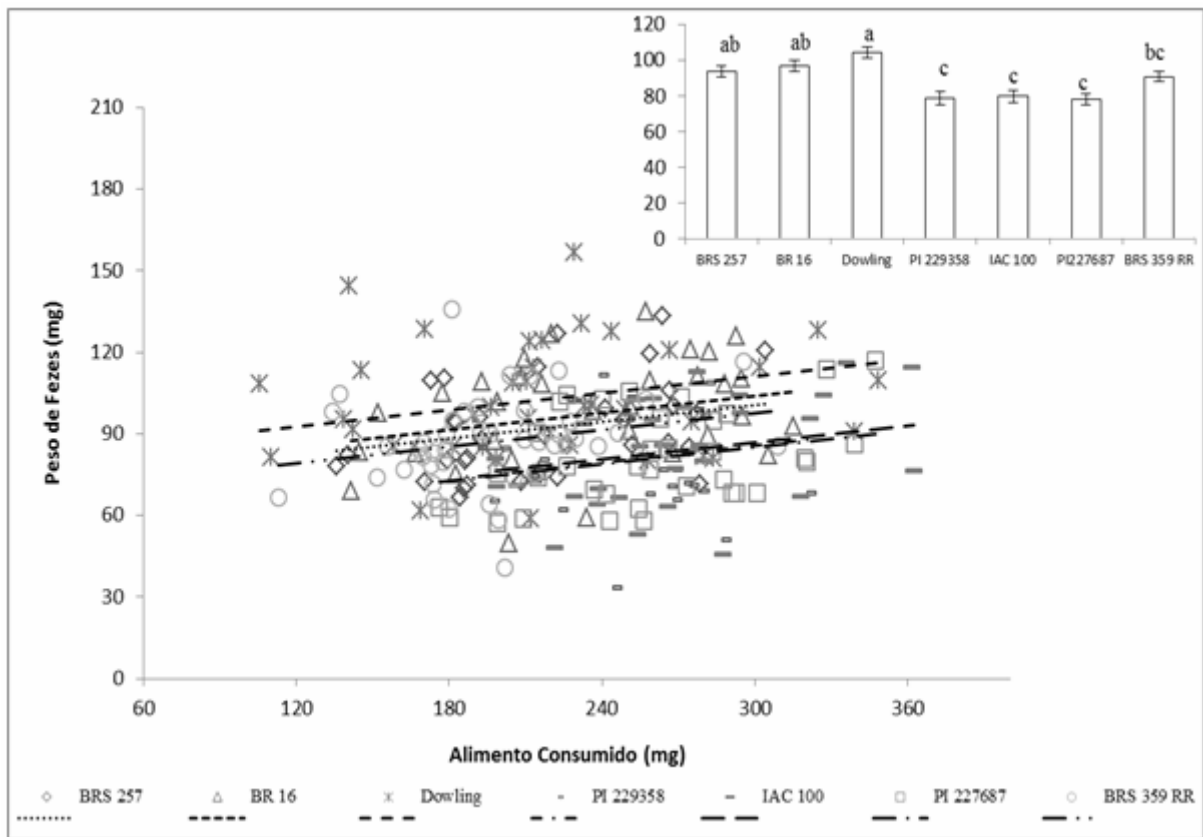
A relação entre a covariável alimento ingerido e os genótipos não apresentaram interação significativa na avaliação do ganho de peso ou peso de pupa (Tabela 3.4 d). Dessa forma o crescimento da pupa é independente entre as variáveis. De um modo geral, todos os insetos não foram eficientes na conversão de alimento ingerido em biomassa (peso de pupa).

Figura 3.5 – Relação entre peso de pupa (mg) e alimento digerido (dias) da 40ª geração de *A. gemmatilis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja.



Na análise de covariância para estimar a assimilação de alimento ingerido e/ou consumido, a interação entre o consumo (covariável) e os tratamentos não foi significativa (Tabela 3.4 e). Porém, quando o consumo foi avaliado independentemente dos tratamentos, foi verificado que há uma influência significativa no peso de fezes produzidas pelas larvas. Uma relação positiva entre a quantidade de alimento consumido e o peso de fezes pode ser observada na Figura 3.6. O tratamento Dowling provocou nas larvas uma maior perda de nutrientes através das fezes em relação ao consumo. Nos tratamentos IAC 100, PI 229358 e PI 227687 observa-se os menores valores, e podem ser considerados os mais eficientes na assimilação do alimento pelas larvas, ou seja, quanto menor o peso médio de fezes, menor a quantidade de alimento consumido perdido nas fezes do inseto em relação à Dowling (Figura 3.6).

Figura 3.6 – Relação entre peso de fezes (mg) e alimento consumido ou consumo (mg) da 40ª geração de *A. gemmatalis* resistente ao nucleopoliedrovírus AgMNPV tratadas com diferentes genótipos de soja.



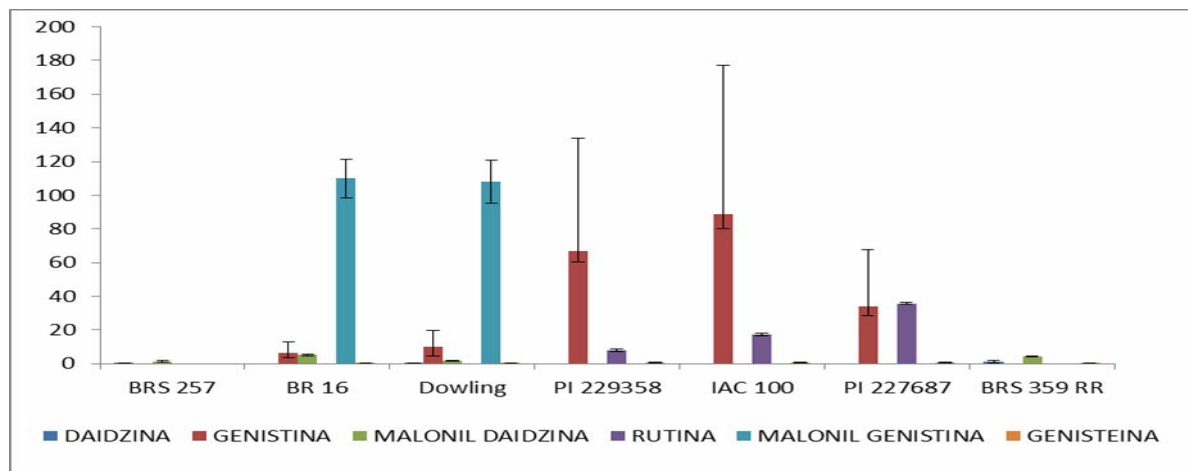
3.5.3 Identificação e Quantificação de Flavonoides Rutina e Genistina

A Tabela 3.5 mostra a ocorrência de seis compostos fenólicos (daidzina, genistina, malonil daidzina, rutina, malonil genistina e genisteína) nos genótipos de soja. O genótipo BRS 257 apresentou em sua composição as isoflavonas daidzina e malonil daidzina; nos genótipos BR 16 e Dowling foram identificados as isoflavonas: genistina, malonil daidzina, malonil genistina e genisteína; os genótipos PI 229358, IAC 100 e PI 22687 eram compostos por genistina, rutina e genisteína e a cultivar transgênica BRS 359 RR apresentava em sua composição daidzina, malonil e genisteína.

Tabela 3. 5 – Concentração (ng/mg) (média ± EP) de flavonoides nos genótipos de soja

Tratamentos	Flavonoides Concentração (ng/mg)					
	Daidzina	Genistina	Malonil Daidzina	Rutina	Malonil Genistina	Genisteína
BRS 257	0,18 ± 0,18 a	0,00 ± 0,00 d	1,34 ± 0,50 bc	0,00 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 a
BR 16	0,00 ± 0,00 a	6,57 ± 3,22 d	5,16 ± 0,61 a	0,00 ± 0,00 d	110,08 ± 11,44 a	0,21 ± 0,14 a
Dowling	0,27 ± 0,27 a	9,85 ± 5,04 d	1,70 ± 0,31 b	0,00 ± 0,00 d	107,98 ± 12,93 a	0,33 ± 0,24 a
PI 229358	0,00 ± 0,00 a	66,94 ± 6,57 b	0,00 ± 0,00 c	7,87 ± 0,73 c	0,00 ± 0,00 b	0,49 ± 0,19 a
IAC 100	0,00 ± 0,00 a	88,52 ± 8,33 a	0,00 ± 0,00 c	17,36 ± 1,02 b	0,00 ± 0,00 b	0,52 ± 0,20 a
PI 227687	0,00 ± 0,00 a	33,80 ± 5,29 c	0,00 ± 0,00 c	35,81 ± 0,35 a	0,00 ± 0,00 b	0,55 ± 0,27 a
BRS 359 RR	1,23 ± 0,78 a	0,00 ± 0,00 d	4,44 ± 0,30	0,00 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 b	0,24 ± 0,24 a
Valor de F	1,97*	51,64***	47,55***	440,91***	66,44***	0,85 ^{ns}
CV (%)	326,75	41,89	45,24	16,95	51,32	147,81

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ns – não significativo)

Figura 3. 7 – Concentração (ng/mg) (média ± EP) de flavonoides nos genótipos de soja

3.6 DISCUSSÃO

3.6.1 Mortalidade, Tempo de Desenvolvimento, Peso Seco Inicial, Peso de Pupa, Alimento Consumido (Consumo), Peso de Fezes, Alimento Digerido e Tempo de Alimentação da 40ª Geração de *A. gemmatalis* Resistentes ao AgMNPV

Ao analisar a variável mortalidade em larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao nucleopoliedrovírus AgMNPV da 40ª geração alimentadas com folhas de soja, pode observar que o tratamento PI 229358 (24%) com característica de resistência a insetos, obteve a maior

porcentagem de mortalidade. Alguns estudos realizados por Piubelli et al. (2005) ao verificarem os efeitos deletérios de diferentes extratos foliares adicionadas à dieta artificial, na biologia de *A. gemmatalis* suscetíveis ao vírus AgMNPV, observaram apenas 5,1% dos insetos morreram ao se alimentarem de folhas da PI 229358. Hoffmann-Campo (1995), ao verificar o efeito dos extratos de genótipos de soja adicionados à dieta artificial em *H.virescens*, observou mortalidade de 45% na PI 227687 e apenas 10% na PI 229358. Mas vale ressaltar que ambos os estudos foram realizados com a utilização do extrato puro em dieta artificial, diferindo da metodologia aplicada em nossos experimentos, no qual, as larvas foram alimentadas com folhas dos genótipos “in natura”. Nossos resultados poderiam ser confrontados com os obtidos por Hatchett, Beland e Hartwig (1976), que observaram elevados valores de mortalidade 100% (PI 229358), entretanto em outro inseto. Após a análise dos extratos, foliares da PI 229358 observou-se em sua composição foliar os flavonoides genistina (66,94 ng/mg) e rutina (7,87 ng/mg), sendo que a ação de ambos podem estar influenciando na mortalidade dos insetos, concordando com Gazzoni, Hülsemeyer e Hoffmann-Campo (1997). Esses autores relatam que as doses crescentes de rutina, provocam efeitos biológicos adversos em *A. gemmatalis* que reflete em aumento da mortalidade do inseto.

Além de causar a mortalidade durante os estádios larvais, o genótipo PI 229358 foi o único tratamento que promoveu mortalidade no estágio de pré-pupa (2,7%) e pupa (5,4%). Geralmente o baixo índice de mortalidade no estágio de pré-pupa deve-se a drástica redução de ingestão de folhas na transição deste estágio reduzindo a ingestão de flavonoides, entretanto há que se considerar que isoflavonas (por exemplo, daidzina) podem ser retirados (sequestrados) chegando até a fase adulta.

Foi observada a presença de algumas larvas de 5º e 6º instar com característica de bloqueio de ecdise, devido pela impossibilidade de liberar tanto o tegumento como a cápsula cefálica. Quando essas larvas completaram a sua transformação em pupa foi observado a presença de deformação abdominal. Fugì, Lourenção e Parra (2005), notaram estas mesmas anomalias em pré-pupas e pupas de *A. gemmatalis* suscetíveis ao vírus, nos tratamentos ‘IAC24’, ‘IAC 17’ e PI 229358 respectivamente.

A presença de pupas deformadas pode estar relacionada a uma deficiência nutricional ou presença de compostos tóxicos como apresentada pelo genótipo PI 229358. Hirai (1976) verificou a presença de pupas deformadas de *Leucania separata* (Walker) e atribuiu à alta concentração de ácido ascórbico (metabólito do metabolismo primário de insetos) presente na dieta oferecida às larvas. Outros autores relatam a presença desse evento

em várias espécies de Noctuídeos, mesmo quando o alimento fornecido era artificial (na forma de dieta) ou natural (“in natura”) (HIRAI, 1976; MIHSFELDT; PARRA, 1999; SALVADORI; PARRA, 1990).

Além do fator nutricional do alimento a presença dos flavonoides pode ser determinante, pois durante a fase de pupa o inseto passa por profundas transformações morfológicas e fisiológicas. Estas transformações requerem a intensa demanda na atividade bioquímica, e elevada participação hormonal e enzimática, que pode ser prejudicada pela ação dos flavonoides durante a fase larval, bloqueando as rotas bioquímicas e reduzindo a assimilação de substâncias essenciais ou no acúmulo de reservas (DUFFEY; ISMAN, 1980; ISMAN; DUFFEY, 1982). Além disso, as anomalias observadas podem ser atribuídas às alterações fisiológicas ocorridas no intestino médio das larvas principalmente nas células endócrinas. As células endócrinas estão diretamente ligadas a diversas funções e principalmente no desenvolvimento do inseto. Estas células secretam peptídeos como alatotropina e alatostatina (hormônios) ambos são aminas hidrossolúveis e estão relacionados a regulação da síntese do hormônio juvenil acelerando ou retardando a síntese do mesmo (PRATT et al., 1989; WOODHEAD et al., 1989; EDWARDS; WEAVER, 2001). O hormônio juvenil e outros componentes endócrinos estão relacionados com a regulação dos diversos processos endócrinos como desenvolvimento, muda e metamorfose (NIJHOUT, 1998).

Outras variáveis influenciadas pelos efeitos dos tratamentos foi o tempo de desenvolvimento e alimentação total, no qual, o tratamento PI 229358, prolongou o ciclo larval e o tempo de alimentação, diferindo das testemunhas suscetíveis a insetos BRS 257 e BR 16. Gazzoni e Tutida (1996) e Fugi, Lourenção e Parra (2005), observaram também o incremento no tempo de desenvolvimento em larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis ao vírus quando essas larvas foram alimentadas com soja resistente a insetos.

O prolongamento no tempo de desenvolvimento e no período de alimentação pode ser atribuído diretamente a alguns fatores importantes como: a baixa qualidade nutricional apresentada pelo genótipo (SCRIBER; SLANSKI JÚNIOR, 1981) e a presença de toxinas que tornam esse alimento inadequado para a alimentação (GAZZONI, TUTIDA, 1996; PANIZZI; PARRA, 2009). O prolongamento no tempo de alimentação devido ao fator nutricional é normal em lagartas, pois estrategicamente para atingir o peso ideal prolonga o período de alimentação. Esse fato tem uma vantagem para o inseto, e desvantagem para a planta. Entretanto é necessário considerar que, da mesma forma o inseto estará por mais tempo sujeito a predação e parasitismo.

De Bortoli et al. (2005) avaliaram aspectos biológicos de *A. gemmatalis* em diferentes substratos (genótipos de soja, amendoim e dieta artificial), e observaram que o amendoim prolongou o seu tempo de desenvolvimento. Os autores correlacionaram esse fato à deficiência de nutrientes necessários para o desenvolvimento larval. Outro fator relacionado ao prolongamento no tempo de desenvolvimento pode ser a presença de substâncias químicas. Gazzoni, Hülsemeyer, Hoffmann-Campo (1997) observaram que a presença de rutina e quercentina prolongaram o ciclo e aumentaram o número de instar *A. gemmatalis*, possivelmente para atingir as condições necessárias para completar o seu desenvolvimento.

No desenvolvimento larval o 5º instar apresentou as maiores médias em relação à quantidade de dias diferindo dos demais tratamentos. O tratamento BRS 359 RR obteve a maior média e IAC 100 a menor média. Nas populações suscetíveis o número médio de instares larvais são cinco, entretanto, em larvas resistentes todos os tratamentos observados apresentaram larvas atingindo seis instares.

O prolongamento do 5º instar observados em lagartas do tratamento IAC 100 e PI 229358 pode estar relacionado ao custo metabólico que as larvas resistentes ao vírus AgMNPV possuem para manter o mecanismo. Dessa forma as lagartas necessitam armazenar energia e atingir o peso ideal para a muda mantendo-se resistente ao vírus. Segundo Abot (1997) o fato de uma população ser submetida à pressão de seleção ao vírus AgMNPV pode provocar uma série de reações, que de acordo com a espécie e com as condições que afetam ou não o seu desenvolvimento.

A variável peso inicial das lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com IAC 100 teve interferência negativa em comparação com as testemunhas suscetíveis (BRS 257 e BR 16). Esse fato foi observado também por Salvador (2008) que observou com a mesma espécie valor inferior no peso das lagartas de 2/3º instares (peso inicial) alimentadas com folhas de IAC 100 sem afetar drasticamente o desenvolvimento do inseto. Entretanto as larvas com maior peso inicial do tratamento PI 229358, no presente trabalho foi responsável pelo maior índice de mortalidade. Esse fato coincide com os de Klocke e Kubo (1991), no qual os autores correlacionam a presença de deterrentes de consumo que afetam inicialmente apenas o comportamento dos insetos, porém podem tornar-se tóxicos se atingirem altos níveis no seu organismo (aumento na concentração) ao longo do desenvolvimento, pois nem todos os compostos são totalmente excretado, parte é retido no corpo o inseto.

Em geral o baixo consumo até o 3º instar quando 3% do consumo total de todo o seu ciclo larval pode ser estratégico para o inseto (LEPPLA et al., 1977; GAZZONI et al., 1981).

IAC 100, além de influenciar no peso inicial, foi responsável pelo menor peso de pupa. O mesmo ocorreu com os experimentos de Salvador (2008), ao tratar lagartas *A. gemmatalis* suscetíveis ao vírus chegaram a valores aproximados. O autor atribuiu o baixo peso ao fato do genótipo IAC 100 apresentar em sua composição química concentração intermediária de rutina e uma das maiores concentrações de genistina em comparação aos demais genótipos analisados.

O fato foi confirmado em nosso experimento, pois após a quantificação dos compostos químicos observou-se a mesma proporção. Ou seja, observou-se valor médio (17,36 ng/mg) para rutina e alto (88,52 ng/mg) para genistina em comparação aos demais tratamentos.

Além dos flavonoides a presença de outros compostos químicos podem estar interferindo negativamente no peso de pupa. Silva et al. (2002), observaram que as folhas do genótipo IAC 100 produzem a enzima lipoxigenase. Esta enzima está relacionada com o aumento da expressão de genes de defesa da planta, principalmente as plantas que expressam para os inibidores de proteases (IPIs).

A presença de outros compostos químicos ou possivelmente outras enzimas de outras rotas metabólicas foliares pode ser responsáveis pelos efeitos de BRS 359 RR sobre *A. gemmatalis*. Nesse genótipo não apresentou rutina e genistina na composição química foliar, mas neste tratamento observou-se o menor peso de pupa e conseqüentemente menor ganho de peso evidenciando possivelmente a presença de outros compostos e dos inibidores que pode estar ligado aos mesmos compostos e/ou enzimas que confere a este genótipo a resistência ao herbicida glifosato.

Pilon, Oliveria e Guedes (2006) relatam que alguns dos inibidores de proteases (IPIs) são produzidos naturalmente por plantas que possuem tanto a característica de resistência a herbivoria causada por insetos, como também em plantas transgênicas com resistência a outros fatores nesse caso ao glifosato. Nos experimentos desses autores a presença dessas substâncias interfere no peso de pupas de *A. gemmatalis*. Os IPIs são substratos específicos das proteases digestivas dos insetos formando um complexo estável, no qual, a proteólise é limitada e extremamente lenta (TIFFIN; GAUT, 2001). A ingestão crônica dessas substâncias pode acarretar a deficiência de aminoácidos essenciais que influenciam no crescimento e desenvolvimento do inseto (PILON; OLIVERIA; GUEDES, 2006).

Levando em consideração a variável peso de pupa, o tratamento que foi mais favorável foi a testemunha BRS 257, a qual não apresenta flavonoides na sua composição foliar. A qualidade da reserva nutricional contida nas pupas não foi determinada

em nossos estudos. Entretanto Piubelli (2004) observou que a maior porcentagem de lipídeo foi acumulada nas pupas, cujas lagartas foram alimentadas com BR 16, o qual não contém rutina e genistina em baixa concentração (a mais baixa neste estudo).

Sabe-se que em insetos o alto peso está associado a um elevado nível de reserva, ou seja, o acúmulo de gordura ou lipídeo, que são necessários para o bom desenvolvimento do inseto na fase reprodutiva (cópula, fertilidade, oviposição, viabilidade) e dispersão (BROUGHT; DIXON 1989; MASON; JOHNSON; WOODRING, 1989; GAZZONI; TUTIDA; 1996). Assim esse nível de reserva pode estar associado à qualidade do alimento fornecido às larvas durante o seu desenvolvimento.

Esse fato pode ser observado na variável consumo foliar, no qual o genótipo mais consumido foi obtido em larvas tratadas com IAC 100 (268,45 mg) e o menor foi observado no tratamento BRS 359 RR (196, 86 mg). Os resultados desse trabalho são semelhantes aos de Piubelli et al. (2005) pois as larvas tratadas com dieta contendo extratos do genótipo IAC 100 foram as mais consumidas, assim possivelmente não há deterrentes nessa cultura. Entretanto, como o maior consumo não influenciou de forma positiva no crescimento nas lagartas, vale ressaltar que os extratos foram responsável pela elevada mortalidade. Nos nossos trabalhos esse mesmo tratamento interferiu no peso inicial e de pupa, mas a mortalidade foi de apenas 12% dos indivíduos.

Esse resultado mostra que apesar do genótipo IAC 100 que é descendente das PI 227687 e PI 229358 apresentar as características de resistência e a presença dos flavonoides rutina e genistina, que causam interferências biológicas e provocam efeitos antibióticos lagartas de *A. gemmatilis* não a rejeitaram. Contrariando Rosseto e Miranda (1981) que observaram baixo desfolhamento provocado por coleópteros mastigadores *D. speciosa* e *Cerotoma arcuata* (Olivier) nos genótipos progenitores (PI 227687 e PI 229358) que atribuíram o fato possivelmente a presença de deterrentes alimentares. Ou seja, possivelmente esse genótipo apresenta resistência multigênica a insetos, sendo que as combinações de fatores morfológicos, físicos e químicos interferem na biologia do inseto, como observado em *D. speciosa* e *C. arcuata* (ROSSETO; MIRANDA, 1981; ROSSETO et al., 1995), *Bemisia tabaci* (Gennadius) (VALLE; LOURENÇÃO; 2002), *A. gemmatilis* (OLIVEIRA; HOFFMANN-CAMPO; MAZZARIN, 1993). Os fatores morfológicos não foram analisados por Piubelli (2004) e Salvador (2008), pois estes autores trabalharam com extratos de plantas. Segundo Lara (1991) uma mesma planta pode apresentar todos os níveis de resistência, e estes fatores podem se manifestarem de forma positiva ou negativa devido a

algumas características como a planta, insetos (espécie, biótipo, fase de desenvolvimento), condições ambientais (temperatura, umidade e luminosidade).

O maior volume de fezes foi produzido pelas larvas alimentadas com o genótipo Dowling. A elevada quantidade de fezes pode significar que o alimento ingerido foi perdido. Por outro lado, o inseto pode eliminar substâncias que lhe causem toxicidade. O tratamento Dowling apresentou em sua composição química foliar além da genistina outras isoflavonas como: daidzina, malonil daidzina, malonil daidzina, malonil genistina, gliciteína e genisteína, que podem promover distúrbios nas larvas.

A presença de genistina e de outros compostos, podem ter provocado efeitos adversos sobre os herbívoros. Após a ativação dos compostos fenólicos por oxidação, a formam-se radicais livres de hidroxila que tornam os compostos fenólicos mais tóxicos aos insetos, rompendo a membrana do intestino médio interferindo diretamente na digestão e no metabolismo no epitélio intestinal do inseto (APPEL, 1993). Outro fato que pode ser atribuído é em relação aos resultados obtidos por Hoffmann-Campo, Harbone, McCaffery (2001), ao estudarem os efeitos de extratos do genótipo PI 227687 na fisiologia e comportamento de *T. ni*, notaram que as larvas alimentadas com tratamento sem adição de extrato (testemunha), produziram menor quantidade de fezes, demonstrando que a presença de qualquer composto fenólico pode influenciar na biologia das larvas.

3.6.2 Crescimento, Consumo, Ganho de Peso, Eficiência na Conversão do Alimento Ingerido e Digerido em Biomassa e Assimilação na Conversão do Alimento

Na presente pesquisa, não foi observado o efeito das covariáveis sobre a variável principal. Dessa forma os dados foram apresentados através do modelo de linhas paralelas para todas as covariáveis.

Os dados mais relacionados à fisiologia do inseto foram avaliados através da ANCOVA proposta por Raubenheimer e Simpson (1992), que são alternativas ao uso de índices nutricionais propostos por Waldbauer (1968). Através dessa análise é possível retirar ou corrigir o efeito das covariáveis sobre a variável principal, por exemplo, o efeito do peso inicial, o tempo de desenvolvimento no peso de pupa (ganho de peso) etc.

Assim sendo, observou-se que os insetos alimentados das cultivar BRS 257 proporcionaram um crescimento maior e mais rápido aos insetos. Possivelmente pela ausência de metabólitos secundários de ação direta na defesa do inseto. Nas análises cromatográficas

não foi observado a presença de rutina e genistina, que podem impactar negativamente no crescimento e outras variáveis indicativas de desenvolvimento dos insetos.

Hoffmann-Campo et al. (2006) notaram que as larvas alimentadas com doses crescentes de rutina foram influenciadas negativamente no desenvolvimento de *T. ni*, cujas pupas apresentaram os menores pesos influenciado pela inibição alimentar em decorrência do efeito tóxico de rutina nas lagartas desta espécie. Piubelli (2004) obteve resultado semelhante; com experimentos com *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, quando alimentadas com dieta artificial com diferentes concentrações de rutina, as lagartas da testemunha (sem rutina) tiveram o desenvolvimento mais rápido e consumiram mais dessa dieta. Entretanto, em larvas das duas populações (suscetível e resistente) que se alimentaram, com a dieta, no qual, adicionou rutina, o período de alimentação foi maior na tentativa de se alimentar pouco mais por longo tempo se adaptou ou sobrepujou o efeito tóxico do flavonoide.

A síntese dos flavonoides pode afetar diretamente, além de influenciar significativamente no desenvolvimento da taxa de crescimento das larvas de *A. gemmatalis* (PIUBELLI, 2004; SALVADOR, 2008; PANIZZI; PARRA, 2009).

O crescimento das larvas e o consumo mostraram uma relação positiva, entretanto, a relação não pode ser considerada proporcional, ou seja, as larvas que se alimentaram do genótipo testemunha (BRS 257) apresentaram menores tempos de alimentação, conseguira um rápido desenvolvimento e o maior crescimento. Por outro lado, as largartas tratadas com IAC 100 e PI 227687 mostraram os maiores consumos, porém, não reflete em maior crescimento.

Em larvas resistentes de *A. gemmatalis*, o alimento consumido além de ser direcionado para o desenvolvimento e crescimento, também é utilizado para a manutenção da característica de resistência, como a que essas lagartas apresentam em relação ao vírus AgMNPV.

Ainda a interferência dos parâmetros crescimento e consumo estão diretamente ligadas a qualidade do alimento oferecido as larvas, no qual, um alimento inadequado além de prolongar o consumo, pode provocar outros distúrbios fisiológicos (BELAND; HATCHETT, 1976; PANIZZI; PARRA, 2009). Os distúrbios podem ser atribuídos às características da planta, no qual o consumo e a utilização do alimento por parte dos insetos estão diretamente relacionadas, principalmente as características físicas e químicas, por sua vez, podem variar com a cultivar e com os fatores abióticos (PARRA, 1991; PUROHIT; KUMAR, 1996).

Entretanto, a qualidade nutricional de cada genótipo não foi aqui avaliada. Aryal, Guan e Xu (2007), verificaram a influência direta de um composto secundário, o alcaloide cafeína, sobre *Cretonotos transiens* (Walker), e as altas concentrações de cafeína reduziram a qualidade nutricional do alimento, interferindo nos parâmetros biológicos.

Em nossos resultados foi observado que a soja BRS 359 RR proporcionou menores taxas de crescimento e consumo à *A. gemmatalis*. Esse fato foi também observado também em *Spodoptera eridania* (Cramer), quando as larvas foram alimentadas com a cultivar Monsoy 8757 (que contém o gene para resistência ao glifosato) e os parâmetros crescimento e consumo, foram influenciados possivelmente pela presença de toxinas. Muitos compostos podem ser não proteicos (antibióticos, alcaloides, terpenos, glucosídeos, cianogênicos) ou proteicos (lectinas, arcelinas, vicilinas siteminas, quitinases, glucanases) com efeitos pré e pós-ingestivos (FRANCO et al., 2002; DE BORTOLI et al., 2012).

O ganho de peso foi analisado através da ANCOVA para estimar o efeito do peso inicial e no peso de pupa. Lagartas alimentadas com folhas da PI 229358 tiveram o maior peso inicial de larvas, mas isto não se refletiu em maior ganho de peso. Dessa maneira reforçando que a ingesta de alimentos e de compostos tóxicos interferem negativamente após um determinado período de tempo em certa concentração. Vale destacar que até o 3º instar a capacidade de consumo foliar é baixo (menos de 3% do total). Em geral, inicialmente as lagartas recém-eclodidas nos primeiros instares o inseto se alimenta do cório dos ovos e após consomem uma pequena quantidade de tecido foliar. Assim, eventuais substâncias que conferem antibiose às cultivares podem não ter sido ingeridas em quantidades não suficientes para expressar seu efeito (GAZZONI et al., 1981).

O crescimento do inseto também pode estar relacionado com a quantidade de alimento ingerido e/ou consumido (covariável) convertido em biomassa (peso de pupa). Em geral o peso de pupa aumentou com a ingestão e/ou consumo em todos os tratamentos. Algumas dessas particularidades podem ser observadas quando se analisa o gráfico de dispersão bicoordenado e de colunas. Segundo Raubenheimer e Simpson (1992) como alternativa para verificar a eficiência na conversão do alimento ingerido em biomassa, os gráficos de dispersão bicoordenados podem distinguir quando um alimento afetou o inseto quantitativamente ou qualitativamente, pois nem sempre o alimento em maior quantidade ingerido garantirá o maior peso de pupa, como observado com IAC100. Nesse tratamento, o consumo foliar foi maior, mas a lagarta foi menos eficiente na conversão do alimento ingerido em biomassa. Por outro lado, as lagartas do genótipo BRS 257, mesmo não apresentando um dos maiores valores de consumo foliar, foi o responsável pela maior eficiência na conversão

desse alimento ingerido em biomassa. Isso significa que com menor quantidade de alimento, o inseto conseguiu atingir o peso considerado ideal para completar o seu ciclo biológico em menor tempo. Meneguim et al. (2010) ao verificar o efeito de cultivares de amoreira em *Bombyx mori* (Linnaeus) observaram que o híbrido 'SK4' registrou a maior capacidade de utilizar eficientemente o alimento para o crescimento, mesmo esse híbrido 'SK4' ter obtido a menor taxa de consumo relativo em relação ao cultivar comercial 'Miura'.

Segundo Waldbauer (1964, 1968) a eficiência de conversão do alimento ingerido em biomassa varia de acordo com o valor nutricional do alimento, com a ingestão de nutrientes e com as quantidades proporcionais da porção digerível do alimento que em partes são convertidas em substâncias do corpo e metabolizadas para a produção de energia e manutenção de características fisiológicas do inseto. Assim, as possíveis causas na diferença nessa eficiência da utilização do alimento pelas larvas para os tratamentos BRS 257 e IAC 100 são atribuídas a estes fatores citados, os quais estão relacionados às características intrínsecas de cada tratamento.

Lagartas alimentadas com folhas de BRS 359 RR e IAC 100 apresentaram os menores pesos de pupa. Porém, em relação ao alimento digerido o tratamento IAC 100 apresentou os maiores valores médios. Esse fato significa que mesmo um determinado tratamento apresentando os maiores índices, não reflete em maior conversão desse alimento no peso final de pupa. Evangelista (1994) ao trabalhar com cinco cultivares de amoreira observou que a eficiência de conversão do alimento digerido em biomassa apresentou resultados semelhantes. O autor notou que mesmo o alimento com maiores valores de digestibilidade (Tailandesa) apresentou a menor conversão do alimento. Dessa forma esse tratamento não foi eficiente na conversão em biomassa, como observado em nossos experimentos. Assim a eficiência de conversão pode estar relacionada ao valor nutricional do alimento e com o nível de ingestão de nutriente, não dependendo da digestibilidade (WALDBAUER, 1968). Essa eficiência pode decrescer com o aumento da porção de alimento assimilado gasto para a produção de energia de manutenção (MENEGUIM, 2010).

No caso das larvas de *A. gemmatalis* resistente ao vírus AgMNPV a porção do alimento assimilado é gasto para manter os níveis de resistência das larvas que requerem um alto gasto metabólico. Segundo Scriber e Slansky Júnior (1981), o maior custo metabólico pode ser atribuído à presença de determinadas substâncias nos alimentos que afetam a fisiologia do inseto. Por outro lado o tratamento BRS 359 RR obteve os menores valores médios de alimento digerido, e esse baixo valor refletiu na conversão em biomassa obtendo dessa forma o menor peso de pupa, ou seja, este alimento oferece baixo valor nutricional às

larvas. Reese (1979) atribuiu esse fato a presença de substâncias que bloqueiam a utilização dos nutrientes ou as taxas desfavoráveis de aminoácidos.

O efeito da assimilação do alimento foi maior para os tratamentos IAC 100, PI 227687 e PI 229358 que apresentaram os menores pesos de fezes, indicando a maior eficiência quanto à assimilação dos tratamentos pelas larvas, ou seja, a menor quantidade do alimento consumido foi perdido nas fezes das larvas. Resultados semelhantes foram obtidos por Piubelli et al. (2005), que ao fornecerem dietas artificiais contendo extrato do genótipo IAC 100 resultaram na menor produção de fezes resultando em maior assimilação.

A maior assimilação desses alimentos está relacionada com o gasto para o armazenamento de energia e também para o metabolismo do inseto, pois os três tratamentos apresentam rutina e genistina na sua composição o que pode estar ligado ao fato da maior assimilação para armazenar energia para os próximos estágios como também para os mecanismos de defesa do inseto.

3.7 CONCLUSÕES

As larvas de *A. gemmatalis* após serem tratadas com o genótipo IAC 100 apresentaram menor peso inicial, menor peso de pupa refletindo dessa forma no ganho de peso, e mesmo apresentando um maior consumo foliar essas larvas foi menos eficientes na conversão desse alimento ingerido e digerido;

Além da interferência nesses parâmetros outro genótipo foi responsável por outros efeitos negativos como a PI 229358 que mostrou maior mortalidade entre os instares larvais e na mortalidade total, elevou o tempo de alimentação e influenciando no maior tempo de desenvolvimento, e na quantidade de alimento digerido;

A soja transgênica BRS 359 RR por sua vez interferiu no crescimento, no consumo e no ganho de peso, podendo ser atribuído a interferência de outros compostos nessas larvas e não apenas rutina e genistina;

Além de influenciar no peso de pupa o genótipo Dowling interferiu na assimilação de alimento, no qual a genistina em associação com outros compostos influenciam no desenvolvimento do inseto;

4 ARTIGO B:

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM GERAÇÕES LARVAIS, DOS EFEITOS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE SOJA NO INTESTINO MÉDIO DE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) RESISTENTES AO VÍRUS AgMNPV

4.1 RESUMO

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* tem como controle o uso do bioinseticida à base do nucleopoliedrovírus (AgMNPV) e plantas que apresentam compostos que promovem resistência a insetos. O intestino médio (IM) é a principal via de acesso e local de absorção dos alimentos e inseticidas. A camada epitelial é formada por diferentes tipos celulares, com variadas funções e apresentam-se quimicamente constituídas por moléculas e macromoléculas que são importantes para a manutenção e desenvolvimento do inseto. Recobrimo o epitélio e separando-o do meio externo, encontra-se a membrana peritrófica. O objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos de alguns flavonoides, como a rutina e a genistina, presentes na soja, tanto na morfologia quanto na composição química das células constituintes do IM de larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV em quatro gerações. As gerações foram obtidas através de bioensaios de pressão de seleção. As larvas foram tratadas com soja “in natura” BRS 257 (testemunha); BR 16 (suscetível a insetos), Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687 (resistente a insetos). O IM das larvas de 3^o/4^o instar foi coletado, fixado em Karnovsky, processado para análise morfológica e histoquímica (detecção de carboidratos neutros) e analisadas ao microscópio de luz. A análise morfológica mostrou a aparente ausência da membrana peritrófica nos tratamentos: PI 227687 (15^a e 40^a gerações); Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687 (180^a geração). No epitélio, as células colunares foram as mais alteradas em todas as gerações e apresentou intensa vacuolização citoplasmática, com liberação de protusões citoplasmáticas (com núcleo celular). As células caliciformes apresentaram a aparente turgidez da câmara nos tratamentos PI 229358 e PI 227687 das 15^a e 180^a gerações e Dowling da 180^a geração. As células regenerativas apresentaram intensa proliferação, com visível aumento numérico, inclusive com a presença de “ninhos de células” nos tratamentos PI 227687 da 25^a geração e IAC 100 180^a geração. As reações histoquímicas revelaram que houve alterações qualitativas na composição química das células epiteliais nas quatro gerações, com variação de localização e intensidade de reação, nos tratamento e gerações. Destaque para os tratamentos Dowling, IAC 100 e PI 227687, bastante expressivos em todas as gerações. Nossos resultados mostraram que os flavonoides rutina e genistina presentes nos cultivares resistentes Dowling e IAC 100 e nas plantas utilizadas nos programas de resistência de plantas a insetos PI 227687 e PI 229358 apresentam características consideradas ideais para a utilização na quebra da resistência das larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV.

Palavra-Chave: Genistina. Rutina. Morfologia. Microscopia. Carboidratos. Glicogênio.

**ANALYSIS HISTOPATOLOGICAL IN GENERATIONS LARVAL, THE EFFECTS
OF DIFFERENT GENOTYPES SOYBEAN IN MIDGUT OF *Anticarsia gemmatalis*
(HÜBNER, 1818) RESISTANT TO VIRUS AgMNPV**

4.2 ABSTRACT

The velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* is to control the use of biopesticide based nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) and plants that have compounds that promote resistance to insect. The midgut (IM) is the main access road and site of absorption of food and insecticides. The epithelial layer is formed by different cell types with different functions and present chemically composed of molecules and macromolecules that are important for the maintenance and development of the insect. Overlying epithelium and separating it from the external environment, is the peritrophic membrane. The objective of this study was to investigate the effects of some flavonoids, such as rutin and genistin present in soybeans, both in morphology and chemical composition of the constituent cells of larvae of *A. gemmatalis* IM resistant AgMNPV in four generations. Generations were obtained through the method of selection pressure. Larvae were treated with soy "in natura" BRS 257 (control); BR 16 (susceptible to insects), Dowling, PI 229358, PI 227687 and IAC 100 (resistant insect). The IM larvae 3rd / 4th instar was collected, fixed in Karnovsky, processed for morphological and immunohistochemical analysis (detection of carbohydrates neutral) and analyzed by light microscopy. Morphological analysis showed the apparent absence of a peritrophic membrane in treatments: PI 227687 (15th and 40th generations); Dowling, PI 229358 and PI 227687 IAC 100 (180th generation). In the epithelium, the columnar cells were the most changed in all generations and showed intense cytoplasmic vacuolization with release of cytoplasmic protrusions (with nucleus). Goblet cells showed apparent turgor camera in PI 229358 and PI 227687 of 15th and 180th generations Dowling and the 180th generation treatments. The regenerative cells showed intense proliferation with visible numerical increase, including the presence of "cell nests" in PI 227687 of the 25th generation and IAC 100, 180th generation treatments. The histochemical reactions revealed that there were qualitative changes in the chemical composition of epithelial cells in four generations, ranging from location and intensity of reaction, the treatment and generations. Highlight for Dowling, IAC 100 and PI 227687 treatments, very expressive in all generations. Our results showed that the flavonoids rutin and genistin present in resistant cultivars Dowling and IAC 100 and plants used in programs of plant resistance to insects PI 227687 and PI 229358 have characteristics considered ideal for use in breakdown the resistance of the larvae of *A. gemmatalis* resistant AgMNPV.

Keywords: Genistin. Rutin. Morphology. Microscopy. Carbohydrates. Glycogen.

4.3 INTRODUÇÃO

Os insetos pragas são responsáveis por reduzirem a produtividade em várias culturas como soja, milho, algodão e etc. As altas infestações de pragas na soja são controladas geralmente através da utilização de produtos fitossanitários, na grande maioria de origem sintética. O uso excessivo e de forma indiscriminada pode desencadear uma série de efeitos adversos como: resistência dos insetos a esses produtos, surtos de pragas secundárias, efeitos adversos em organismos benéficos, resíduos em alimentos, contaminação do ambiente e intoxicação dos agricultores.

Na sojicultura, a lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidæ), quando não controlada de forma eficaz pode causar 100% de desfolha (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; SOSA-GÓMEZ et al., 2006). Buscando controlar essa praga e reduzir a utilização dos fitossanitários, alguns métodos têm sido utilizados, como o uso de inseticidas biológicos e o de plantas resistentes (HOFFMANN-CAMPO; HARBONE; McCAFFERY, 2001).

O bioinseticida a base de vírus *AgMNPV* (*Anticarsia gemmatalis* múltiplo nucleopoliedrovírus), específico para a lagarta da soja vem sendo bastante utilizado para o seu controle (MOSCARDI; CARVALHO, 1993; ABOT et al., 1996).

A infecção pelo vírus inicia quando as larvas ingerem folhas que contém os poliedros virais. Os vírions são liberados no lúmen intestinal após ação do meio alcalino do intestino médio (KAWANSHI et al., 1972; GRANADOS; FEDERICI, 1986; FEDERICI, 1997).

Outro método alternativo de controle é a utilização de plantas com resistência a pragas, muito recomendada, pois apresenta alta compatibilidade e sinergismo com os demais métodos aplicados (KOGAN, 1986).

As plantas manifestam várias características que conferem a resistência sendo que a composição química é considerada bastante importante, e abrange uma série de substâncias que podem torna-las repelente, tóxicas ou inadequadas para os insetos provocando efeitos fisiológicos (EBEL, 1986; PIUBELLI, 2004).

Essas substâncias são denominadas de aleloquímicos ou metabólitos secundários e afetam a sobrevivência, o crescimento, comportamento, fecundidade e fertilidade do inseto (HOFFMANN-CAMPO; MAZZARIN; LUSTOSA, 1994; PIUBELLI et al., 2005).

Na soja esses compostos estão presentes na forma de flavonoides (KUBO; HANKE, 1986). De acordo com Hoffmann-Campo; Mazzarin e Lustosa (1994), os flavonoides são geralmente mais abundantes nos genótipos com característica de resistência as pragas, sendo que em folhas do genótipo PI 227687, uma das mais utilizadas em programas de resistência a insetos, foram identificados sete flavonoides (HOFFMANN-CAMPO, 1995).

A rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo) e a genistina (genisteína 7-O- β -D glicosídeo), reconhecidas por desempenhar função importante na defesa da planta à larvas de lepidópteros (HOFFMANN-CAMPO; HARBONE; McCAFFERY, 2001; PIUBELLI et al., 2005), foram identificados em extratos de folhas de PI 227687 e PI 274454 e em outros genótipos resistentes.

Efeitos antibióticos e/ou não consumível em larvas de lepidoptera como *A. gemmatalis*, *Manduca sexta* (Linnaeus), *Heliothis virescens* (Fabricius) e *Trichoplusia ni* (Hübner) foram descritos por Stamp e Skrobola, (1993); Hoffmann-Campo, (1995); Hoffmann-Campo; Harbone e McCaffery (2001); Piubelli et al., (2005).

Tanto os vírus como os flavonoides, devem ser ingeridos pelas larvas e após a ingestão, esses compostos atuarão no canal alimentar do inseto, no intestino médio (IM), considerado o principal local das reações de digestão e absorção dos alimentos e dos produtos fitossanitários químicos e biológicos (TERRA; FERREIRA, 1991; CHAPMAN, 1998).

Em larvas de *A. gemmatalis* o IM é formado pela membrana peritrófica; camada epitelial, composta por quatro tipos celulares (colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas) e camada muscular (músculos longitudinais e circulares) (LEVY et al., 2004; 2005; 2009). Essas estruturas do IM apresentam em sua composição química a presença de moléculas como polissacarídeos, carboidratos, proteínas e lipídeos entre outras responsáveis por desempenharem diversas funções estruturais e funcionais específicas.

Durante o ataque de patógenos ou substâncias químicas toda essa estrutura do IM pode apresentar alterações na sua morfologia, fisiologia, composição química e metabolismo, resultando em fragilidades que poderão permitir as larvas completar o seu ciclo de desenvolvimento ou leva-las a morte (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005; SALVADOR, 2008; CRUZ, 2010).

Estudos prévios já descreveram o sistema digestivo de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV alimentadas com dietas isentas ou com o vírus AgMNPV (LEVY, 2005) e também com genótipos de soja contendo rutina e genistina (SALVADOR, 2008; CRUZ, 2010). Entretanto, inexistem trabalhos morfológicos e histoquímicos sobre os efeitos e as alterações promovidas no IM de diferentes gerações de

larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV, em diferentes níveis de resistência (pressão de seleção). Assim o objetivo deste trabalho foi detectar as modificações na morfologia e composição química celular das estruturas do IM após o consumo de folhas contendo principalmente o flavonoide rutina e o isoflavonoide genistina, correlacionando os efeitos desses compostos na quebra da resistência ao vírus.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Obtenção dos Insetos Resistentes

A partir de uma única concentração estimada advindo de bioensaios anteriores de pressão de seleção e do cálculo da taxa de resistência, com o objetivo de obter 80% de mortalidade e 20% de sobreviventes (Concentração Letal – CL₈₀), foi quantificada e preparada uma solução do vírus LDB₈₀ com concentrações variadas conforme descrito na Tabela 4.1 (ABOT et al., 1996).

Tabela 4. 1 – Gerações de *Anticarsia gemmatalis* resistente ao AgMNPV, concentração do vírus e taxa de resistência.

Geração	Concentração cpis/mL de dieta	Taxa de Resistência (%)
15 ^a	7000	10,21
25 ^a	30000	73,63
40 ^a	180000	96,18
180 ^a	8000000	3,96

Fonte: Dados não publicados (informações experimentais)

Alíquotas de 30 mL desta solução foram inoculadas em 270 mL de dieta artificial (HOFFMANN-CAMPO; OLIVEIRA; MOSCARDI, 1985) previamente preparada e mantida em temperatura de 50°C.

Ao atingir o estado semi-sólido, a dieta inoculada era cortada em pequenos pedaços, acondicionados em copos plásticos, e em seguida eram adicionadas quatro larvas resistentes (gerações antecessoras) de *A. gemmatalis* de segundo ínstar, totalizando 1500 larvas inoculadas. As bandejas contendo esses copos eram levadas para estufas do tipo B.O.D., com temperatura de 26 ± 2°C, umidade relativa em torno de 70 ± 20% e fotofase 14h luz e 10h escuro e monitoramento diário. Ao atingir o terceiro dia pós-inoculação, as larvas

eram avaliadas e aquelas que apresentavam sintomas de infecção pelo vírus ou mortas eram contabilizadas para cálculo da porcentagem de mortalidade e posteriormente descartadas.

Ao atingir o estágio de pupa, as mesmas eram contabilizadas, alocadas em gaiolas de acrílico, para emergirem e se acasalarem. As gaiolas eram forradas com papel sulfite off-set linha d'água para oviposição. Diariamente esses papéis eram recolhidos, as posturas recortadas em pequenos pedaços, contendo aproximadamente 100 ovos e armazenadas para a realização da próxima pressão de seleção.

4.4.2 Plantio e Genótipos Utilizados

Foram utilizados os genótipos de soja: BRS 257 (testemunha) ausência de rutina e genistina; BR 16 (susceptibilidade a insetos) e Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687 (com características de resistência a pragas). A genealogia dos genótipos e as concentrações de flavonoides rutina e genistina estão descritos na Tabela 4.2.

Tabela 4. 2 – Genótipos de soja resistentes e as concentrações de rutina e genistina em ng/mg.

Tratamentos	Genealogia	Concentração (ng/mg)	
		Rutina	Genistina
1. BRS 257	BR93-32109 x BR94-23396	0,0	0,0
2. BR 16	D69-1310-M58 (D49-772 x D49-2491) x 'Davis'	0,0	6,57
3. Dowling	Semmes x PI 200492	0,0	9,85
4. PI 229358	Tóquio, Japão	7,87	66,94
5. IAC 100	'IAC 12' x IAC 78-2318	17,36	88,52
6. PI 227687	Okinawa, Japão	35,81	33,80

VALLE e LOURENÇÃO, (2002)

Foram semeadas cinco sementes em vasos com capacidade de cinco litros, contendo terra e irrigação por gotejamento, em uma quantidade de sete vasos por tratamento, totalizando 42 vasos ou unidades experimentais. Esses vasos, após semeadura foram dispostos em mesas e distribuídos de acordo com o delineamento experimental estatístico (inteiramente casualizado), em casa de vegetação do tipo telada com incidência de luz durante o dia da Embrapa Soja Londrina PR. Não foram realizados tratamentos culturais e fitossanitários (adubações

de cobertura e aplicações de produtos químicos e biológicos) para não ocorrer interferência no experimento.

4.4.3 Insetos e Coleta do Material

As posturas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV eram fixadas na tampa da caixa gerbox, totalizando quatro caixas gerbox por tratamento (genótipo). Essas caixas continham em sua base papel filtro, com uma folha “in natura” do respectivo tratamento. Para manutenção da umidade dessa folha e garantia folhas tenras, foi adicionada no pecíolo uma pequena porção de algodão umedecido.

Após eclosão os insetos eram alimentados com folhas de soja “in natura” no estágio V5 dos respectivos genótipos (FEHR; CAVINESS, 1977). Foram coletados o quinto trifólio de cada tratamento, levadas ao laboratório e lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 5%, enxaguadas em água destilada, secas em papel filtro e armazenadas em caixa do tipo gerbox com os ovos de *A. gemmatalis*.

As larvas foram monitoradas diariamente até atingirem o segundo instar, quando então foram replicadas em quatro gerbox contendo cerca de 15 larvas/gerbox, para facilitar a manutenção e evitar a competitividade por alimento. As folhas eram então trocadas a cada 12 horas para não ocorrer a falta de alimento.

Ao atingirem o quarto instar (10-12 dias de desenvolvimento pós-eclosão), as larvas foram anestesiadas por resfriamento (cinco minutos) e dissecadas sob microscópio estereoscópio, com solução salina para insetos (1,80g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16g de CaCl₂; 0,004g de NaHCO₃ e H₂O – q.s.p. 100 mL). Os tubos eram coletados em número de 15 por tratamento, fixados em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2) por seis horas e processados de acordo com protocolo de Cerri e Cerri-Sasso (2003). A inclusão foi realizada em resina glicolmetacrilato (GMA – Kit de embebição Historesin[®] da Leica) conforme orientações do fabricante. O material embocado foi cortado com 4µm de espessura com navalha de tungstênio, em micrótomo rotativo automático modelo LEICA RM 2265, e colocados em lâminas de vidro previamente limpas em solução de álcool etílico + éter (1:1).

4.4.4 Análise Morfológica

As lâminas contendo os cortes foram hidratados (cinco minutos) em H₂O destilada, corados com Hematoxilina de Harris (40 minutos); lavados em água corrente (10 minutos), corados com Eosina Aquosa (30 minutos), lavados em H₂O destilada (cinco minutos); desidratados em álcool etílico 95% e 100%; diafanizados em sequência de três banhos em xilol (10 minutos cada); montados em bálsamo do Canadá e após secagem foram analisados e documentados em fotomicroscópio de luz (Axiophot da Zeiss) do Departamento de Histologia da UEL.

4.4.5 Análise Histoquímica Para Polissacarídeos Neutros

Utilizou-se o método do ácido periódico-Schiff (PAS) para detecção de polissacarídeos neutros (grupamentos 1,2-glicol); PAS + acetilação (bloqueio pela acetilação) e associação PAS + amilase salivar (detecção do glicogênio) descritos em Pearse (1985).

O material foi submetido ao tratamento com solução de ácido periódico 0,1% a 56°C em estufa (15 minutos), corado com Reativo de Schiff (60 minutos), lavado em H₂O corrente, contra-corado com Hematoxilina de Harris (30 minutos), lavados, desidratados em séries crescentes de álcool etílico (70 a 100%), diafanizados em xilol, montados em bálsamo do Canadá e analisados. Para controle foi efetuado o bloqueio pela acetilação.

Para a detecção de glicogênio pela alfa amilase, os cortes foram submetidos ao tratamento com solução de amilase salivar 0,5% (\pm 37°C em estufa) por duas horas, lavados em H₂O corrente e destilada e submetido à técnica do PAS e analisadas.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Resultados Morfológicos

As alterações observadas na membrana peritrófica e no epitélio (células colunares, caliciformes e regenerativas) do IM das larvas de *A. gemmatalis* para as quatro gerações resistentes ao AgMNPV e alimentadas com os diferentes genótipos de soja, estão descritas nas Tabelas 4.3 e 4.4.

Tabela 4.3 – Avaliação das alterações causadas pelos flavonoides rutina e genistina na membrana peritrófica e nas células colunares (Co) de quatro gerações larvais de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao nucleopoleovírus AgMNPV.

Geração	Tratamentos	Regiões/ Estruturas			
		Membrana Peritrófica	Protusões	Porção Apical	Porção Basolateral
15 ^a	BRS 257	-	-	-	-
	BR 16	-	+	+	-
	Dowling	-	++	+++	-
	PI 229358	-	-	+	-
	IAC 100	-	+	-	-
	PI 227687	+++	+++	+++	-
25 ^a	BRS 257	-	-	-	-
	BR 16	-	-	-	-
	Dowling	-	-	-	+
	PI 229358	-	-	-	+
	IAC 100	-	-	-	+
	PI 227687	-	-	+++	+
40 ^a	BRS 257	-	-	-	-
	BR 16	-	-	-	-
	Dowling	-	-	-	+++
	PI 229358	-	-	+++	+++
	IAC 100	-	-	+++	+++
	PI 227687	+++	+++	+++	-
180 ^a	BRS 257	-	-	-	-
	BR 16	++	+++	+	+++
	Dowling	+++	+++	+++	+++
	PI 229358	+++	+++	+++	+++
	IAC 100	+++	+++	+++	+++
	PI 227687	+++	+++	+++	+++

Legenda: (-) sem alteração; (+) leve alteração; (++) moderada alteração; (+++) forte alteração.

Tabela 4.4 – Avaliação das alterações causadas pelos flavonoides rutina e genistina nas células caliciformes (Ca) regenerativas (Cr) de quatro gerações larvais de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao nucleopoliedrovírus AgMNPV.

Tipo Celular	Tratamentos	Gerações			
		15 ^a	25 ^a	40 ^a	180 ^a
Caliciformes	BRS 257	-	-	-	-
	BR 16	-	-	-	-
	Dowling	+++	-	-	+++
	PI 229358	+++	-	-	+++
	IAC 100	+++	-	-	+++
	PI 227687	+++	-	-	+++
Regenerativas	BRS 257	-	-	-	-
	BR 16	-	+	-	+
	Dowling	-	+	-	+++
	PI 229358	-	-	-	+++
	IAC 100	-	+	+++	+++
	PI 227687	-	+++	-	+++

Legenda: (-) sem alteração; (+) leve alteração; (++) moderada alteração; (+++) forte alteração.

De modo geral o IM das larvas testemunha era constituído da luz para a periferia, pela membrana peritrófica que delimitava os espaços endoperitrófico e ectoperitrófico, pela camada epitelial composta pelas células colunares, caliciformes e regenerativas e camada muscular (composta de músculos longitudinais e circulares) (Figs.: 4.1 A; 4.2 A; 4.3 A e 4.4 A).

As alterações ocorridas no intestino foram avaliadas nas seguintes estruturas: membrana peritrófica (MP) e camada epitelial (protusões, células colunares, caliciformes e regenerativas)

A membrana peritrófica estava aparentemente ausente nos tratamentos PI 227687 das 15^a e 40^a gerações (Figs.: 4.1 F e 4.3 F) e em todos os tratamentos (com exceção da testemunha) na 180^a geração (Figs.: 4.4 B; C; D; E e F).

Nas protusões citoplasmáticas as alterações foram variadas, desde o aparente aumento na sua quantidade, quando comparado à testemunha (BRS 257), até variação entre as gerações. Esse aparente aumento foi notado no tratamento PI 227687 na 15^a geração (Fig.: 4.1 F), em todos os tratamentos da 180^a geração (Figs.: 4.4 B; C; D; E e F). Observou-se a presença de protusões com núcleos celulares sendo descartadas para o lúmen intestinal no tratamento Dowling da 15^a e 180^a gerações (Figs.: 4.1 C e 4.4 C). Além do núcleo foram notadas protusões com porções de bordadura estriada nos tratamentos IAC 100

e PI 227687 da 40^a geração (Figs.: 4.3 E e F); BR 16, PI 229358 e PI 227687 na 180^a geração (Figs.:4.3 B, D e F).

As maiores alterações foram mais evidentes nas células colunares (Co), variando de porção citoplasmática (apical e basolateral), intensidade, tratamento e geração.

A bordadura estriada estava ausente nos tratamentos Dowling e PI 227687 da 15^a geração (Figs.: 4.1 C e F); intensamente desorganizada nos tratamentos PI 229358, IAC 100 e PI 227687 da 180^a geração (Figs.: 4.4 D, E e F) e com espessamento nos tratamentos PI 227687 da 25^a geração (Fig.: 4.2 F) e PI 229358, IAC 100 e PI 227687 da 40^a geração (Figs.: 4.3 D; E e F).

Além das alterações na porção apical das Co pode ser observada intensa vacuolização citoplasmática nos tratamentos BR 16, Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687 na 180^a geração (Figs.: 4.4 B; C; D; E e F).

As porções basolaterais das células colunares de alguns tratamentos Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687 da 25^a geração (Figs.: 4.2 C; D; E e F) e Dowling, PI 229358 e IAC 100 na 40^a geração, apresentaram núcleo com aspecto granuloso e cromatina descondensada (Figs.:4.3 C; D e E).As células caliciformes (Ca) apresentaram alterações que variavam desde menor quantidade aparente no tratamento Dowling da 15^a geração (Fig.: 4.1 C) (necessário contagem) e alteração no citoplasma (turgência) nos tratamentos PI 229358, IAC 100 e PI 227687 nas 15^a e 180^a gerações (Figs.: 4.1 e 4.4 D; E e F) e no tratamento Dowling da 180^a geração (Fig.: 4.4 C). As células regenerativas (Cr) foram observadas com alterações nos diferentes tratamentos, entre as gerações, com aparente aumento numérico na base do epitélio. As células eram visualizadas individualmente ou em pares nos tratamentos BR 16, Dowling, IAC 100 e PI 227687 das 25^a e 180^a gerações (Figs.: 4.2 e 4.4 B; C; E e F); IAC 100 da 40^a geração (Fig.: 4.3 E) e PI 229358 da 180^a geração (Fig.:4.4 D). Os “ninhos” de células regenerativas foram observados nos tratamentos PI 227687 na 25^a geração (Fig. 4.2 F) e IAC 100 (180^a geração).

4.5.2 Resultados Histoquímicos

As quatro gerações de larvas de *A.gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tiveram os seus IM avaliados por técnicas histoquímicas específicas. Os resultados obtidos possuem carácter qualitativo, ou seja, são sinalizados com o sinal positivo (+) e negativo (-), indicando a presença e a ausência dos compostos procurados, respectivamente. A presença dos compostos foi representada por uma escala de nota na qual foram atribuídas o grau de

intensidade de reação em comparação com o tratamento controle ou testemunha (BRS 257): reação fraca (+), reação moderada (++) , reação forte (+++) e reação muito forte (++++).

4.5.2.1 Polissacarídeos neutros

Os resultados da detecção histoquímica para carboidratos neutros evidenciados pelo método do Ácido Periódico-Schiff (PAS) na MP e epitélio do IM das larvas resistentes de *A. gemmatalis* pertencentes às quatro gerações avaliadas estão descritos nas tabelas 4.5 e 4.6.

Tabela 4.5 – Avaliação da reação do PAS para detecção de polissacarídeos neutros na membrana peritrófica (MP) e células colunares (Co) de quatro gerações larvais de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao nucleopoleovírus AgMNPV.

Geração	Tratamentos	Regiões/ Estruturas			
		Membrana Peritrófica	Protusões	Porção Apical	Porção Basolateral
15 ^a	BRS 257	-	-	+++	-
	BR 16	-	-	-	+++
	Dowling	-	+++	+++	+
	PI 229358	-	+++	-	-
	IAC 100	-	-	-	-
	PI 227687	-	-	-	-
25 ^a	BRS 257	-	+	++	-
	BR 16	-	-	-	-
	Dowling	-	-	-	-
	PI 229358	-	-	+	-
	IAC 100	-	-	-	-
	PI 227687	-	-	-	-
40 ^a	BRS 257	-	+++	++++	++++
	BR 16	-	++	++	++
	Dowling	-	+	++	++
	PI 229358	-	-	+++	+
	IAC 100	-	-	+++	++
	PI 227687	-	-	++	++
180 ^a	BRS 257	-	-	+++	+++
	BR 16	-	-	+	+
	Dowling	-	-	+	-
	PI 229358	-	-	-	-
	IAC 100	-	-	++	++
	PI 227687	-	+++	+++	+++

Legenda: (-) reação negativa; (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (++++) reação muito forte.

Tabela 4.6 – Avaliação da reação do PAS para detecção de polissacarídeos neutros nas células caliciformes (Ca) e regenerativas (Cr) de quatro gerações larvais de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao nucleopoliedrovírus AgMNPV.

Tipo Celular	Tratamentos	Gerações			
		15 ^a	25 ^a	40 ^a	180 ^a
Caliciformes	BRS 257	-	-	-	+++
	BR 16	-	-	-	-
	Dowling	-	-	-	-
	PI 229358	-	-	-	-
	IAC 100	-	-	-	-
	PI 227687	-	-	-	-
Regenerativas	BRS 257	-	-	-	-
	BR 16	-	-	-	-
	Dowling	-	-	-	-
	PI 229358	-	-	-	-
	IAC 100	-	-	-	-
	PI 227687	-	-	-	-

Legenda: (-) reação negativa; (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (+++++) reação muito forte.

Após a reação para detecção de polissacarídeos neutros notou-se a presença de grânulos PAS positivos principalmente nas Co com variação de intensidade e reação nos diferentes tratamentos e gerações (Tabela 4.6).

Nas protusões citoplasmáticas essas reações foram mais intensas nos tratamentos Dowling e PI 229358 da 15^a geração (Figs.: 4.5 C e D) e BRS 257 da 40^a geração (Fig.: 4.6 A),

As Co apresentaram grânulos PAS positivos com maior intensidade na porção apical nos tratamentos BRS 257 da 15^a, 40^a e 180^a gerações (Figs.: 4.5 A; 4.6 A e 4.7 A); Dowling da 15^a geração (Fig.: 4.5 C); PI 227687 da 180^a geração (Figs.: 4.7 F); PI 229358 e IAC 100 da 40^a geração (Figs.: 4.6 D e E).

Na porção basolateral esses resultados foram mais intensos nos tratamentos: BRS 257 da 40^a e 180^a gerações (Figs.: 4.6 A e 4.7 A); BR 16 da 15^a geração (Fig.: 4.5 B) e PI 227687 da 180^a geração (Fig. 4.7 F).

As células caliciformes apresentaram grânulos PAS⁺ no tratamento BRS 257 da 180^a geração (Fig. 4.6 7). A MP e as Cr não apresentaram positividade ao método.

4.5.2.2 Glicogênio

Os resultados da detecção glicogênio pela digestão pela alfa amilase nas Co e Ca do IM das larvas resistentes de *A. gemmatalis* pertencentes às quatro gerações avaliadas estão descritos nas tabelas 4.7 e 4.8.

Tabela 4.7 – Avaliação da amilase para detecção de glicogênio nas células colunares de quatro gerações larvais de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao nucleopoleovírus AgMNPV.

Gerações	Tratamentos	Regiões/Estruturas		
		Protusões	Porção Apical	Porção Basolateral
15 ^a	BRS 257	-	+++	-
	BR 16	-	-	++
	Dowling	+++	++	-
	PI 229358	-	-	-
	IAC 100	-	-	-
	PI 227687	-	-	-
25 ^a	BRS 257	-	-	-
	BR 16	-	-	++
	Dowling	-	-	-
	PI 229358	-	-	-
	IAC 100	-	-	-
	PI 227687	-	-	-
40 ^a	BRS 257	++	+++	++
	BR 16	-	++	+
	Dowling	-	++	++
	PI 229358	-	-	-
	IAC 100	-	+++	++
	PI 227687	-	-	-
180 ^a	BRS 257	-	+	+
	BR 16	-	-	-
	Dowling	-	-	-
	PI 229358	-	-	-
	IAC 100	-	++	++
	PI 227687	+++	+++	+++

Legenda: (-) reação negativa; (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (++++) reação muito forte

Tabela 4.8 – Avaliação da amilase para detecção de glicogênio nas células caliciformes de quatro gerações larvais de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao nucleopoliedrovírus AgMNPV.

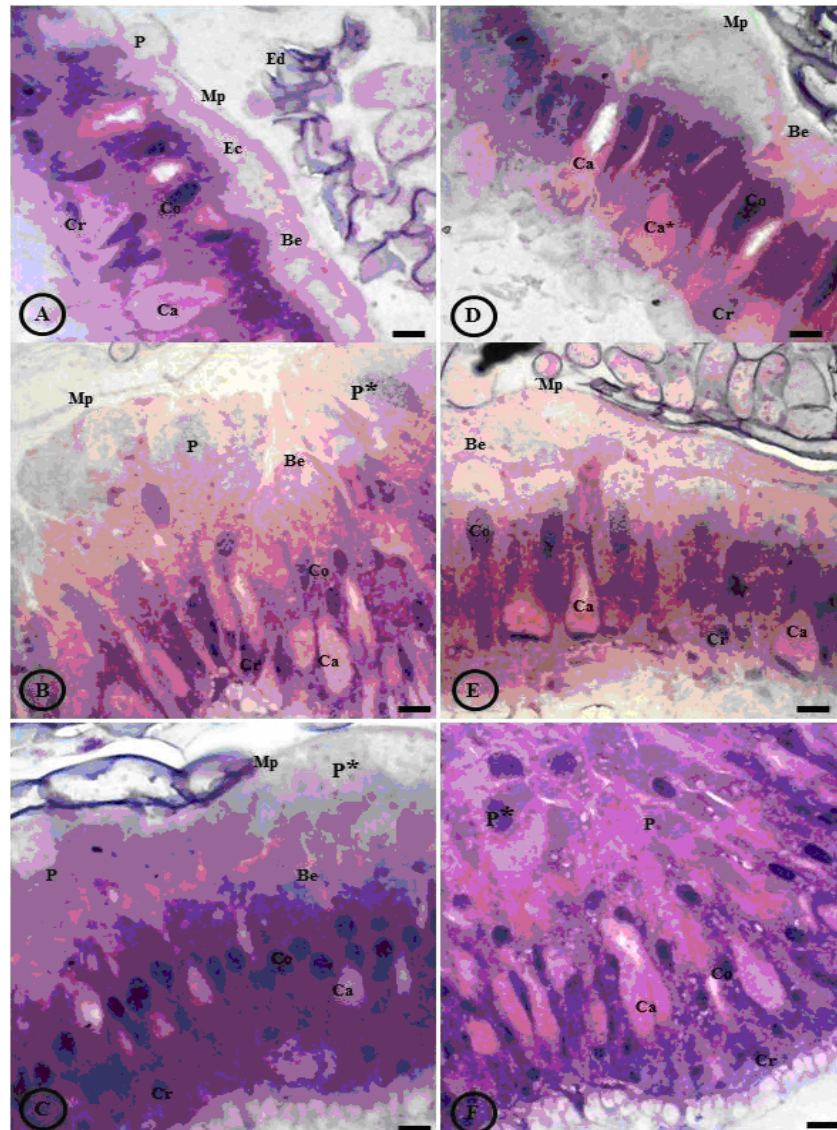
Tipo Celular	Tratamentos	Gerações			
		15 ^a	25 ^a	40 ^a	180 ^a
Caliciformes	BRS 257	-	-	-	++
	BR 16	-	-	-	-
	Dowling	-	-	-	-
	PI 229358	-	-	-	-
	IAC 100	-	-	-	-
	PI 227687	-	-	-	-

Legenda: (-) reação negativa; (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (++++) reação muito forte

Após a amilase notou-se a redução dos grânulos PAS positivos, em todos os tratamentos variando em intensidade e geração. As protusões tiveram reação mais intensa nos tratamentos Dowling da 15^a geração (Fig. 4.8 C) e PI 227687 da 180^a geração. A porção apical das células colunares obteve reação positiva nos tratamentos BRS 257 da 15^a e 40^a gerações (Figs.: 4.8 A e D); IAC 100 da 40^a geração (Fig.: 4.8 G) e PI 227687 da 180^a geração. Na porção basolateral essa reação foi positiva no tratamento PI 227687 da 180^a geração. Para as Ca observou-se que para o tratamento testemunha BRS 257 da 180^a geração, houve uma discreta redução de positividade.

4.6 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

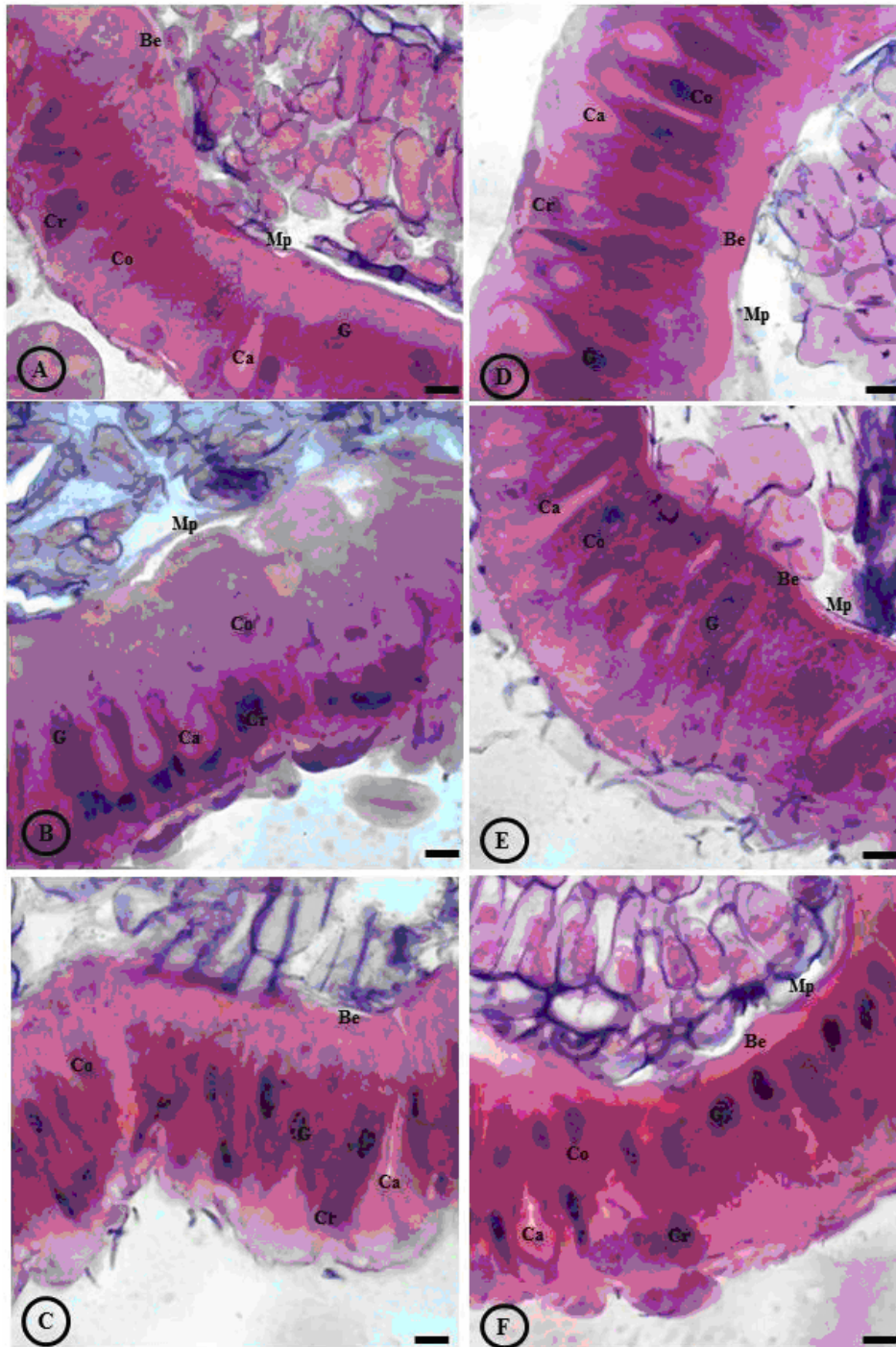
Figura 4.1 – Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 15ª geração de larvas de *Anticarsia gemmatilis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina e Eosina (H-E). Barra = 10µm.



Morfologia Geral do IM: Tratamentos BRS 257 (A); BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); IAC 100 (E) e PI 227687 (F) – IM: Espaço Endoperitrófico (Ed); Membrana Peritrófica (Mp); Espaço Ectoperitrófico (Ec); Protusões Citoplasmáticas (P); Bordadura estriada (Be); Células Colunares (Co); Células Caliciformes (Ca); Células Regenerativas (Cr). Barras = 10µm.

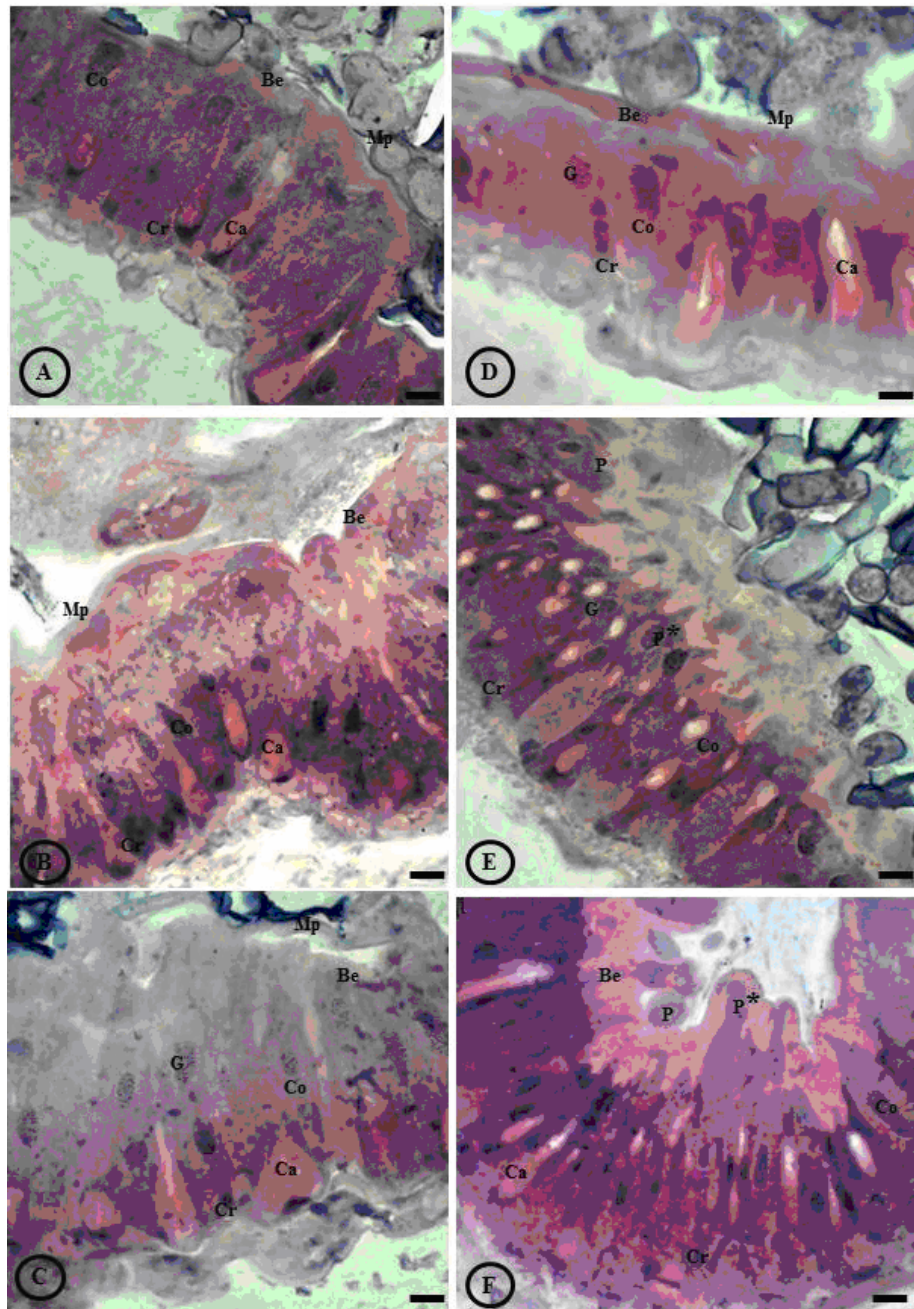
Observar nas figuras B, C e F, protusões citoplasmáticas em descarte às vezes com núcleo celular (P*); e na figura D, células caliciformes com câmara aparentemente turgida (Ca*).

Figura 4.2 – Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 25ª geração de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina Harris e Eosina. Barra = 10µm.



Morfologia Geral do IM: Tratamentos BRS 257 (A); BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); IAC 100 (E) e PI 227687 (F) – IM: Membrana Peritrófica (Mp); Protusões Citoplasmáticas (P); Bordadura estriada (Be); Células Colunares (Co); Células Caliciformes (Ca); Células Regenerativas (Cr); células colunares com cromatina descondensada com grumos (G) e ‘‘ninhos de células regenerativas’’ (NCr).

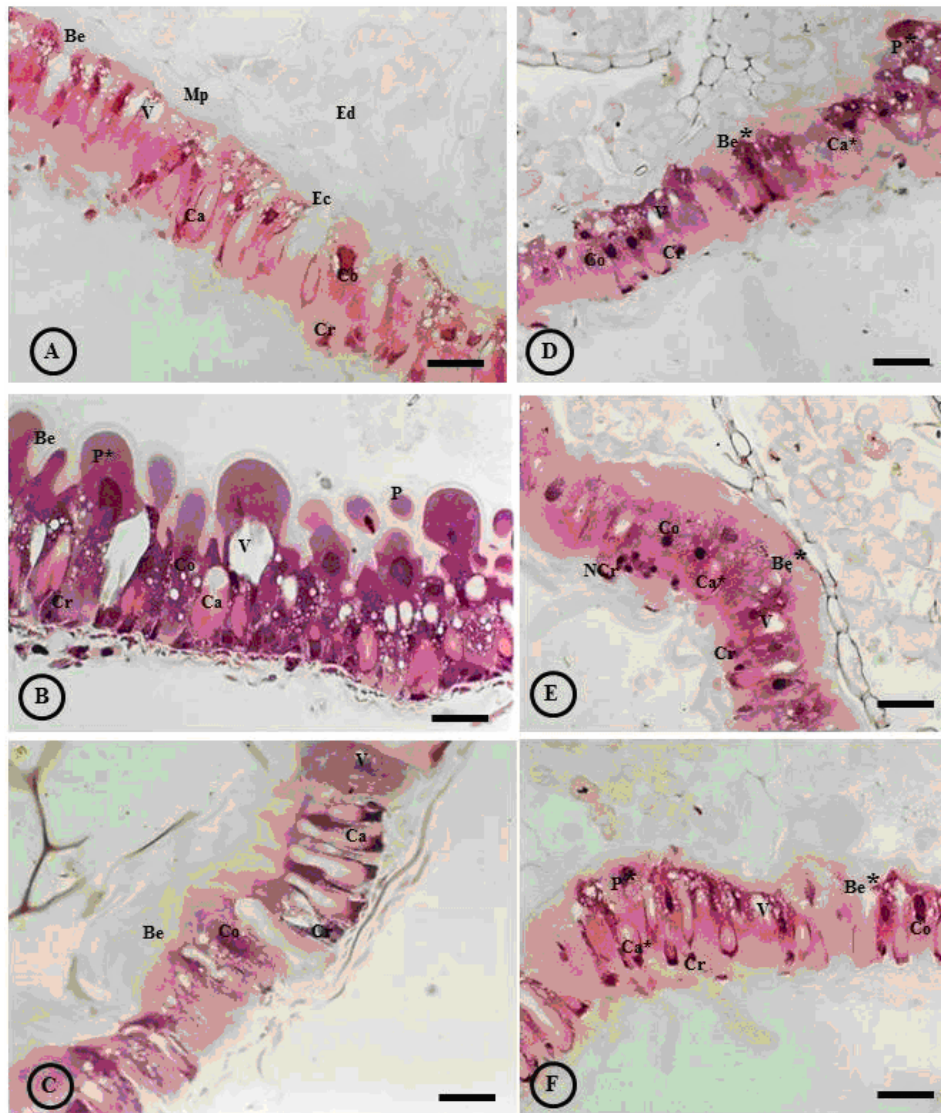
Figura 4.3 – Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 40ª geração de larvas de *Anticarsia gemmatilis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina e Eosina (H-E). Barra = 10µm.



Morfologia Geral do IM: Tratamentos BRS 257 (A); BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); IAC 100 (E) e PI 227687 (F) – IM: Membrana Peritrófica (Mp); Protusões Citoplasmáticas (P); Bordadura estriada (Be); Células Colunares (Co); Células Caliciformes (Ca); Células Regenerativas (Cr).

Observar células colunares com núcleo de cromatina em grumos (G) (Figs. C, D, E); bordadura estriada espessa (Be^+) (Figs. D, E, F); protusões citoplasmáticas com núcleo e porções de bordadura estriada (P^*) (figs. E, F).

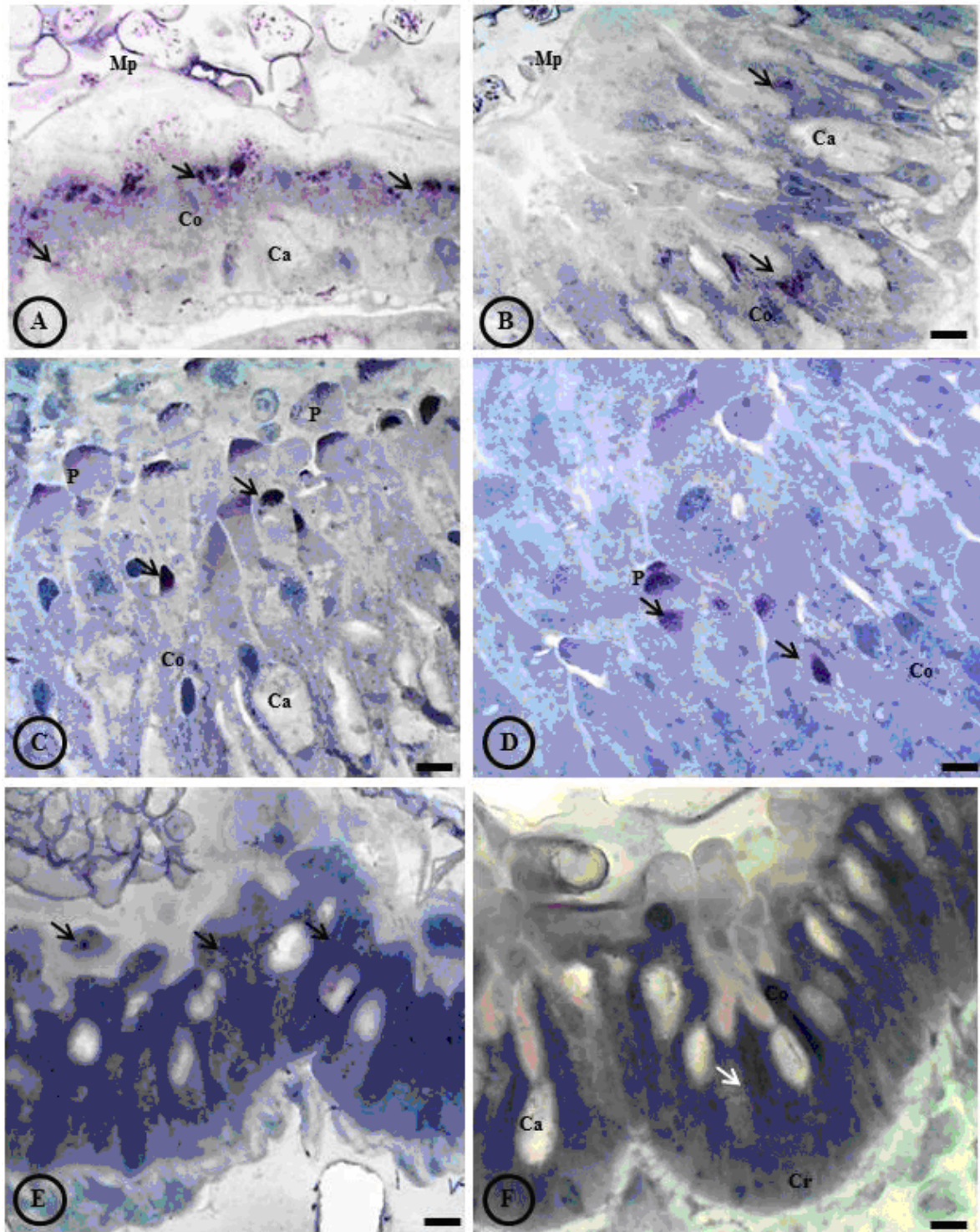
Figura 4.4 – Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 180ª geração de larvas de *Anticarsia gemmatilis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina e Eosina (H-E). Barras = 20µm.



Morfologia Geral do IM: Tratamentos BRS 257 (A); BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); IAC 100 (E) e PI 227687 (F) – IM: Espaço Endoperitrófico (Ed); Membrana Peritrófica (Mp); Espaço Ectoperitrófico (Ec); Protusões Citoplasmáticas (P); Bordadura estriada (Be); Células Colunares (Co); Células Caliciformes (Ca); Células Regenerativas (Cr).

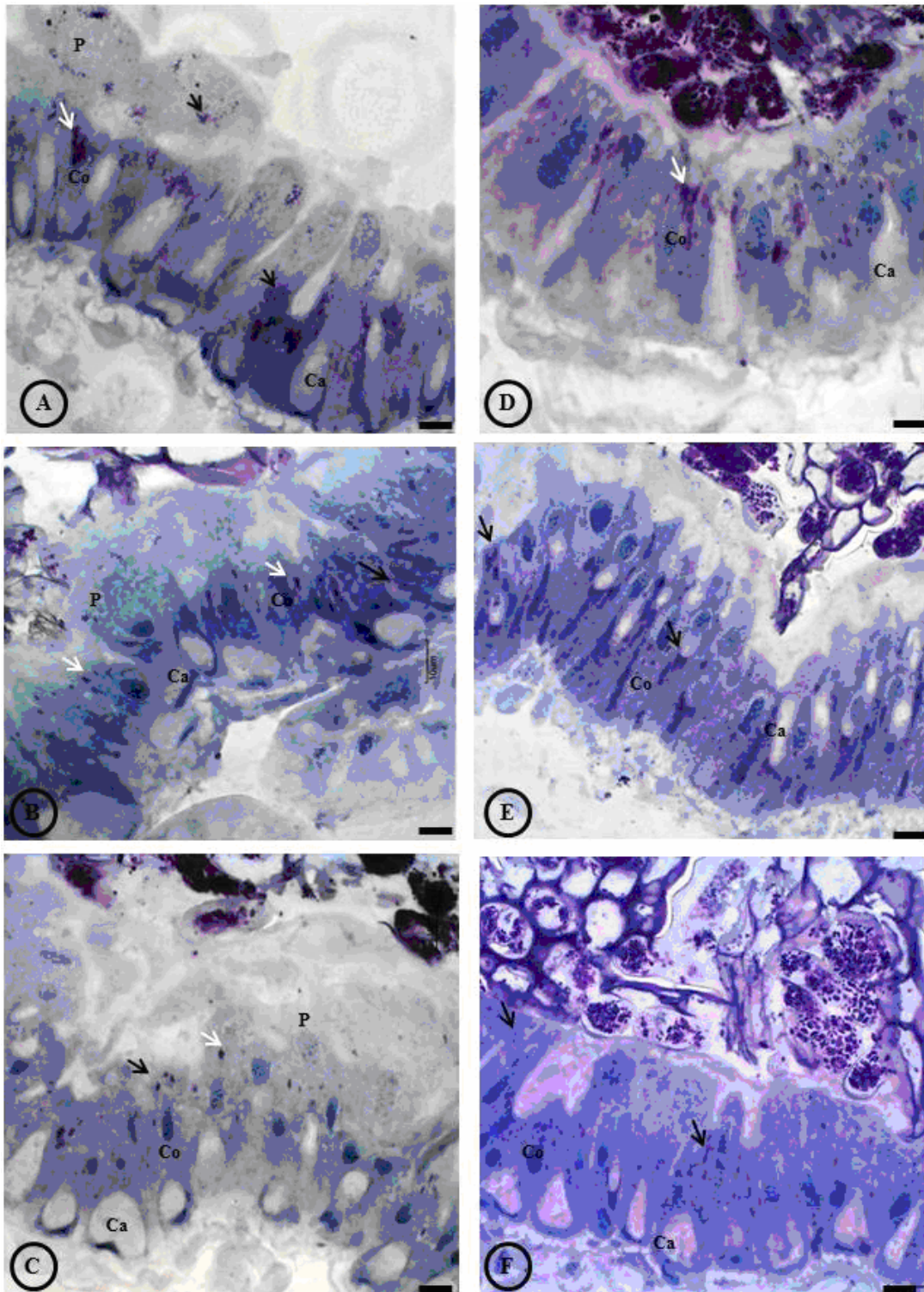
Observar presença de vacúolos citoplasmáticos nas células colunares (V) (Figs. A, B, C, D, E, F); bordadura estriada desorganizada (Be*); protusões citoplasmáticas descartadas com núcleo celular e porções de bordadura estriada (P*) (Figs. B, D, E); células caliciformes com câmara aparentemente túrgida (Ca*) (Figs. C, D, E, F) e presença de “ninhos de células regenerativas” (NCr) (Fig. E).

Figura 4.5 – Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 15^a (A, B, C, D) e 25^a (E, F) gerações de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Histoquímica para detecção de polissacarídeos neutros (PAS). Tratamentos BRS 257 (A); BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); BRS 257 (E) e PI 229358 (F) Barras = 10µm.



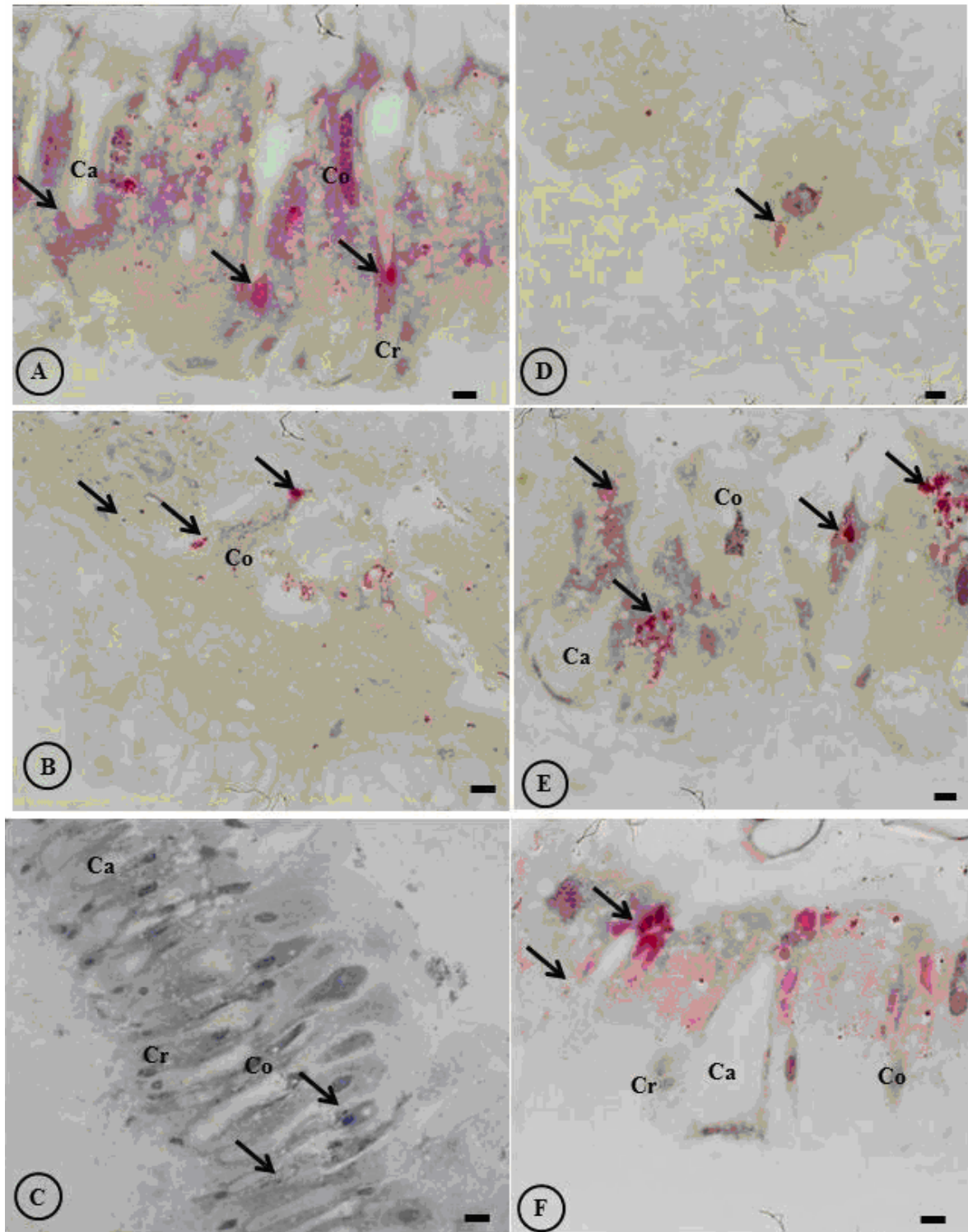
Membrana Peritrófica (Mp); Protusões Citoplasmáticas (P); Células Colunares (Co); Células Caliciformes (Ca); Células Regenerativas (Cr), grânulos PAS⁺ (→).

Figura 4.6 – Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 40ª geração de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A); BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica para detecção de polissacarídeos neutros (PAS). Barra = 10µm.



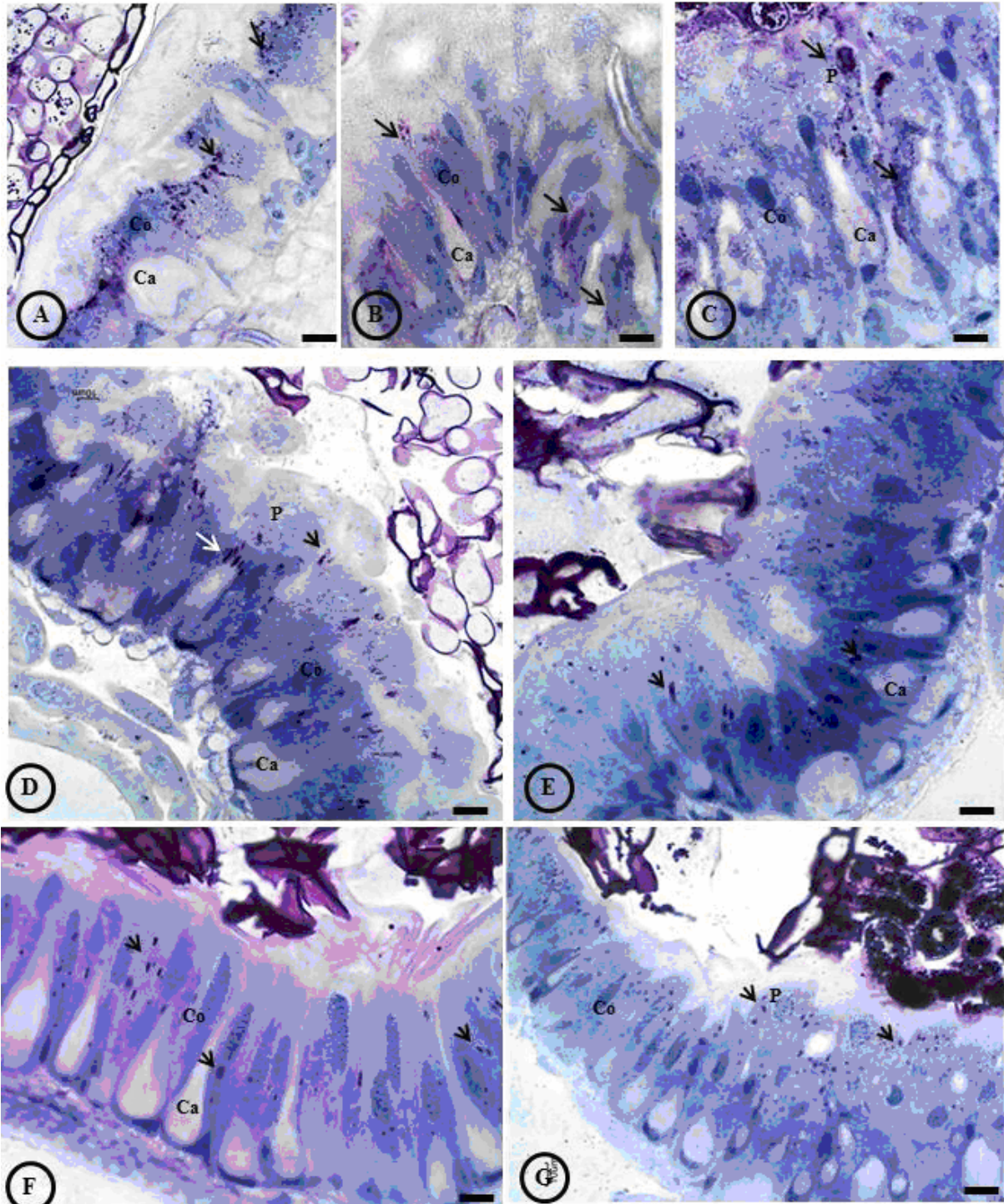
Membrana Peritrófica (Mp); Protusões Citoplasmáticas (P); Células Colunares (Co); Células Caliciformes (Ca); Células Regenerativas (Cr), grânulos PAS⁺ (→).

Figura 4.7 – Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 180ª geração de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A); BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica para detecção de polissacarídeos neutros (PAS). Barra = 10µm.



Membrana Peritrófica (Mp); Protusões Citoplasmáticas (P); Células Colunares (Co); Células Caliciformes (Ca); Células Regenerativas (Cr), grânulos PAS⁺ (→).

Figura 4.8 – Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 15^a (A, B, C) e 40^a (D, E, F, G) gerações de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Histoquímica para detecção de glicogênio após digestão pela α -amilase. Barra = 10 μ m.



Tratamentos BRS 257 (A); BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); BRS 257 (E), PI 229358 (F) e (G) IAC 100 Barras = 10 μ m. Protusões Citoplasmáticas (P); Células Colunares (Co); Células Caliciformes (Ca); grânulos PAS⁺ (→).

4.7 DISCUSSÃO

O intestino médio das larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistente ao AgMNPV pertencentes às quatro gerações tratadas com o genótipo BRS 257 (testemunha) mostrou-se constituído por um epitélio pseudoestratificado prismático com bordadura estriada, com três tipos celulares: as células colunares, caliciformes e regenerativas. Revestindo o epitélio encontra-se a membrana peritrófica que separa o intestino médio (IM) em dois espaços o ectoperitrófico e endoperitrófico. O epitélio repousa sobre a camada muscular composta pelos músculos longitudinal e circular. Essa arquitetura é semelhante à descrita por alguns autores em outras espécies de lepidópteros como em *Manduca sexta* (Linnaeus) e *Heliothis virescens* (Fabricius) por Hakim; Baldwin e Loeb (2001), *Alabama argillacea* (Hübner) por Sousa et al. (2009); em alguns dípteros *Culex quinquefasciatus* (Linnaeus) por Okuda et al. (2007) e *Dermatobia hominis* (Linnaeus) Evangelista e Leite (2003); hemiptera-heteroptera *Brontocoris tabidus* (Signoret) por Fialho et al. (2009); em orthoptera *Tropidacris collaris* (Stoll) por Wanderley-Teixeira et al. (2006), hymenoptera *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepeletier) por Martins et al. (2006) entre outros.

Nossos resultados mostraram em todas as gerações que os tratamentos (genótipos) BR 16, Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687, que apresentavam em sua constituição os flavonoides rutina e/ou genistina, provocou modificações em nível de intensidade e estrutura diferentes.

Embora pontuais, as alterações eram distintas e bem visíveis, como ausência de membrana peritrófica; presença de vacúolos citoplasmáticos nas células colunares; aumento de protusões citoplasmáticas algumas vezes contendo porções da bordadura estriada e/ou núcleo em seu interior, sendo descartadas para o espaço ectoperitrófico.

Sabe-se que a ingestão de alimento contendo compostos químicos (flavonoides), patógenos (vírus, fungos e bactérias), produtos fitossanitários químicos e biológicos, podem promover alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas no intestino médio, resultando em fragilidades as quais poderão levar a morte do inseto (FUGI, LOURENÇÃO; PARRA, 2005; SALVADOR, 2008; CRUZ, 2010; COSTA et al., 2012).

A aparente ausência da membrana peritrófica foi um indicativo de forte alteração, pois essa estrutura é responsável pela defesa da camada epitelial, que atua como barreira permeável às enzimas digestivas na proteção contra agentes patogênicos e abrasivos (TERRA, 2001; WANG; GRANADOS, 2001).

Essa ausência pode ser associada a desorganização que as células colunares sofreram em seu citoplasma, o que pode prejudicar a formação e a liberação dos produtos a serem secretados, e conseqüentemente interferir na qualidade do produto a ser utilizado na síntese e formação da própria membrana (HARPER; HOPKINS, 1997; HARPER; GRANADOS, 1999).

Nas gerações em que as células colunares não apresentaram intensas alterações, podemos notar a presença de uma membrana peritrófica íntegra e conservada, hábil para evitar a ação dos vírions que necessitam atravessar os poros para se fundir as microvilosidades das células colunares, ou mesmo, a ação dos compostos presentes nas folhas, a exemplo do observado em larvas de *H. virescens* resistentes a ação de *Bacillus thuringiensis*, no qual a MP promoveu a imobilização da toxina (FERRÉ; VAN RIE, 2002; BAXTER; HEWIT; HAYNES, 2008).

As células colunares são descritas como células digestivas ou principais, apresentam características morfológicas de células absorptivas, com citoplasma basófilo e extensões citoplasmáticas (microvilosidades) em sua região apical que formam a bordadura estriada, e são consideradas as mais numerosas no epitélio, (LEVY et al., 2004; OKUDA et al., 2007; FIALHO et al., 2009; SOUSA et al., 2009).

Estas células apresentaram alterações evidentes nas quatro gerações, com variação nas regiões citoplasmáticas e nos níveis de alterações com o passar das gerações. Possivelmente o aumento da concentração de vírus (LDB₈₀), utilizado nos ensaios de pressão de seleção tornou essa camada epitelial mais alterada e sensível. Além disso, a combinação do vírus (concentrações crescentes) com as pressões realizadas e a ação conjunta dos flavonoides (rutina e/ou genistina) podem ter provocado os danos estruturais observados neste trabalho.

Observamos alterações na porção apical das Co, como o espessamento da bordadura estriada, a desorganização e desestruturação dessa bordadura e até a sua ausência (indicativo de forte alteração), entretanto estudos posteriores da MP deverão ser realizados com o uso da microscopia eletrônica de transmissão, para elucidar melhor essas alterações.

A desestruturação e até a ausência da MP pode ser atribuída à concentração e/ou intensidade de liberação das protusões citoplasmáticas, que como foram observadas em alguns casos, levando consigo pedaços da bordadura. Por outro lado, pode ocorrer uma variação na concentração dessas microvilosidades, que pode variar de acordo com a região do intestino analisada, conforme relatado em estudos realizados no IM de larvas de *Diatrea saccharalis* (Fabricius), onde a região anterior apresentava escassez de microvilosidades, quanto comparadas com a região posterior (PINHEIRO; GREGÓRIO, 2003).

A bordadura estriada é reconhecida por conter receptores responsáveis pela ligação dos vírions, os quais, em um processo inicial de infecção das células colunares irão se fundir com esses receptores. Dessa forma, uma alteração nessa estrutura, pode modificar ou alterar a capacidade de ligação dos receptores nas microvilosidades, prejudicando o processo de infecção do vírus (PIGOTT; ELLAR, 2007). Além disso, as microvilosidades são revestidas pelo glicocálice e uma perda funcional dessas estruturas pode interferir na adesão do vírus AgMNPV (FLIPSEN et al., 1995; BARRET et al., 1998;).

As regionalizações das células colunares em porção apical e basolateral, proporcionaram uma avaliação mais detalhada das alterações provocadas pelos flavonoides.

Na região basolateral foi observado em alguns tratamentos da 25^a e 40^a gerações, o núcleo celular com aspecto granuloso e cromatina descondensada, quando comparado ao tratamento BRS 257. Tal fato pode ser relacionado possivelmente à alta atividade metabólica das células. Nossos resultados são corroborados por Costa et al., (2012), que observaram núcleo esférico com descondensamento da cromatina (eucromatina) e um nucléolo evidente nas células colunares de larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus), após o tratamento com extrato de *Annona coriaceae*. Além disso, a região apical e basolateral contêm organelas como retículo endoplasmático rugoso, lisossomos, vesícula de pinocitose, elementos do citoesqueleto, complexo de Golgi, mitocôndrias e grânulos de secreção (CIOFFI, 1979; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; PINHEIRO; GREGÓRIO, 2003; LEVY, 2005).

Nas células colunares das larvas da 180^a geração eram notáveis alterações na porção apical (desde a liberação de protusões citoplasmáticas com núcleo ou porção dele) sendo desprendido e/ou liberado para o espaço ectoperitrófico e intensa vacuolização citoplasmática da porção basolateral. Os efeitos dos compostos foliares também foram observados por Salvador (2008), ao comparar os efeitos dos genótipos BR 16, PI 227687, IAC 100, PI 274454 e Dowling com dieta artificial.

Alterações foram constatadas no IM de larvas de outras espécies de insetos, como descritos por Rharrabe et al. (2007) que estudaram os efeitos de alguns aleloquímicos (alcaloide) beta-carbolinas de *Peganum harmalla* (arruda da síria) e observaram os efeitos citotóxicos nas células epiteliais no IM de larvas de *Plodia interpunctella* (Hübner). Estas células apresentavam os vazios citoplasmáticos, intensa vacuolização e a liberação de protusões citoplasmáticas.

Efeitos similares foram observados em outras ordens de insetos como em larvas de *A. aegypti* (Diptera), alimentadas com outros extratos foliares como *A. coriaceae*

(COSTA et al., 2012); *Magonia pubescens* (REY; PAUTOU; MEYRAN, 1999; SILVA et al. 2004).

Scudeler (2012) observou o efeito tóxico de óleo de Nim no IM de larvas de neuroptera *Ceraeochrysa claveri* (Návas), e relatou que esse composto provocou alterações nas células colunares principalmente na porção apical e basolateral destas células.

Segundo Appel (1993) as alterações promovidas por compostos químicos estão associadas com o processo de ativação destes compostos fenólicos através da oxidação. Neste caso, formando os radicais livres de hidroxila (OH), responsáveis pela ruptura e distúrbios do metabolismo no epitélio intestinal. Em larvas de lepidópteros a ligação covalente do ácido clorogênico com proteínas monoméricas inibe a absorção de aminoácidos (FELTON et al., 1989; FELTON; DUFFEY, 1991).

Kakamand; Mahamound e Amin (2008) estudaram os efeitos causados por três inseticidas químicos no IM de *Apis mellifera* (Linnaeus) e notaram que as células colunares apresentaram alterações semelhantes como às descritas em nossos resultados.

Além destas alterações estruturais regionalizadas nas Co, observamos o descarte de células colunares inteiras para o espaço ectoperitrófico nos tratamentos Dowling da 15ª geração e BR 16 da 180ª geração.

Esse processo pode estar ligado a diversos fatores que podem ser desde o processo fisiológico de renovação celular, no qual, as células alteradas e/ou danificadas são descartadas (CRUZ-LANDIM; SILVA-DE-MORAES; SERRÃO, 1996; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998; BROOKS et al., 2002; KAKAMAND, MAHAMOUND; AMIN, 2008); secreção apócrina de enzimas digestivas (CAETANO et al., 1994; SERRÃO; CRUZ-LANDIM, 1995; CRISTOFOLETTI; RIBEIRO; TERRA, 2001) ou apoptose (morte celular programada) (TETTAMANTI et al., 2007; ROST-ROSZKOWSKA, 2008; AZEVEDO et al., 2009).

Podemos inferir que no nosso caso, essa reação deva-se à ação do flavonoide genistina, que mesmo em baixas concentrações (BR 16 - 6,57ng/mg e Dowling - 9,85ng/mg) provocam alterações nestas células.

Estudos anteriores de nosso grupo mostraram o descarte dessas células na população suscetível ao vírus da mesma espécie larval, após serem tratadas com o genótipo Dowling. Além do efeito da genistina, também foi observado o efeito sinérgico da interação da rutina e da genistina no tratamento IAC 100, relatados por Cruz, (2010).

O descarte de células colunares foi observado no IM de larvas de *A. aegypti* (COSTA et al., 2012). Os autores atribuíram esse descarte ao efeito da acetogenina, um

composto encontrado em extratos *A. coriacea*, que possui elevado potencial citotóxico, e que afeta a membrana mitocondrial interna, inibindo a fosforilação oxidativa (MENESES da SILVA et al., 1996). Essas acetogeninas, por sua vez interferem na produção de ATP, agindo no complexo I da cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias, conduzindo dessa forma ao processo de morte celular programada ou apoptose (ALALI; LIU; McLAUGHLIN, 1999).

Apesar da formação de protusões citoplasmáticas no processo de liberação e/ou descarte para o espaço ectoperitrófico ser considerada um processo normal de renovação epitelial, essas protusões foram observadas em maior intensidade em alguns tratamentos de algumas gerações.

O processo de liberação dessas protusões não tem uma função bem definida em relação ao sistema de defesa celular. Alguns autores atribuem esse fato ao processo de degeneração celular como resultado da renovação epitelial (ANDERSON; HARVEY, 1966; DE PRIESTER, 1971); eliminação de artefato (RYERSE et al., 1992); pela secreção apócrina ou microapócrina na liberação de enzimas digestivas (SANTOS et al., 1984; WOOD; LEHANE, 1991). De acordo com Anderson e Harvey (1966) os agentes ou artefatos sofrem a ação dessas enzimas digestivas e então são envelopados por “bolsas”, as quais serão então liberadas para o lúmen intestinal, e em alguns casos essas protusões podem levar consigo porções da bordadura estriada como observado em alguns tratamentos.

A eliminação de protusões sofre ações de enzimas digestivas que são formadas nas células colunares.

As protusões relacionadas com os processos de degeneração, para eliminação desses componentes celulares degenerados, são evidenciadas em condições fisiológicas normais como na muda ou ecdise e na metamorfose dos insetos (DE PRIESTER, 1971).

O processo de formação das protusões pode ser atribuído à ação de microrganismos ou da ingestão de produtos nocivos, no qual as células buscam esse recurso para “eliminar e/ou expulsar” os agentes tóxicos do interior das células (BROOKS et al., 2002).

O jejum nos insetos não interrompe a produção de enzimas, dessa forma, Khan e Ford (1962), ao avaliarem a atividade enzimática do IM de *Dysdercus fasciatus* (Signoret), com a produção de protusões citoplasmáticas não observaram nenhuma relação, concluindo que elas representariam uma degeneração normal do epitélio provocada pela privação de alimento, não levando essas células a um colapso imediato, ou seja, o processo de liberação de enzimas digestivas continua normalmente.

As células colunares podem liberar essas protusões por processo de secreção apócrina e microapócrina. A secreção microapócrina consiste na eliminação de pequenas vesículas de membrana simples ou dupla membrana nas microvilosidades das células colunares como observado por Santos et al. (1984) em *Erinnyis ello* (Linnaeus) Wood e Lehane (1991) em *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus).

Cristofolletti; Ribeiro e Terra (2001) identificaram outro processo de secreção, a apócrina no IM de larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus), pois a presença de protusões em células colunares seria responsável pela secreção de amilase. Para Martoja e Ballan-Dufrançais (1984) esse processo foi caracterizado ultraestruturalmente pela vesiculação do retículo endoplasmático rugoso, desaparecimento do complexo de Golgi, aumento do número dos vacúolos autofágicos e rarefação do citoplasma.

Em alguns casos a ausência de grânulos de secreção nas células colunares pode estar relacionado ao fato de que as enzimas digestivas estejam sendo secretadas de outra forma podendo ser relacionado ao processo apócrino ou microapócrino como observado em *E. ello*, *T. molitor* e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (SANTOS et al., 1984; JORDÃO et al., 1999; CRISTOFOLETTI; RIBEIRO; TERRA, 2001)

Geralmente os conteúdos dessas protusões podem variar de acordo com a região do intestino na qual elas são liberadas (PINHEIRO; QUAGIO-GRASSIOTTO; GREGÓRIO, 2008). Pinheiro e Gregório (2003) relataram que as protusões liberadas na região anterior do IM são fracas em organelas, enquanto, que as protusões liberadas da região posterior contêm inúmeras organelas como retículo endoplasmático, mitocôndrias e vacúolos digestivos, reforçando que há diferença funcional dessas estruturas de acordo com a localização de liberação (PINHEIRO; QUAGIO-GRASSIOTTO; GREGÓRIO, 2008).

A formação e liberação de protusões citoplasmáticas foram observadas por outros autores em algumas espécies de insetos *H. armigera* (BROOKS et al., 2002); *A. aegypti* (ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003); *A. mellifera* (KAKAMAND; MAHAMOUND; AMIN, 2008), *P. interpunctella* (RHARRABE et al., 2007); *S. frugiperda* (Smith) (CORREIA et al., 2009); *A. argilacea* (SOUSA et al., 2009); *C. claveri* (SCUDELER, 2012).

Em nosso trabalho, a análise pontual de cada porção citoplasmática mostrou que as modificações foram mais intensas na porção apical e basolateral da 180ª geração, enquanto que nas outras gerações foram menos intensas.

Na 180ª geração o tratamento Dowling foi o que gerou maiores danos na porção basolateral, sendo esse tratamento constituído pelo flavonoide genistina. Deste modo,

as alterações sofridas nesta porção, afetará o labirinto basal das células colunares, assim a genistina acabará de certa forma, alterando o transporte de compostos.

Outro grupo celular avaliado foram as células caliciformes (Ca). Essas células não apresentaram grandes alterações visíveis em relação a sua morfologia, porém, foram evidenciadas alterações pontuais em alguns tratamentos e gerações. As alterações pontuais variavam, desde o aparente aumento numérico na sua distribuição no epitélio do IM quando comparada a testemunha, à alteração em relação à turgência da câmara celular, que apresentava aparente hipertrofia do citoplasma celular.

Estudos realizados com *D. saccharalis* por Pinheiro; Quagio-Grassiotto e Gregório (2008) relataram a variação na composição e formato da cavidade da câmara do cálice das células caliciformes. Nas células localizadas nas regiões anterior e média, a cavidade era mais estreita e apresentava projeções semelhantes à microvilosidades, e estas projeções eram localizadas no ápice. Na região posterior essa cavidade era maior na base das células e as projeções localizadas na base do cálice, proporcionando dessa forma o aparente aumento do volume citoplasmático da câmara nas células. Geralmente as projeções contêm mitocôndrias que são responsáveis pelo transporte iônico. O aumento no volume do citoplasma de extrusão da câmara pode ser atribuído a presença dessas mitocôndrias como foi descrito em vários insetos (ANDERSON; HARVEY, 1966; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999; LEVY et al., 2004). Algumas alterações nas células caliciformes poderiam alterar o processo homeostático iônico, pois, as mesmas auxiliam as células colunares nesse processo e na absorção de metabólitos (MOFFET; KOCH, 1995; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; CHAPMAN, 1998;). Entretanto, para validar nossos resultados alguns estudos morfométricos e histométricos deverão ser realizados.

As células regenerativas foram observadas na região basal do epitélio, isoladamente ou aos pares ou em grupos, denominados de “ninhos”. Estas células apresentavam formato oval a esférico, com o citoplasma basófilo como descrito por Wanderley-Teixeira et al. (2006) em *Tropidacris collaris* (Stoll) e Scudeler (2012) em *C. claveri*. Foi observado um aparente aumento numérico destas células, em alguns tratamentos nas diferentes gerações, porém, para validar esses resultados em relação ao aparente aumento numérico devem-se realizar estudos quantitativos das células. Outra alteração observada foi em relação à presença dos “ninhos de células regenerativas”. Os “ninhos” podem estar relacionados ao processo de renovação epitelial, o qual consiste na substituição de células eliminadas e/ou danificadas, geralmente colunares e caliciformes, por outras desenvolvidas a partir da divisão mitótica dessas células (BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; CHAPMAN,

1998; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999;). Assim pode-se inferir que houve o aparente aumento na atividade mitótica destas células. Fato semelhante foi observado em *M. quadrifasciata anthidioides*, no qual, esses ninhos foram evidenciados na base do epitélio do IM de abelhas rainhas e rainhas fisogástricas (FRANÇA et al., 2006) e em *Atelura formicaria* (Heyden) no qual esses ninhos foram visualizados em processo de diferenciação celular (ROST-ROSZKOWSKA; VILIMOVA; CHAJEC, 2010).

Este aumento também foi observado em *A. aegypti* tratados com extrato de tingui (ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2008). Outro aspecto descrito por Cruz-Landim; Silva-de-Moraes e Serrão (1996) pode estar relacionado com a duração do ciclo biológico do inseto, no qual, em ciclos mais curtos estas células são detectadas em maior quantidade devido ao alto metabolismo, enquanto, em ciclos mais longos estas células são encontradas em menor quantidade, pois o metabolismo é mais lento.

Além das alterações morfológicas, observamos alterações promovidas na composição química dessas estruturas através de técnicas histoquímicas específicas. Em relação a presença de polissacarídeos neutros, notou-se a presença de grânulos PAS⁺ em maior concentração no citoplasma das células colunares, com distribuição de forma irregular nas duas porções citoplasmáticas (apical e basolateral) e nas protusões com variação entre os tratamentos e as gerações.

Estes grânulos são geralmente hidratos de carbono que são encontrados na natureza como polímeros com médio a alto peso molecular. Estes polímeros podem diferir na identidade das suas unidades de monossacarídeos, no comprimento das cadeias, nos tipos de ligações e no grau de ramificação. Os compostos mais comuns são: glicogênio e o amido. Os quais por sua vez são utilizados como combustíveis de alto valor energético (glicogênio), ou servem geralmente como elemento estrutural das paredes celulares das plantas (celulose) e dos exoesqueletos dos insetos (quitina) (NELSON; COX, 2006).

Segundo Terra e Ferreira (1991), tais polissacarídeos encontrados nas células colunares apresentam diferentes funções como absorção de produtos da digestão e produção de enzimas, com variação de concentração de acordo com a região do IM localizada, sendo que a maior concentração pode ser evidenciada na região distal do órgão (RIBEIRO; FERREIRA; TERRA, 1997; PINHEIRO; QUAGIO-GRASSIOTTO; GREGÓRIO, 2008).

É conhecido que as células colunares são responsáveis pela secreção de enzimas digestivas, dos compostos da membrana peritrófica e também pela absorção dos produtos assimilados da digestão (RICHARDS; DAVIES, 1994; BILLINGSLEY; LEHANE,

1996;). A alta concentração de grânulos PAS⁺ pode estar relacionada ao fato das células serem responsáveis por essa secreção e formação da membrana peritrófica. A membrana é uma camada acelular, que consiste em uma rede de fibrilas de quitina dispostas em uma matriz proteico-glicoproteica (peritrofina) e de um polímero linear N-acetil-D-glucosamina (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; WANG; GRANADOS, 2001).

A variação na distribuição dos grânulos entre os tratamentos nas diferentes gerações pode estar relacionado a presença dos flavonoides, neste caso a rutina e genistina. Ambos os compostos interferem negativamente no desenvolvimento biológico e na fisiologia dos insetos, através da alteração nas atividades enzimáticas e hormonais, bloqueando vias bioquímicas e reduzindo a assimilação de substâncias essenciais, além do armazenamento de nutrientes dessas larvas (KUBO; HANKE, 1986; HARBONE, 1991).

Além dessa distribuição variada dos polissacarídeos neutros nos tratamentos e nas diferentes gerações, em alguns casos pode ser observada a ausência em algumas gerações e tratamentos de reação positiva. A ausência de marcação pode ser atribuída, não só pela influência negativa dos flavonoides, como também, ao fato da manutenção da taxa de resistência do inseto em relação ao vírus AgMNPV. Em alguns casos o inseto, requer um maior gasto energético. Dessa maneira ocorre a utilização de fontes de energia que são encontradas em compostos complexos de polissacarídeos, lipídeos e proteínas. Geralmente essas reservas são retiradas ou das reservas encontradas nas células ou também em local de armazenamento. Em larvas de *A. gemmatalis* este local é encontrado no corpo gorduroso, que é um órgão de metabolismo e armazenamento de carboidratos, proteínas e lipídeos (ARRESE; SOULAGES, 2010; CARVALHO et al., 2013).

As células caliciformes apresentaram grânulos PAS⁺ apenas no tratamento BRS 257 da 180ª geração. Pinheiro, Quagio-Grassiotto e Gregório (2008), identificaram esses grânulos PAS⁺ em células caliciformes em larvas de *D. saccharalis* e atribuíram esse fato a exemplo de outros autores, a atividade destas células no auxílio às células colunares na absorção de metabólitos e na homeostasia iônica (MOFFET; KOCK, et al., 1995; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; CHAPMAN, 1998).

Dessa forma nossos resultados são corroborados por aqueles obtidos por Pinheiro, Quagio-Grassiotto e Gregório (2008), que relataram que a secreção glicoproteica observada, é produzida exclusivamente pelas células colunares e regenerativas.

A presença de polissacarídeos neutros também foi verificada por outros autores, que identificaram essa reação nas células colunares e nas protusões citoplasmáticas no IM de larvas de outras espécies de lepidópteros como *S. frugiperda* (CORREIA et al.,

2009); *A. argilacea* (SOUSA et al., 2009). Entretanto a presença desses grânulos não fica restrita apenas aos lepidópteros. Também foram observados em hemiptera-heteroptera em *Triatoma infestans* (Klug) e *Podisus nigrispinus* (Dallas), em diptera nas espécies *D.hominis* e *A. aegypti*, em orthoptera *Tropidacris collaris* (Stoll) e em neuroptera em larvas e adultos de *C. claveri* evidenciando que os carboidratos são essenciais para o desenvolvimento dos insetos (BURGOS; GUTIÉRREZ, 1976; ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003; WANDERLEY-TEIXEIRA, 2006; SCUDELER, 2012).

Dessa maneira a técnica do PAS nos revela a presença de polissacarídeos neutros que apresentam em sua estrutura grupamentos 1,2-glicóis, entretanto, não informa qual é o tipo de polissacarídeo encontrado se é de reserva ou estrutural, assim procedemos a identificação do glicogênio através da digestão pela alfa amilase, que tem por objetivo a exclusão desta substância.

Sabe-se que o glicogênio e outros polissacarídeos são considerados importantes para o metabolismo, sendo que o glicogênio uma importante fonte de reserva que pode ser mobilizadas e utilizadas em situações que exija um maior gasto energético do inseto como metamorfose, reprodução, defesa, locomoção entre outros (KILBY, 1965).

Nossos resultados mostraram que após a digestão pela amilase salivar, houve grande redução dos grânulos PAS⁺ nas duas porções citoplasmáticas das células colunares e nas protusões. Resultados similares foram observados em *P. nigrispinus*, no qual, após esses insetos serem alimentados com presas de *S. frugiperda* criadas em algodão Bt, apresentaram um menor acúmulo de glicogênio na região apical das células colunares, quando comparadas com as células do controle (CUNHA, 2011).

Hock; Pilarska e Dobart (2009) verificaram a utilização dessa fonte de energia em larvas de *Lymantria dispar* (Linnaeus), e observaram que a concentração de glicogênio aumentava, conforme o nível de desenvolvimento larval tanto na população de larvas sadias como na população de larvas infectadas com o entomopatógeno *Endoreticulatus schubergi*. Porém, após alguns dias de infecção a concentração de glicogênio, reduzia drasticamente nas larvas infectadas, enquanto, as larvas sadias apresentavam níveis superiores de concentração de glicogênio.

Tanto a liberação de substâncias tóxicas (flavonoides) ou de agentes entomopatógenos (Bt e vírus), podem estimular a liberação das reservas energéticas dessas células em respostas a reparação de estruturas danificadas ou no processo de defesa.

Alguns tratamentos das diferentes gerações, mesmo após a digestão pela alfa amilase apresentaram grânulos PAS⁺, indicando dessa forma a presença de

polissacarídeos que não o glicogênio, provavelmente polissacarídeos estruturais, que no caso podem estar relacionado com a quitina. Esse fato é corroborado por Cruz et al. (2008), ao realizarem estudos histoquímicos específicos para identificação de glicoconjugados. Os autores observaram a intensa marcação para N-acetilgalactosamina nas células colunares e na membrana peritrófica, indicando dessa maneira a presença de polissacarídeo estrutural. Entretanto para confirmar qual a natureza dos polissacarídeos, testes específicos devem ser realizados, preferencialmente com a aplicação de técnicas de glicoconjugados, como lectinas conjugadas com peroxidase. De qualquer maneira a presença dessa substância nas células colunares e nas protusões citoplasmáticas, seria uma forma alternativa do auxílio no metabolismo para o processo de desintoxicação dos flavonoides rutina e genistina das células epiteliais.

A melhor estratégia na utilização dos polissacarídeos neutros (glicogênio e quitina) é um diferencial adotado pela maioria dos organismos, que permite aos insetos utilizarem parte ou toda a energia acumulada para algum processo em particular que auxilie na eliminação de compostos tóxicos, no caso os flavonoides.

4.8 CONCLUSÕES

As alterações de reações observadas através da análise morfológica e histoquímica, são bons indicadores da resposta do sistema fisiológico do inseto em relação a ação das substâncias tóxicas e do vírus no IM das quatro gerações.

O IM das quatro gerações das larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao múltiplo nucleopoliedrovírus *Anticarsia gemmatalis* AgMNPV, apresentaram alterações estruturais e na composição química de seus constituintes que se mostraram tanto de reserva quanto estrutural;

As alterações foram evidenciadas principalmente nas células colunares e membrana peritrófica, sendo que na 180^a geração, os efeitos foram bastante intensos, provavelmente pelo efeito do aumento da concentração do vírus (LDB₈₀), associado a ação dos flavonoides;

A presença dos flavonoides e/ou do vírus pode ter estimulado a liberação das reservas energéticas dessas células em respostas a reparação de estruturas danificadas, como processo de defesa, corroborando nossa análise morfológica.

Portanto os flavonoides rutina e genistina presentes nos cultivares resistentes Dowling e IAC 100 e nas plantas utilizadas nos programas de resistência de

plantas a insetos PI 227687 e PI 229358 apresentam características consideradas ideais para a utilização na quebra da resistência das larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV.

5 ARTIGO C:

EFEITOS DA SOJA CONVENCIONAL, RESISTENTE A INSETOS E TRANSGÊNICA NO INTESTINO MÉDIO EM GERAÇÕES DE LARVAS DE *Anticarsia gemmatalis* RESISTENTES AO VÍRUS AgMNPV: ANÁLISE COMPARATIVA

5.1 RESUMO

A cultura da soja está sujeita a ataques de várias pragas que interferem na sua produção, como a *Anticarsia gemmatalis* que ataca as folhas. Esta praga tem como métodos de controles alternativos a utilização de plantas resistentes a insetos, transgênicas com característica de resistência e/ou tolerância a insetos e outros fatores e os inseticidas biológicos a base de nucleopoliedrovírus. O órgão alvo do processamento da ingesta destes produtos é o intestino médio (IM), que tem se mostrado um excelente modelo biológico para estudos comparativos de citotoxicidade. Este trabalho tem por objetivo analisar as alterações promovidas na morfologia e histoquímica do IM de larvas alimentadas com diferentes variedades de soja, em duas gerações (25^a e 40^a) de larvas resistentes ao AgMNPV. As gerações larvais resistentes foram obtidas através de bioensaios de pressão de seleção e foram tratadas com as variedades de soja “in natura” BRS 16 (testemunha – soja convencional), IAC 100 (soja resistente a insetos) e BRS 359 RR (soja transgênica). O IM das larvas de 3^o/4^o instar foi coletado, fixado em Karnovsky, processado, corado com HE para análise histológica e submetido às técnicas de ácido periódico-Schiff (PAS- para polissacarídeos neutros) e alfa amilase + PAS (glicogênio). Ambos os tratamentos promoveram poucas alterações histológicas no IM das larvas da 25^a geração onde observamos o descondensamento da cromatina no núcleo das células colunares (IAC 100) e o discreto aumento numérico das células regenerativas nos dois tratamentos (IAC 100 e BRS 359 RR). Histoquimicamente o tratamento BRS 359 RR apresentou reação positiva ao PAS na porção apical das células colunares e após a amilase houve total redução desses grânulos indicando a presença de glicogênio. Na 40^a geração as alterações histológicas foram variadas, porém mais efetivas desde a aparente ausência da membrana peritrófica (BRS 359 RR); aumento nas protusões citoplasmáticas, alterações na porção apical e basolateral das células colunares (IAC 100 e BRS 359 RR) e aumento nas células regenerativas para os dois tratamentos. As reações histoquímicas foram mais evidentes nas protusões citoplasmáticas do tratamento (BRS 359 RR) e na porção apical e basolateral das células colunares nos dois tratamentos (IAC 100 e BRS 359 RR). Após a amilase houve redução de todos os grânulos das protusões e discreta redução na porção apical e basolateral dos tratamentos IAC 100 e BRS 359 RR indicando a presença de polissacarídeo estrutural, além de glicogênio. Ambas as variedades de soja (IAC 100 e BRS 359 RR) além de promoverem alterações histofisiológicas no IM, que poderão implicar na quebra da resistência da lagarta da soja em relação ao vírus AgMNPV, apresentam características que conferem resistência à insetos e podem ser recomendadas para plantio em campo.

Palavra-Chave: Morfologia. Flavonoides. Carboidratos. Glicogênio. Lagarta da soja.

EFFECTS OF CONVENTIONAL SOYBEAN, RESISTANT THE INSECTS AND TRANSGENIC ON MIDGUT IN GENERATIONS OF LARVAE THE *Anticarsia gemmatalis* RESISTANT TO VIRUS AgMNPV: COMPARATIVE ANALYSIS

5.2 ABSTRACT

The culture soybean is subject to several pests that interfere with their production, as *Anticarsia gemmatalis* that attacks the leaves. To control this pest has the alternative methods with use of insects resistant plants, transgenic trait with insect resistance and/or tolerance to other factors and the biological insecticides based of nucleopolyhedrovirus. The target organ processing the ingestion of these products is the midgut (IM), which has proven to be an excellent biological model for comparative studies of cytotoxicity. This work aims to analyze the changes promoted in the morphology and histochemistry of IM larvae fed different soybean varieties, in two generations (25th and 40th) of resistant larvae to AgMNPV. Resistant generations larval were obtained by method of pressure selection bioassays and treated with varieties soybean "in natura" BRS 16 (control-conventional soybeans), IAC 100 (soybean resistant to insects) and BRS 359 RR (transgenic soybean). The IM larvae 3rd/4th instar was collected, fixed in Karnovsky, processed, stained with HE for histological analysis and submitted to technique periodic acid-Schiff technique (PAS for neutral polysaccharides) and alpha amylase + PAS (glycogen). Both treatments promoted a few histological changes in IM larvae of the 25th generation where we observe the descondensamento chromatin in the nucleus of columnar cells (IAC 100) and the discrete numerical increase of regenerative cells in both treatments (IAC 100 and BRS 359 RR). Histochemically treatment BRS 359 RR showed positive reaction to PAS in the apical portion of the columnar cells and after amylase was total reduction of these granules indicating the presence of glycogen. In the 40th generation histological changes were varied, but more effective since the apparent absence of a peritrophic membrane (BRS 359 RR); increase in cytoplasmic protrusions, changes in basolateral and apical portion of the columnar cells (IAC 100 and BRS 359 RR) and increase the regenerative cells for both treatments. Histochemical reactions were most evident in the cytoplasmic protrusions of treatment (BRS 359 RR) and basolateral and apical portion of columnar cells in both treatments (IAC 100 and BRS 359 RR). After amylase decreased all beads from protrusions and a slight reduction in the apical portion of the IAC 100 and basolateral and BRS 359 RR treatments indicating the presence of a structural polysaccharide, and glycogen. Both varieties of soybean (IAC 100 and BRS 359 RR) besides promoting histophysiological changes in IM, which may involve the breakdown of resistance the velvet bean caterpillar regarding to virus AgMNPV, exhibit characteristics that confer resistance to insects and can be recommended for planting in the field.

Keywords: Morphology. Flavonoids. Carbohydrates. Glicogen. Velvet bean caterpillar.

5.3 INTRODUÇÃO

Na cultura da soja os sistemas de controles de pragas, doenças e plantas daninhas aplicados pela maioria dos agricultores, baseiam-se principalmente na utilização de produtos fitossanitários (inseticidas, fungicidas, acaricidas e herbicidas). Muitos dos produtos utilizados são formulados sintéticos, com amplo espectro de ação, sem seletividade que podem promover alguns efeitos adversos como: redução da população de insetos benéficos, surgimento ou seleção de populações de pragas resistentes e pragas secundárias, contaminação do ambiente, resíduos nos alimentos, intoxicação dos aplicadores entre outros.

Visando reduzir esses problemas causados pelo uso excessivo desses produtos sintéticos, táticas alternativas de controle de pragas, doenças e plantas daninhas vem sendo adotadas (KOGAN; HERZOG, 1980). Estas táticas são baseadas na resistência de plantas e de plantas geneticamente modificadas (OGM), no controle microbiano de insetos, na aplicação de produtos seletivos e bioinseticidas, na utilização de predadores e parasitóides e no manejo cultural (HOY, 1976; KOGAN, 1976; MADDOX, 1976; METCALF, 1976).

No controle da lagarta da soja está o uso do bioinseticida a base do vírus AgMNPV, específico para essa praga, que vem sendo aplicado em campo há muitos anos. A forma de infecção desse vírus é por via oral onde após a ingestão das folhas contendo os poliedros virais, os víriões são liberados no lúmen intestinal da larva iniciando o processo de infecção (MOSCARDI; CARVALHO; 1993; ABOT et al., 1996).

A utilização de plantas com resistência a pragas é considerado um método que apresenta maior compatibilidade com os demais métodos de controle, não exigindo tecnologia específica para ser aplicada em campo e não elevando os custos das sementes (KOGAN, 1986). Neste aspecto, as plantas apresentam características morfológicas, físicas e químicas inadequadas para alimentação ou sobrevivência do inseto, sendo que o fator químico é considerado muito importante principalmente pela presença de alguns compostos como os flavonoides. Estes podem causar uma série de efeitos sobre a biologia e fisiologia do inseto, além de provocar repelência, a inibição da alimentação, mortalidade, alterar a fertilidade e fecundidade entre outros (LARA, 1991).

A utilização de organismos ou plantas geneticamente modificadas é uma alternativa que vem sendo empregada no manejo de pragas, doenças e plantas daninhas, pois são responsáveis pela manutenção da resistência das plantas aos diversos fatores adversos que prejudicam o seu desenvolvimento.

A modificação genética a qual a planta é submetida é caracterizada principalmente pela introdução de DNA exógeno em células de plantas, através da engenharia genética, visando a expressão de genes heterólogos ou também da sua expressão ou supressão de genes endógenos nas plantas.

Na tecnologia de transformação genética são utilizados, além dos genes de interesse, os marcadores de seleção para cada característica e os genes repórteres. Os genes marcadores de seleção são capazes de conferir resistência ou tolerância a antibióticos e a herbicidas permitindo a seleção do material transgênico de interesse. Os genes repórteres codificam proteínas cuja presença ou atividade enzimática é facilmente percebida e mensurável, denotando a condição transgênica de células, tecidos e organismos (WALDEN, WINGENDER, 1995).

Dentre as plantas geneticamente modificadas duas apresentam em sua composição genes que codificam algumas proteínas de interesse: a proteína Cry 1 Ac de *Bt* que confere resistência insetos e a proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3 fosfato sintase (EPSPs) de *Agrobacterium* sp., tolerantes ao princípio ativo do glifosato (Roundup[®]) (PARROT et al., 1994; STEWART et al., 1996; JOUANIN et al., 1998; MAcRAE et al., 2005; HOMRICH et al., 2008).

O modo de ação das proteínas é considerado um processo complexo e pode ser caracterizado de acordo com o sítio de ação. Em larvas de lepidópteros os cristais de proteínas Cry ou *Insecticidal Crystal Proteins* (ICPs) são protoxinas solubilizadas em pH alcalino e proteoliticamente convertidas em pequenos polipeptídeos no intestino medio (IM) das larvas. Os polipeptídeos associam-se a sítios específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células epiteliais do IM, provocando a lise osmótica por meio da formação de poros na membrana celular (SCHNEPF et al., 1998; BRAVO et al., 2004). Enquanto que o glifosato transloca dentro das plantas para centros ativos dos locais de crescimento inibindo a 5-enolpiruvilchiquimato-3 fosfato sintase (EPSPs) na via do chiquimato, pois essa via é responsável pela biossíntese dos aminoácidos aromáticos, mecanismos de defesa da planta (JOUANIN et al., 1998; MAcRAE et al., 2005; HOMRICH et al., 2008).

Atualmente existe várias cultivares de soja transgênica liberadas para o cultivo, dentre elas a cultivar de soja RR disponível no mercado apresenta tolerância para o glifosato e também a outros fatores. A cultivar BRS 359 RR além da tecnologia “Roundup Ready”, também é apresenta diferentes níveis de resistência a algumas doenças, como o nematóide *Rotylenchulus reniformis*, resistência moderada a Mancha “Olho de Rã”, Oídio e

ao nematóide de galha *Meloidogybne incognita*, além da tolerância ao vírus da Necrose da Haste.

Por apresentar essas vantagens e após a liberação do cultivo a utilização delas tem aumentado continuamente nos últimos anos. Apesar disso, poucos são os estudos da composição química e os efeitos que a soja transgênica BRS 359 RR provoca na morfologia e na composição química do IM de *A. gemmatalis*, considerado principal órgão da digestão dos produtos ingeridos e processados nos insetos.

O objetivo deste trabalho foi comparar as alterações morfológicas e histoquímicas promovidas no IM de larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao vírus AgMNPV pertencentes a duas gerações de pressão de seleção (25^a e 40^a), através da utilização de uma cultivar resistente a insetos (IAC 100) e da soja transgênica BRS 359 RR em relação à soja convencional (BRS 16), verificando o potencial dessas plantas na quebra da resistência das larvas ao vírus.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Obtenção dos Insetos Resistentes

A partir de uma única concentração estimada advindo de bioensaios anteriores de pressão de seleção e do cálculo da taxa de resistência, com o objetivo de obter 80% de mortalidade e 20% de sobreviventes (Concentração Letal – CL₈₀) (ABOT et al., 1996), foi quantificada e preparada uma solução do vírus LDB₈₀ com concentrações variadas conforme descrito Tabela 5.1.

Tabela 5. 1 – Gerações de *A. gemmatalis* resistente ao AgMNPV, concentração do vírus e taxa de resistência (porcentagem)

Geração	Concentração cpis/mL de dieta	Taxa de Resistência (%)
25 ^a	30000	73,63
40 ^a	180000	96,18

Fonte: Cruz (2011; 2012; 2013) dados pessoais.

Aliquotas de 30 mL desta solução foram inoculadas em 270 mL de dieta artificial (HOFFMANN-CAMPO; OLIVEIRA; MOSCARDI, 1985) previamente preparada e mantida em temperatura de 50°C.

Larvas resistentes (gerações antecessoras) de segundo instar foram acondicionadas em copos plásticos contendo dieta inoculada, em número de quatro por copo, totalizando 1500 larvas inoculadas/experimento e criadas em estufas do tipo B.O.D., com temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa em torno de $70 \pm 20\%$ e fotofase 14h luz e 10h escuro, com monitoramento diário. Após o terceiro dia pós-inoculação, as larvas eram avaliadas e as que apresentavam sintomas de infecção pelo vírus ou mortas eram contabilizadas para cálculo da porcentagem de mortalidade e descartadas.

As larvas que atingiam o estágio de pupas eram contabilizadas, alocadas em gaiolas de acrílico, para emergirem e se acasalarem. As gaiolas eram forradas com papel sulfite off-set linha d'água para oviposição. Diariamente esses papéis eram recolhidos, as posturas recortadas em pequenos pedaços, contendo 100 ovos e armazenadas para a realização da próxima pressão de seleção.

5.4.2 Plantio e Genótipos Utilizados

Foram utilizados os genótipos de soja: BR 16 (soja convencional, com apenas pouca concentração de genistina), IAC 100 (com características de resistência a pragas, com elevada concentração de rutina e genistina) e a soja BRS 359 RR (tolerante ao glifosato e isenta de rutina e genistina). A genealogia dos genótipos e as concentrações de flavonoides rutina e genistina estão descritos na Tabela 5.2

Tabela 5. 2 – Genótipos de soja resistentes e as concentrações de rutina e genistina em ng/mg

Tratamentos	Genealogia	Concentração (ng/mg)	
		Rutina	Genistina
1. BR 16	D69-1310-M58 (D49-772 x D49-2491) x 'Davis'	0,0	6,57
2. IAC 100	'IAC 12' x IAC 78-2318	17,36	88,52
3. BRS 359 RR	AL83RS x BRSS262	0,0	0,0

VALLE e LOURENÇÃO, (2002); ARRABAL (2013) informação pessoal

Foram semeadas cinco sementes em vasos com capacidade de cinco litros, contendo terra e irrigação por gotejamento, em uma quantidade de sete vasos por tratamento, totalizando 42 vasos. Os vasos, após semeadura foram dispostos em mesas e distribuídos de acordo com o delineamento experimental estatístico (inteiramente casualizado), em casa de

vegetação do tipo telada com incidência de luz durante o dia, na Embrapa Soja Londrina PR. Não foram realizados tratamentos culturais e fitossanitários (adubações de cobertura e aplicações de produtos químicos e biológicos) para não ocorrer interferência no experimento.

5.4.3 Insetos e Coleta do Material

As posturas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV eram fixadas na tampa da caixa gerbox, contendo em sua base papel filtro, com uma folha “in natura” do respectivo tratamento. Para manutenção da umidade e garantia de folhas tenras, foi adicionada no pecíolo uma pequena porção de algodão umedecido.

Após eclosão os insetos eram alimentados com folhas de soja “in natura” no estádio V5 dos respectivos genótipos (FEHR; CAVINESS, 1977). Foram coletados o quinto trifólio de cada tratamento, levadas ao laboratório e lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 5%, enxaguadas em água destilada, secas em papel filtro e armazenadas em caixa do tipo gerbox com os ovos de *A. gemmatalis*.

Após o segundo instar as larvas foram replicadas em quatro gerbox contendo 15 larvas/gerbox, com objetivo de facilitar a manutenção e evitar a competitividade por alimento. As folhas eram trocadas a cada 12 horas para não ocorrer a falta de alimento.

No quarto instar (10-12 dias de desenvolvimento pós-eclosão), as larvas foram anestesiadas por resfriamento (cinco minutos) e dissecadas sob microscópio estereoscópio, com solução salina para insetos (1,80g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16g de CaCl₂; 0,004g de NaHCO₃ e H₂O – q.s.p. 100mL). Os tubos eram coletados em número de 15 por tratamento, fixados em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2) por seis horas e processados de acordo com protocolo de Cerri e Cerri-Sasso (2003) e incluídos em resina glicolmetacrilato (GMA – Kit de embebição Historesin[®] da Leica) conforme orientações do fabricante. O material foi cortado com 4µm de espessura com navalha de tungstênio, em micrótomo rotativo automático modelo LEICA RM 2265 e colocados em lâminas de vidro previamente limpas em solução de álcool etílico + éter (1:1).

5.4.4 Análise Morfológica

Os cortes foram hidratados (cinco minutos) em H₂O destilada, corados com Hematoxilina de Harris (40 minutos); lavados em água corrente (10 minutos), corados com

Eosina Aquosa (30 minutos), lavados em H₂O destilada (cinco minutos); desidratados em álcool etílico 95% e 100%; diafanizados em sequência de três banhos em xilol (10 minutos cada); montados em bálsamo do Canadá e após secagem foram analisados e documentados em fotomicroscópio de luz (Axiophot da Zeiss) do Departamento de Histologia da UEL.

5.4.5 Análise Histoquímica

Utilizou-se o método do ácido periódico-Schiff (PAS) para detecção de polissacarídeos neutros (grupamentos 1,2-glicol); PAS + acetilação (bloqueio pela acetilação) e associação PAS + amilase salivar (detecção do glicogênio) descritos em Pearse (1985).

O material foi submetido ao tratamento com solução de ácido periódico 0,1% a 56°C em estufa (15 minutos), corado com Reativo de Schiff (60 minutos), lavado em H₂O corrente, contra-corado com Hematoxilina de Harris (30 minutos), lavados, desidratados em séries crescentes de álcool etílico (70 a 100%), diafanizados em xilol, montados em bálsamo do Canadá e analisados. Para controle foi efetuado o bloqueio pela acetilação.

Para a detecção de glicogênio pela alfa amilase, os cortes foram submetidos ao tratamento com solução de amilase salivar 0,5% (\pm 37°C em estufa) por duas horas, lavados em H₂O corrente e destilada e submetido à técnica do PAS. e analisadas.

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Morfologia

As alterações observadas no intestino médio (IM) das larvas de *A. gemmatalis* para as duas gerações resistentes ao AgMNPV e alimentadas com diferentes tipos de soja: convencional (testemunha BR 16); resistente a insetos (IAC 100) e transgênica (BRS 359 RR) estão descritas na tabela 5.3 e 5.4.

Tabela 5.3 – Avaliação das alterações causadas pela ingesta da cultivar de soja resistente a insetos (IAC 100) e da cultivar transgênica (BRS 359 RR), em relação ao controle (BR 16) no epitélio do IM de duas gerações de larvas resistentes ao AgMNPV.

Geração	Tipo Celular	Tratamentos	Regiões/ Estruturas			
			Membrana Peritrófica	Protusões	Porção Apical	Porção Basolateral
25 ^a	COLUNAR	BR 16	-	-	-	-
		IAC 100	-	-	-	+
		BRS 359 RR	-	-	-	-
40 ^a	COLUNAR	BR 16	-	-	-	-
		IAC 100	+	+++	+++	+
		BRS 359 RR	+++	+++	+++	+

Legenda: (-) sem alteração; (+) leve alteração; (++) moderada alteração; (+++) forte alteração.

Tabela 5.4 – Avaliação das alterações causadas pela ingesta da cultivar de soja resistente a insetos (IAC 100) e da cultivar transgênica (BRS 359 RR), em relação ao controle (BR 16) no epitélio do IM de duas gerações de larvas resistentes ao AgMNPV.

Tipo Celular	Gerações	Tratamentos		
		BR 16	IAC 100	BRS 359 RR
REGENERATIVA	25 ^a	-	+	+
	40 ^a		+++	+++

Legenda: (-) sem alteração; (+) leve alteração; (++) moderada alteração; (+++) forte alteração.

O IM das larvas alimentadas com o genótipo BR 16, que serviu de testemunha era constituído da luz para a periferia, pela membrana peritrófica que delimitava os espaços endoperitrófico e ectoperitrófico, pela camada epitelial composta pelas células colunares, caliciformes e regenerativas e camada muscular (músculos longitudinais e circulares) (Figs.: 5.1 A e D).

Para nossas análises as alterações foram avaliadas para os constituintes epiteliais e membrana peritrófica (MP).

A MP não apresentou alterações nos tratamentos da 25^a geração e estava aparentemente ausente na 40^a geração em ambos os tratamentos (Figs: 5.1 E e F).

Na região apical, as células colunares (Co) não mostraram alterações nas protusões citoplasmáticas nos tratamentos da 25^a geração (Figs.: 5.1 A, B e C), enquanto que na 40^a geração as protusões eram visíveis sendo liberadas para o espaço ectoperitrófico com núcleo celular, nos dois tratamentos (Figs.: 5.1 E e F).

Na região basolateral das Co observou-se uma discreta alteração no núcleo, apresentando cromatina pouco corada, com características de descondensada no tratamento

IAC 100 da 25^a (Figs.: 5.1 B) e nos dois tratamentos da 40^a geração (Figs.: 5.1 E e F). A 40^a geração mostrou fortes alterações na porção apical nos dois tratamentos, com espessamento de bordadura estriada no tratamento IAC 100 e a desorganização dessa estrutura no tratamento BRS 359 RR (Figs.:5.1 E e F).

As células regenerativas (Cr) apresentaram alterações que foram evidenciadas nas duas gerações para os dois nos tratamentos (IAC 100 e BRS 359 RR) com aparente aumento numérico, entretanto é necessária efetuar uma contagem para confirmar nossos resultados (Figs.: 5.1 B, C, E e F).

5.5.2 Histoquímica

5.5.2.1 Polissacarídeos neutros

Os resultados da detecção histoquímica de polissacarídeos neutros evidenciados pelo método do Ácido Periódico-Schiff (PAS) do IM de larvas resistentes de *A. gemmatalis* pertencente a 25^a e 40 gerações estão descritos nas tabelas abaixo. A reação do PAS foi utilizada para identificação de polissacarídeos neutros do grupamento 1-2 vic-glicol, que são oxidados para aldeídos pelo ácido periódico (TRICK; PUESCHEL, 1990)

Tabela 5.5 – Resultados da reação do PAS para detecção de polissacarídeos neutros no intestino médio (IM) de duas gerações de larvas resistentes de *A. gemmatalis* ao AgMNPV

Geração	Tipo Celular	Tratamentos	Regiões/ Estruturas			
			Membrana Peritrófica	Protusões	Porção Apical	Porção Basolateral
25 ^a	COLUNAR	BR 16	-	-	-	-
		IAC 100	-	-	-	-
		BRS 359 RR	-	-	+++	-
40 ^a	COLUNAR	BR 16	-	++	++	++
		IAC 100	-	-	+++	++
		BRS 359 RR	-	+++	+++	++++

Legenda: (-) reação negativa; (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (++++) reação muito forte.

O IM das larvas das duas gerações apresentaram reação PAS⁺ nas células colunares com variação de intensidade de reação, estruturas e gerações.

Nas protusões citoplasmáticas houve positividade ao método para 40ª geração nos tratamentos BR 16 e BRS 359 RR, enquanto que o tratamento IAC 100 não apresentou reatividade ao método (Fig.:5.2 C).

A 25ª geração apresentou reação positiva na região apical somente para o tratamento BRS 359 RR (Fig.:5.2 A), enquanto que a 40ª geração apresentou positividade ao método para todos os tratamentos BR 16, IAC 100 e BRS 359 RR, com grânulos PAS⁺ variando em intensidade de reação (Fig.: 5.2 B, C e D).

Na porção basolateral somente os tratamentos da 40ª geração apresentaram grânulos PAS⁺ (Figs.: 5.2 C e D) para todos os tratamentos.

5.5.2.2 Glicogênio

Os resultados obtidos para identificação do glicogênio através da digestão pela alfa amilase estão descritos nas tabelas a seguir:

Tabela 5.6 – Resultados da digestão pela alfa amilase para detecção de glicogênio no intestino médio (IM) em duas gerações de larvas resistentes de *A. gemmatalis* ao AgMNPV.

Geração	Tipo Celular	Tratamentos	Regiões/ Estruturas			
			Membrana Peritrófica	Protusões	Porção Apical	Porção Basolateral
25ª	COLUNAR	BR 16	-	-	-	-
		IAC 100	-	-	-	-
		BRS 359 RR	-	-	-	-
40ª	COLUNAR	BR 16	-	-	-	-
		IAC 100	-	-	+++	++
		BRS 359 RR	-	-	+++	++

Legenda: (-) reação negativa; (+) reação fraca; (++) reação moderada; (+++) reação forte; (++++) reação muito forte.

Após a digestão pela alfa amilase houve redução da intensidade da positividade ao PAS na camada epitelial nos tratamentos.

Nas protusões citoplasmáticas das Co houve redução total dos grânulos PAS⁺ para os tratamentos BR 16 e BRS 359 RR da 40ª geração, indicando a presença de glicogênio (Figs.:5.2 E e G).

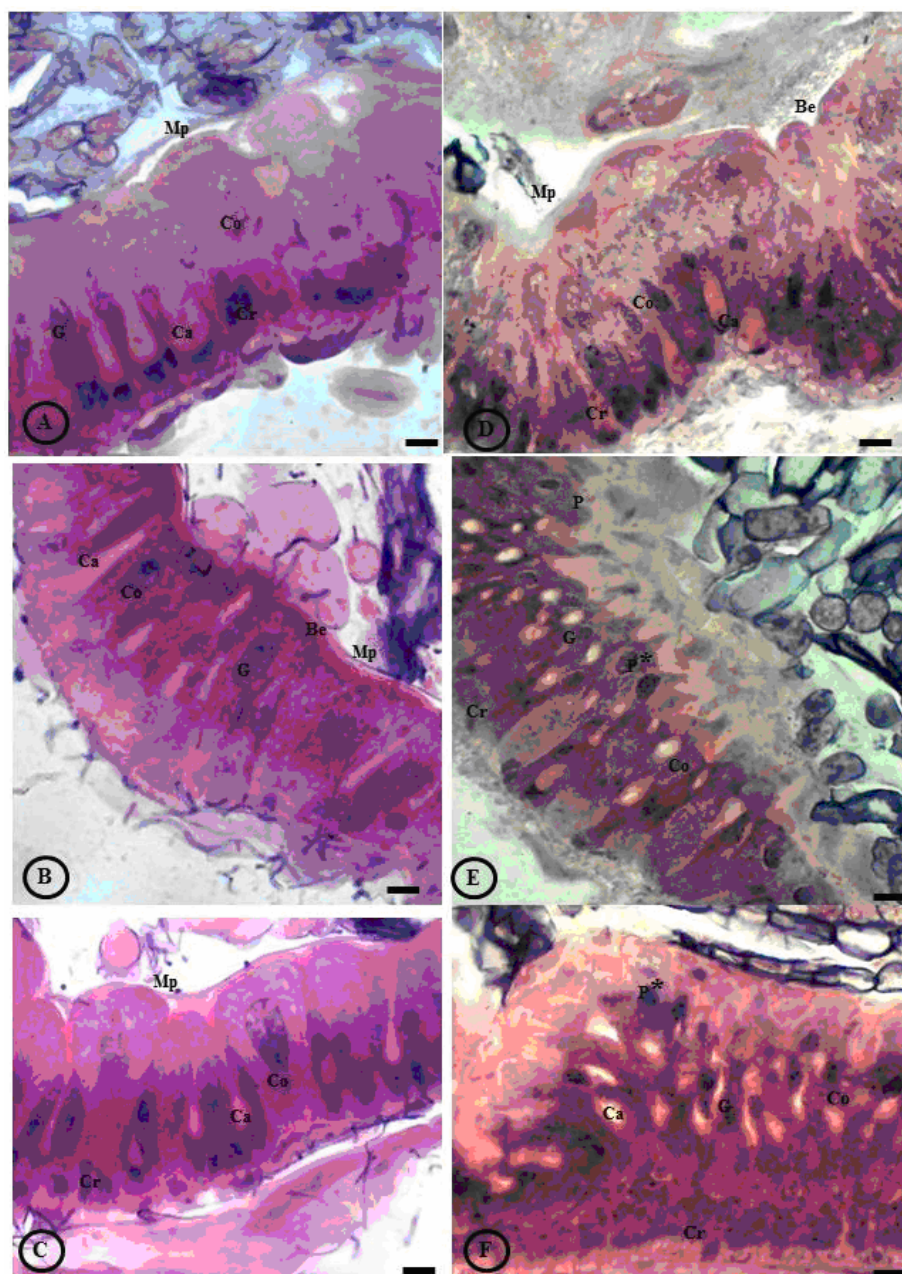
Na porção apical houve redução total dos grânulos presentes no tratamento BRS 359 RR da 25ª geração, enquanto que essa porção, nos três tratamentos da 40ª geração,

não apresentou variação na quantidade de grânulos indicando a presença de outros polissacarídeos que não o glicogênio (Figs.: 5.2 E, F e G).

Na porção basolateral dos três tratamentos houve uma discreta redução na concentração dos grânulos indicando a presença de glicogênio e de outros polissacarídeos (Figs.:5.2 E, F e G).

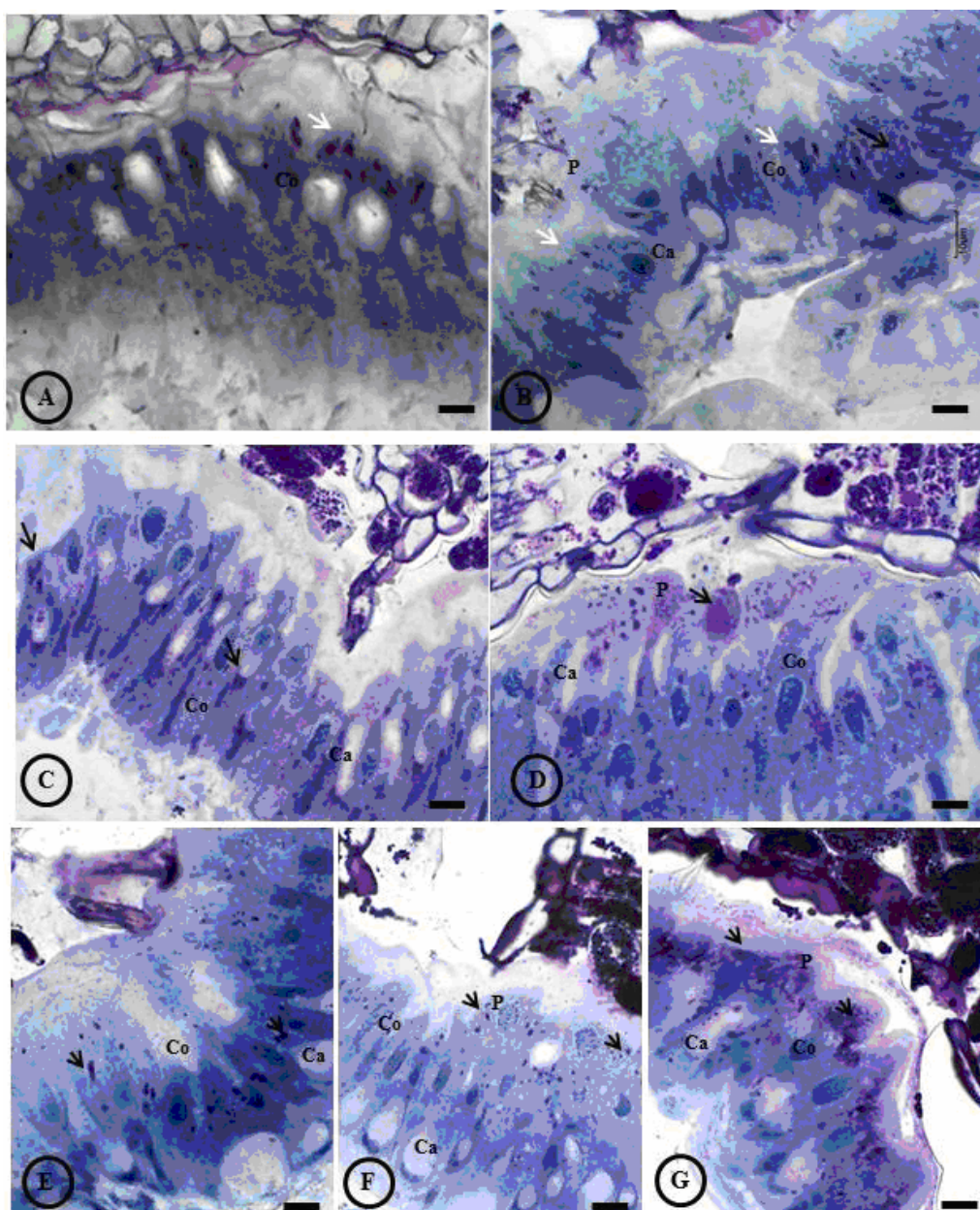
5.6 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Figura 5.1 – Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 25^a (A, B, C) e 40^a (D, E, F) gerações de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina Harris e Eosina (H-E). Barras = 10µm.



Morfologia Geral do IM de larvas alimentadas com os diferentes genótipos: Tratamentos BR 16 (A, D); IAC 100 (B, E); BRS 359 RR (C, F); IM: Membrana peritrófica (Mp), Protusões Citoplasmáticas (P), Bordadura estriada (Be), Células Colunares (Co), Células Caliciformes (Ca), Células Regenerativas (Cr). Observar nas Figuras A, e B núcleos de das células colunares com cromatina descondensada (grumos) (G); nas Figuras E e F protusões citoplasmáticas descartadas com núcleo celular e porções da bordadura estriada (P*).

Figura 5.2 – Fotomicrografia do intestino médio (IM) da 25^a (A, B, C) e 40^a (D, E, F, G) geração de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os diferentes genótipos. Histoquímica para detecção de polissacarídeos neutros (PAS) e exclusão do glicogênio. Barra = 10µm



Figuras A - D: Histoquímica para detecção de polissacarídeos neutros (PAS) Tratamento BRS 359 RR (A, D); BR 16 (B) e IAC 100 (C) –. Mp (Membrana Peritrófica); Protusões Citoplasmáticas (P); Células Colunares (Co); Células Caliciformes (Ca), grânulos PAS positivos (→).

Figura E - F: Histoquímica após digestão pela alfa amilase para exclusão do glicogênio Tratamentos BR 16 (E); IAC 100 (F) e BRS 359 RR (G). Protusões Citoplasmáticas (P); Células Colunares (Co); Células Caliciformes (Ca); grânulos positivos (outros polissacarídeos neutros (→)).

5.7 DISCUSSÃO

A soja convencional BR 16 considerada como tratamento controle é uma cultivar suscetível a insetos, mesmo apresentando baixa concentração de genistina (6,57 ng/mg) em sua composição foliar. A análise histológica do intestino médio (IM) das larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV alimentadas com esse genótipo mostrou o IM constituído por um epitélio pseudoestratificado prismático, com bordadura estriada, formado pelas células colunares, caliciformes e regenerativas estando separado do lúmen pela membrana peritrófica. Logo abaixo do epitélio encontrava-se a camada muscular composta de músculos longitudinais e circulares. Essa organização estrutural do IM é a mesma descrita por vários autores para outras espécies de larvas de lepidópteros (EISEMANN; BINNINGTON, 1994; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; HAKIM et al., 2001; LEVY et al., 2004; 2009; SALVADOR, 2008; SOUSA et al., 2009).

Nossos resultados morfológicos mostraram nas duas gerações, que os IM das larvas da 25ª geração sofreram modificações pontuais, sendo observados núcleos das células colunares com descondensamento de cromatina, no tratamento IAC 100. Enquanto que na 40ª geração todos os tratamentos promoveram alterações mais generalizadas e com variação em relação à intensidade e estrutura alterada, conforme a região celular.

Observamos alterações desde a aparente ausência da membrana peritrófica, desorganização e espessamento de bordadura estriada, aparente aumento das células regenerativas e intensidade de protusões citoplasmáticas com porções da bordadura estriada e às vezes com núcleo celular.

Alguns dos processos podem fazer parte do metabolismo normal do IM dos insetos. Porém alguns fatores podem acelerar ou aumentar o metabolismo como: a ingesta de alimento inadequado com baixo valor nutricional, presença de patógenos ou substâncias

químicas. Os fatores podem afetar a fisiologia do órgão através da alteração na morfologia do mesmo, promovendo fragilidades que provocarão alterações metabólicas (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005).

A ausência ou a fragmentação da membrana peritrófica no IM observada no tratamento BRS 359 RR da 40ª geração foi considerada como um indicativo de forte alteração. A membrana peritrófica é uma camada acelular, que funciona como uma barreira protetora contra a abrasão dos alimentos ingeridos e ação de outros microrganismos (TERRA; FERREIRA, 1991; WANG; GRANADOS, 2001). Essa estrutura é composta de uma rede de fibrilas de quitina dispostas em uma matriz proteico-glicoproteica e de um polímero, a qual é secretada por produtos da digestão e metabolismo que ocorre nas células colunares (EISEMANN; BINNINGTON, 1994; HARPER; HOPKINS, 1997).

A ausência de Mp pode ser associada com as alterações ocorridas no citoplasma das células colunares (porção apical e basolateral), pois alterações nessas células podem impedir a liberação e a produção dos produtos secretados, além de interferir na qualidade do produto a ser utilizado na composição da membrana. A intensa liberação de protusões citoplasmáticas pode prejudicar a organização estrutural da Mp, que necessita estar íntegra para desempenhar a sua função (HARPER; HOPKINS, 1997; HARPER; GRANADOS, 1999).

Na porção apical das células colunares, houve alterações na bordadura estriada. No tratamento IAC 100 as Co apresentaram bordadura mais espessa, enquanto no tratamento BRS 359 RR a bordadura estava desorganizada na 40ª geração.

A bordadura estriada é composta por microvilosidades, que são projeções citoplasmáticas, que além das funções como adesividade e absorção são também responsáveis pela ligação dos vírions presentes nos poliedros virais AgMNPV. Além disso, nas microvilosidades está o glicocálice composto de glicoproteínas multiadesivas e uma perda funcional ou alteração nessa estrutura como as observadas por nós, pode interferir no processo infeccioso, não permitindo a adesão do vírus ou retardando o processo de infecção (FLIPSEN et al., 1995; BARRET et al., 1998; FERRÉ; VAN RIE, 2002; LEVY 2005; PIGOTT; ELLAR, 2007).

A ausência ou desestruturação da bordadura pode ser atribuída à concentração e/ou intensidade de liberação das protusões citoplasmáticas, que foram observadas em alguns casos, levando consigo porções da estrutura. Por outro lado também pode ocorrer uma variação na concentração das microvilosidades, cuja concentração pode variar de acordo com a região do intestino analisada. Em estudos realizados no IM de larvas

de *Diatrea saccharalis* (Fabricius) a região anterior apresentava escassez de microvilosidades, quanto comparadas com a região posterior (PINHEIRO; GREGÓRIO, 2003).

Além das alterações na porção apical, notou-se nos tratamentos BRS 359 RR da 25ª geração e IAC 100 e BRS 359 RR da 40ª geração o aparente descondensamento da cromatina no núcleo das células colunares, com a presença de granulação fina e nucléolos visíveis. Este fato pode ser relacionado possivelmente à alta atividade metabólica das células à exemplo do observado no núcleo das células colunares de larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus), no qual, após o tratamento com extrato de *Annona coriacea*, os núcleos eram esféricos e continham a cromatina descondensada (eucromatina) e nucléolo evidente (COSTA et al., 2012).

Outra alteração observada foi em relação às protusões citoplasmáticas, as quais apresentavam um aparente aumento nos tratamentos IAC 100 e BRS 359 RR da 40ª geração. Como as células colunares são responsáveis principalmente pelas secreções de enzimas digestivas, dos compostos da membrana peritrófica e absorção de produtos provenientes da digestão (RICHARDS; DAVIES, 1994), a presença dos flavonoides rutina e genistina encontrados no genótipo IAC 100, e de outros compostos como daidzina, malonil-daidzina e a gliciteína quantificados na soja transgênica BRS 359 RR, podem alterar o metabolismo das células, tanto no seu processamento como na sua digestão.

O aparente aumento na concentração de protusões citoplasmáticas nos tratamentos IAC 100 e BRS 359 RR podem estar relacionados com o processo de descarte e/ou liberação dos compostos para o espaço ectoperitrófico. Neste caso, o processo de formação de protusões poderia estar correlacionado à ação de microrganismos ou da ingestão de produtos nocivos, no qual as células buscam esse recurso para “eliminar e/ou expulsar” os agentes tóxicos do seu interior (BROOKS et al., 2002). De acordo com Anderson e Harvey (1966) os agentes sofrem a ação das enzimas digestivas e então são envelopados por “bolsas”, as quais serão liberadas para o lúmen intestinal, em alguns casos as protusões podem levar consigo porções da bordadura estriada com o observado em alguns tratamentos.

Porém a liberação de protusões citoplasmáticas não tem uma função bem definida em relação ao sistema de defesa. Para alguns autores tal fato é ligado ao processo de degeneração celular fazendo parte da renovação epitelial, eliminação de artefato, secreção apócrina ou microapócrina, liberação de enzimas digestivas (ANDERSON; HARVEY, 1966; DE PRIESTER, 1971; SANTOS et al., 1984; WOOD; LEHANE, 1991; RYERSE et al., 1992).

As alterações provocadas no tratamento IAC 100 foram descritas por Cruz (2010) em larvas suscetíveis e resistentes ao vírus AgMNPV de *A. gemmatalis* onde o autor atribuiu o efeito deletério provocado pela rutina e genistina. Salvador (2008) observou esses efeitos no IM de larvas de *A. gemmatalis*, quando trabalhou com dieta artificial fornecendo extrato puro tanto de rutina como genistina .

Muitos dos efeitos provocados pelos flavonoides estão associados com a ativação dos compostos fenólicos através da oxidação, os quais formam radicais livres de hidroxila (OH⁻) que possuem ação tóxica, sendo responsáveis pela ruptura da membrana celular promovendo distúrbios no metabolismo das larvas (APPEL, 1993).

Os efeitos dos aleloquímicos foram observados em *Plodia interpunctella* (Hübner), que após a ingestão de folhas de *Peganum harmala* (arruda da Síria) contendo o alcaloide beta-carbolinas, notou-se o aumento da vacuolização celular, presença de vazios citoplasmáticos e liberação de protusões citoplasmáticas (RHARRABE et al., 2007). Efeitos semelhantes foram observados em outras ordens de insetos como em *A. aegypti* após tratamento com outros extratos foliares como *A. coriaceae* (COSTA et al., 2012) *Magonia pubescens* (REY; PAUTOU, MEYRAN, 1999; SILVA et al. 2004), que observaram a presença das mesmas alterações por nós relatadas corroborando assim com nossos resultados.

O tratamento BRS 359 RR, não apresentou rutina e genistina, porém apresentou outros flavonoides como a daidzina, malonil-daidzina e a gliciteína, que são compostos relacionados à resistência de plantas, e podem interferir negativamente no IM das larvas. Estudos com *Pseudoplusia includens* (Walker) e *Euchistus heros* (Fabricius) verificamos efeitos antibióticos desses compostos nessas espécies (ALBRECHT; ÁVILA, 2010). Outros estudos relataram a presença da enzima lipoxigenase que está relacionada ao aumento do gene que caracteriza resistência de plantas e são encontradas em plantas com característica de resistência a insetos e variedades transgênicas. Pilon; Oliveira e Guedes (2006) relataram que alguns inibidores de proteases (IPIs) são produzidos naturalmente por plantas que possuem tanto a característica de resistência a herbivoria causada pelos insetos, como também em plantas transgênicas com resistência e/ou tolerância a outros fatores, nesse caso o glifosato. Os IPIs funcionam como substrato específico das proteases digestivas dos insetos, pois formam um complexo estável no qual a proteólise é limitada e extremamente lenta (TIFFIN; GAUT, 2001). A ingestão crônica e acumulativa desses IPIs pode acarretar deficiência de aminoácidos essenciais influenciando no metabolismo e fisiologia do inseto (PILON; OLIVEIRA; GUEDES, 2006).

Outro tipo celular que apresentou alterações foram as células regenerativas que aparentemente estavam em maior número nos tratamentos IAC 100 e BRS 359 RR, em ambas as gerações. Essas células estavam presentes isoladamente, em pares ou grupos (“ninhos”). No primeiro caso, os tratamentos com os genótipos IAC 100 e BRS 359 RR na 25ª geração foram o que apresentaram a maior quantidade (aparente) das células, porém, para confirmar tal fato devem ser realizados estudos quantitativos que comprovem nossas observações. Quanto a presença de ninhos celulares podemos creditar ao aumento da atividade mitótica das células aparentemente em maior quantidade no tratamento IAC 100 da 40ª geração. Estes “ninhos” estão relacionados ao processo de renovação epitelial, que consiste na formação de novas células para substituição de células danificadas (geralmente colunares e caliciformes), por outras desenvolvidas a partir da divisão mitótica dessas células (BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; CHAPMAN, 1998; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999).

Sabe-se que as células que formam o epitélio do IM têm funções morfofuncionais específicas, além de secretarem e apresentarem em sua composição química, moléculas diferenciadas. Essas moléculas geralmente são polissacarídeos neutros, proteínas e lipídeos. Tais compostos estão ligados ao metabolismo, armazenamento de energia, composição estrutural entre outros processos.

Os carboidratos desempenham importante papel nos sistemas biológicos associando-se entre si, formando oligo e polissacarídeos; às proteínas, formando glicoproteínas e a lipídeos, formando glicolipídeos. Tais complexos macromoleculares atuam como reserva metabólica para as células, desempenham papel estrutural e participam ativamente de fenômenos de reconhecimento e adesão celular. Dentre os carboidratos mais comuns estão o glicogênio e o amido que por sua vez são utilizados como combustíveis de alto valor energético (glicogênio), ou servem como elementos estruturais exoesqueleto dos insetos (quitina) (NELSON; COX, 2006).

Após os testes histoquímicos específicos (PAS e digestão pela amilase), os resultados revelaram que as alterações constitutivas. Na detecção de polissacarídeos neutros, notamos reação positiva nas células colunares do IM das larvas da 25ª geração tratadas com o genótipo BRS 359 RR; enquanto a 40ª geração mostrou positividade para os genótipos BR 16 e BRS 359 RR, porém o tratamento IAC 100 não apresentou reação ao método. Tais polissacarídeos apresentam como principais funções a absorção de produtos da digestão e produção de enzimas, com variação de concentração de acordo com a região do IM localizada, sendo que a maior concentração pode ser evidenciada na região distal do órgão

(TERRA; FERREIRA, 1991; RIBEIRO; FERREIRA, TERRA, 1997; PINHEIRO; QUAGIO-GRASSIOTO; GREGÓRIO, 2008). Polissacarídeos neutros foram evidenciados por alguns autores em outros insetos (BURGOS; GUTIERREZ, 1976; ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003; WANDERLEY-TEIXEIRA, 2006; PINHEIRO; QUAGIO-GRASSIOTO; GREGÓRIO, 2008; CORREIA et al., 2009; SOUSA et al., 2009; CRUZ, 2010; SCUDELER, 2012), corroborando nossos resultados.

Além do desenvolvimento biológico dos insetos a alta concentração de grânulos PAS⁺ nas Co, pode também ser relacionada ao fato de que estas células serem responsáveis pela secreção de produtos que irão formar a membrana peritrófica (composta de quitina) (WANG; GRANADOS, 2001).

A reação do PAS revela a presença de polissacarídeos neutros que apresenta em sua estrutura os grupamentos vic-glicóis, porém não informa qual a natureza do polissacarídeo detectado (reserva ou estrutural). Dessa forma foi procedida à identificação do glicogênio, através da digestão pela alfa amilase, que detecta a presença do glicogênio por exclusão (TRICK; PUESCHEL, 1990).

Após a reação pela amilase observou-se redução dos grânulos PAS⁺ nas Co, tanto na 25^a geração quanto na 40^a geração, para o tratamento com a BRS 359 RR. A redução foi regionalizada, sendo que nas protusões citoplasmáticas foi bem mais evidente que nas outras regiões. Sabe-se que o glicogênio é extremamente importante para o metabolismo, além de ser considerada uma importante fonte de reserva. O glicogênio pode ser mobilizado em situações que exijam um maior gasto energético do inseto como metamorfose, reprodução, sistema de defesa, locomoção entre outros (KILBY, 1965). Dessa maneira nos insetos resistentes o custo metabólico é maior para a manutenção da resistência do que em inseto suscetíveis.

Hock; Pilarska e Dobart (2009), ao estudarem larvas de *Lymantria dispar* (Linnaeus) observaram que a concentração de glicogênio aumentava conforme o desenvolvimento tanto em larvas sadias como infectadas com o entomopatógeno *Endoreticulatus schubergi*, porém, após alguns dias de infecção essa concentração de glicogênio reduzia nas larvas infectadas, enquanto as larvas sadias apresentavam níveis superiores de concentração de glicogênio.

Na 40^a geração observamos que os grânulos persistiram na região apical e basolateral nos tratamentos variando na intensidade de reação, indicando a presença de outros polissacarídeos que não o glicogênio, provavelmente estrutural, como a quitina.

A presença dos grânulos nas células colunares poderia estar relacionado a secreção dos compostos da membrana peritrófica, que consiste de uma rede de fibrilas de quitina dispostas em uma matriz proteico-glicoproteica (peritrofina) e de um polímero linear N-acetil-D-glucosamina (RICHARDS; DAVIES, 1994; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; WANG; GRANADOS, 2001). Cruz et al. (2008) realizaram testes histoquímicos específicos para identificação de glicoconjugados e observaram a intensa marcação na camada epitelial para N-acetilgalactosamina nas células colunares e membrana peritrófica indicando dessa maneira a presença de polissacarídeos estrutural. Porém testes específicos devem ser realizados, preferencialmente com a aplicação de técnicas de glicoconjugados, como lectinas conjugadas com peroxidase. De qualquer maneira a presença dessa substância nas células colunares e nas protusões citoplasmáticas, seria uma forma alternativa de auxílio no metabolismo para o processo de desintoxicação das células epiteliais.

5.8 CONCLUSÕES

A análise dos efeitos provocados pelos cultivares de soja IAC 100 e BRS 359 RR em comparação a soja convencional BR 16, mostraram que o intestino médio (IM) de larvas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao AgMNPV na 25ª geração sofreu poucas alterações morfológicas, enquanto que na 40ª geração as alterações foram intensas nos dois tratamentos. As alterações foram mais evidentes na MP e nas células colunares do revestimento epitelial.

Histoquimicamente a 40ª geração mostrou mais reatividade aos métodos aplicados, sendo as Co mais reativas em todos os tratamentos.

Assim podemos concluir que a soja IAC 100 com resistência a insetos e a variedade transgênica BRS 359 RR promovem alterações a nível morfológico e químico em ambas as gerações larvais. No tratamento IAC 100 é provável que os efeitos estejam ligados aos flavonoides rutina e genistina, enquanto o tratamento BRS 359 RR as alterações são provocadas por outros flavonoides (daidzina, malonil-daidzina e genisteína).

Ambas as variedades podem ser recomendadas para plantio em campo, por apresentarem características que conferem resistência à insetos e por quebrar a resistência da lagarta da soja em relação ao vírus AgMNPV.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Pela análise dos parâmetros biológicos, morfofisiológicos e histoquímicos das diferentes gerações larvais de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao vírus AgMNPV alimentadas com os genótipos de soja convencionais (BRS 257 e BRS 16), resistentes a insetos (Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687) e transgênica (BRS 359 RR) podemos concluir que:

As larvas tratadas com o genótipo IAC 100 apresentaram menor peso inicial, menor peso de pupa refletindo dessa forma no ganho de peso, e mesmo apresentando um maior consumo foliar essas larvas foi menos eficientes na conversão do alimento ingerido e digerido;

O genótipo PI 229358 teve maior mortalidade entre os instares e total, elevou o tempo de alimentação influenciando no maior tempo de desenvolvimento, e na quantidade de alimento digerido;

Soja transgênica BRS 359 RR interferiu no crescimento, no consumo e no ganho de peso, podendo ser atribuído a interferência de outros compostos nas larvas;

O genótipo Dowling interferiu no peso de pupa, na assimilação de alimento, no qual a genistina em associação com outros compostos influenciam no desenvolvimento do inseto;

As análises morfológicas e histoquímica apresentaram alterações de reações observadas, são bons indicadores da resposta do sistema fisiológico do inseto em relação a ação das substâncias tóxicas e do vírus no IM das quatro gerações;

O IM das quatro gerações das larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV, apresentaram alterações estruturais e na composição química de seus constituintes que se mostraram tanto de reserva quanto estrutural;

As alterações foram evidenciadas principalmente nas células colunares e membrana peritrófica, sendo que na 180ª geração, os efeitos foram bastante intensos, provavelmente pelo efeito do aumento da concentração do vírus (LDB₈₀), associado a ação dos flavonoides;

A presença dos flavonoides e/ou do vírus pode ter estimulado à liberação das reservas energéticas das células em respostas a reparação de estruturas danificadas, como processo de defesa, corroborando nossa análise morfológica.

A análise comparativa dos efeitos provocados pelos diferentes cultivares de soja IAC 100 e BRS 359 RR em comparação a soja convencional BR 16, mostraram que o IM

de larvas de resistentes ao AgMNPV na 25^a geração sofreu poucas alterações morfológicas, enquanto que na 40^a geração as alterações foram intensas nos dois tratamentos. As alterações foram mais evidentes na MP e nas células colunares do revestimento epitelial.

Histoquimicamente a 40^a geração mostrou mais reatividade aos métodos aplicados, sendo as Co mais reativas em todos os tratamentos.

Assim podemos concluir que a soja IAC 100 com resistência a insetos e a variedade transgênica BRS 359 RR promovem alterações a nível morfológico e químico em ambas as gerações larvais. No tratamento IAC 100 é provável que os efeitos estejam ligados aos flavonoides rutina e genistina, enquanto o tratamento BRS 359 RR as alterações são provocadas por outros flavonoides (daidzina, malonil-daidzina e genisteína).

Os flavonoides rutina e genistina presentes nos cultivares resistentes Dowling e IAC 100 e nas plantas utilizadas nos programas de resistência de plantas a insetos PI 227687 e PI 229358 apresentam características consideradas ideais para a utilização na quebra da resistência das larvas de *A. gemmatilis* resistentes ao AgMNPV.

De modo geral os genótipos resistentes a insetos IAC 100, PI 227687 e PI 229358 podem ser recomendados para o programa de melhoramento, enquanto a BRS 359 RR e Dowling são recomendadas para o plantio convencional.

REFERÊNCIAS

- ABOT, A. R. **Parâmetros para produção de vírus de poliedrose nuclear *Baculovirus anticarsia*, visando o controle de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae).** 1997 Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 94p.
- ABOT, A. R.; MOSCARD, F.; FUXA, J. R.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; RICHTER, A. R. Susceptibility of populations of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrovirus virus. **Journal of Entomological Science**, v.30, p.62-69, 1995.
- ABOT, A. R.; MOSCARD, F.; FUXA, J. R.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; RICHTER, A. R. Development of resistance by *Anticarsia gemmatilis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. **Biological Control**, Montreal, v.7, n.1., p.126-130, ago, 1996.
- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; McLAUGHLIN, J, L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal Natural Products**. v.62, p.504-540, 1999.
- ALBRECHT, L. P.; ÁVILA, M. R. Manejo de glyphosate em soja RR e a qualidade das sementes. **Informativo ABRATES**, v. 1-2, p. 45- 54, 2010.
- ANDERSON, E.; HARVEY, W. Active transport by cercopia midgut. **The journal of Cell Biology**. v.31, n.1, p107-134, out. 1966.
- APPEL, H. M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, California, v.19, n.7, p.1521-1551, jul.1993.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolismo and regulation. **Annual Review Entomology**, v.55, p.207-255, 2010.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G. M. C.; SILVA, I. G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.17-25, 2003.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.C.; SILVA, I.G. . Estudo ultraestrutural do efeito da toxicidade do extrato da *Magonia pubescens* (ST.HILL) no mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**, v.37, n.3, p.255-267, 2008.
- ARYAL, A.; GUAN, L. C.; XU, W. Influences of secondary metabolites on the performance of lepidopterous larvae. **The Biodiversity Research & Training Forum**, v.18, p.189-204, 2007.
- AZEVEDO, D. O.; NEVES, A. C.; MALLETT, J. R. D. S.; GONÇALVES, T. C. M.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Notes on midgut ultrastructure of *Climex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). **Journal of Medical Entomology**, v.46, p.435-441, 2009.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação Agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 2006.v.1, 237 p. 4ª ed.

BARNES, S. **Effect on in vitro and in vivo models of cancer.** Journal of Nutrition, n.125, p. 777S-783S, 1995. Supplement.

BARRET, J.W. ; BROWNRIGHT, A.J.; PRIMAVERA, J.M.; RETNAKARAN, A.; PALLI, S.R. Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus. **Tissue & Cell**, v.30, p.602-616, 1998.

BAXTER, J.; HEWITT, B.; HAYNES, M. Life Course Transitions and Housework: Marriage, Parenthood and Time on Housework. **Journal of Marriage and the Family** , v.70, p.259-272, 2008.

BELAND, R. M.; HATCHETT, J. H. Expression of antibiosis to bollworm in two soybean genotypes. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p.557-560, 1976.

BIANCHI , M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BILIMORA, S.L.The biology of nuclear polyedrosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed.) **Viruses of invertebrates.** NewYork: Marcel Dekker, 1991. p.1-72.

BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, M. J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: LEHANE, M. J., BILLINGSLEY, P. F. (Eds). **Biology of the Insect Midgut.** London: Chapman & Hall, 1996, p.3-30.

BINDER, B. F.; BOWERS, W. S. Precocene II-induced changes in the anatomy of midgut goblet cells of last instar larvae of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal Insect Morphology and Embriology**, v. 3, p.127-134, 1994.

BIRKET, M. A.; CAMPBELL, C. A. M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A. J.; MARTIN, J. L; MATTHESS, M.; NAPIER, J. A.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J. A.; POPPY, G. M.; POW, E. M.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS, G. H.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. New role for cis-jasmone as an insect semiochemical and plant defense. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 97, p. 9329-9334, 2001.

BLISSARD, C. W.; ROHRMANN, C. E. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.35, p.127-155, 1990.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v.166, p.38-46, nov. 2004.

BRODERICK, N. A.; RAFFA, K. F.; HALDESMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proceedings National Academy Science of the USA**, v.103, n.41, p.15196-151199, 2006.

BROGDON, W. G.; Mc ALLISTER, J. C.; CORWIN, A. M.; CORDON-ROSALES, C. Oxidase based DDT- pyrethroid cross-resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.64, p.101-111, 1999.

BROOKS, M. E.; GORDON, K. H.; DORRIAN, S. J.; HINES, E. R.; HANZLIK, T. N. Infection of its lepidopteran host by the *Helicoverpa armigera stunt virus* (Tetraviridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.80, p.97-111, 2002.

BROUGHT, C. N.; DIXON, A. F. G. Intra-clonal trade-off between reproductive investment and size of fat body in the vetch aphid, *Megoura viciae* **Buckton Functional Ecology**, v.3, p.747-751, 1989.

BROWN, M. R.; RAIKHEL, A. S.; LEA, A. O. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. **Tissue & Cell**, Ouxford, v.17, n.5, p. 709-722, ago. 1985.

BURGOS, M. R.; GUTIÉRREZ, L. S. The intestine of *Triatoma infestans*. **Journal of Ultrastructure Research**, v.57, p.1-9, 1976.

BURR, I. W.; FOSTER, L. A. **A test for equality for variances**. West Lafayette: University of Purdue, 1972. 26p.

BUSVINE, J. R., Cross and multiple resistance in mosquitoes. **Cah O.R.S.T.O.M., Sér. Ent. Méd.**, v.6, n,3/4, p.215-219, 1968.

CAETANO, F. H.; TORRES, Jr. A. H.; CAMARGO MATIAS, M. I.; TOMOTAKE, M. E. M. Apocrine secretion in the ant, *Pochycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). **Cytobios** , p.235-242, 1994

CAMERON, J. W. M. Insect pathogens and their potential for regulation of insect populations. In: Tall timbers conference on ecological animal control by habitat management. **Proceedings...** 1971. v. 3, p. 267-277.

CARVALHO, R. B. R.; ANDRADE, F. G.; LEVY, S. M.; MOSCARDI, F.; FALLEIROS, A. M. F. Histology and ultrastructure of the body of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.56, p.303-310, 2013.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, L. M.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M.; RIBEIRO, B. M. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.10, p.1733-1761, out. 1999.

CAVALCANTE, V. M.; CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. **Naturalia**, Rio Claro, v.24, p.19-40, 1999.

CERRI, P.; CERRI-SASSO, E. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. **Micron**, v.34, n.8, p.365. 2003.

CHAPMAN, R. F. **The Insects: structure and function**. 4.ed. Cambridge: Havard University Press, 1998.

CHIANG, A. S.; YEN, D. F.; PENG, W. K. Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.333-339, 1986.

CIOFFI, M. The morphology, fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active transport. **Tissue & Cell**. v. 11, p. 467-479, 1979.

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

CLAUSEN, C. P. **Entomophagous insects**. New York: Hafner Publishing Company, 1972. 688 p.

COAST, G. M.; KAY, I. The effects of *Acheta* diuretic peptide on isolated Malpighian tubules from the house cricket, *Acheta domesticus*. **The Journal of Experimental Biology**, Londres, v.187, n.1, p.225-243, fev. 1994.

CORNEL, A. J.; STANICH, M. A.; McABEE, R. D.; MULLIGAN, F. S. High level methoprene resistance in the mosquito *Ochlerotatus nigromaculis* (Ludlow) in central California. **Pest Management Science**, v.58, p.791-798, 2002.

CORREIA, A. A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; OLIVEIRA, J. V.; TORRES, J. B. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. **Neotropical Entomology**, v.38, n.1, p.83-91, 2009.

COSTA, M. S.; PINHEIRO, D. O.; SERRÃO, J. E.; PEREIRA, M. J. Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 311-314, 2012.

COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their b-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1961-1967, 1993.

CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p.143-155, 2001.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA-de-MORAES, R. L. M.; SERRÃO, J.E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Computational Biology**, New Rochele, v.1, p.29-40, 1996.

CRUZ, N. A. MARQUES, C. R. G.; FALLEIROS, A. M. F.; MOSCARDI, F.; LEVY, S. M. Caracterização de glicoconjugados no intestino médio em larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), suscetíveis ao AgMNPV. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 2008. Uberlândia **Resumos...** Uberlândia: UFLA, 2008.

CRUZ, N. A. **Estudo Morfológico e Histoquímico do Intestino Médio de Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) Suscetíveis e Resistentes ao AgMNPV Alimentadas com Genótipos de Plantas Resistentes a Insetos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. 161p.

CUNHA, F.M. **Parâmetros Imunológicos e Morfofisiológicos em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) Expostos a Cry 1AC**. 2011. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola)

Pós-graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, 88p.

DAME, D. A.; WICHTERMAN, G. J.; HORNBY, J. A. Mosquito (*Aedes taeniorhynchus*) resistance to methoprene in an isolated habitat. **Journal American Mosquito Control Association**, v.14, p.200-203, 1998.

DE BORTOLI, S. A.; DÓRIA, H. O. S.; ALBERGARIA, N. M. M. S; MURATA, A. T.; VESCOVE, H. V. Aspectos biológicos e nutricionais de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja, amendoim e dieta artificial. **Boletim de Sanidad Vegetal Plagas** v.31, p.171-178, 2005.

DE BORTOLI, S. A.; MURATA, A. T.; VACARI, A. M.; DE BORTOLI, C. P.; RAMALHO, D. G. Herbivoria em soja: efeito na composição química das folhas e na biologia da lagarta da soja e do percevejo verde pequeno. **Comunicata Scientia**, v.3, p.192-198, 2012.

DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. Pragas da soja. In: _____. **Tecnologia e produção: Soja e Milho 2011/2012**. Rondonópolis: FUNDAÇÃO MT, 2012. p. 155-206.

DE PRIESTER, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Callifora erythrocephala*. **Journal of Ultrastructure Research**, New York v.36, n.5, p. 783-805, set. 1971.

DUFFEY, S. S.; ISMAN, M. B. Inhibition of insect larval growth by phenolics in glandular trichomes oftomato leaves. **Experientia**, v.37, p.575-576, 1980.

EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p.235-264.1986.

EDWARDS, J. P.; WEAVER, R. J. **Endocrine interactions of insect parasites and pathogens**. Trowbridge: The Cromwell Press, 2001. 314 p.

EISEMANN, C. H.; BINNINGTON, K. C. The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. **International Journal for Parasitology**, England, v.24, n.1, p.15-26, fev. 1994.

ERENEL, G.; ERBAS, D.; ARICIOGLU, A. Free radicals and antioxidant systems. **Materia Medica Polona**, v.1, n.85,p.37-43, 1993.

ESAKI, H.; ONOZAKI, H.; MORIMITSU, Y.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Potent antioxidative isoflavones isolate from soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. **Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.4, p.740-746, 1998.

EVANGELISTA, A. **Índices nutricionais e desempenho do bicho- da-seda (*Bombyx mori* L.) alimentado com diferentes cultivares de amoreira**. 1994. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Entomologia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Jaboticabal, Jaboticabal, 91p.

EVANGELISTA, L. C.; LEITE, A. C. R. Midgut ultrastructure of the third instar of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) based on transmission electron microscopy. **Journal of Medical Entomology**, v.40, n.2, p.133-140, 2003.

FALCO, M. C.; MARBACH, P. A. S.; POMPERMAYER, P.; LOPES, F. C. C.; SILVA-FILHO, M. C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genetic Molecular Biology**, v.24, p.113-122, 2001.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da Soja**. Londrina, PR: Embrapa Soja, set. 2007. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 48).

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum, 1997. p.33-59.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; **Stages of soybean development**. Ames: State University of Science and Technology, 1977. 11 p.

FELTON, G. W.; DONATO, K.; DEL VECHIO, R. J.; DUFFEY, S. S. Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, California, v.15, n.12, p.2667-2694, 1989.

FELTON, G. W.; DUFFEY, S. S. Enzymatic antinutritive defenses of the tomato plant against insects. In: HEDIN, P. (Ed). **Naturally Occuring Pest Bioregulators**. Washington: American Chemical Society, p. 166-197, 1991.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review Entomology**, v.47, 501-533, 2002.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; PITTENDRIGH, B.; VAUGHAN, A.; ANTHONY, A. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, n.353, p.1685-1693, 1998.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DARBON, P. J.; LE GOFF, G. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends Genetic**, n.20, p.163-170, 2004.

FIALHO, M. C. Q.; ZANUNCIO, J. C.; NEVES, C. A.; RAMALHO, F. S.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v.102, n.1, p.119-127, 2009.

FISCHOFF, D. A.; BOWDISH, K. S.; PERLAK, F. J.; MARRONE, G. P.; McCORMICK, S. M.; NIEDERMEYER, J. G.; DEAN, D. A.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E. J.; ROCHESTER, D. E.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Biotechnology**, v.5, p.808-813, 1987.

FLIPSEN, J. T. M.; MARTENS, J. W. M.; VAN OERS, M. M.; VLAK, J. M.; VAN LENT, J. W. M. Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. **Virology**, New York v.208, p.328-335, 1995.

FORD, B. J.; STRAYER, J. R.; REID, J.; BLOUNT, V. N.; RIDDLE, T. C. **The literature of arthropods associated with soybeans a bibliography of the velvetbean cartepillar**

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) Urbana: Illinois. Natural History Survival, v. 10, 1975.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plantas μ -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: structure, function and potential for crop protection. **European Journal Biochemistry** v.269, p.397-412, 2002.

FRANÇA, A. A. P.; DESSAUNE, S. N.; SERRÃO, J. E.; NEVES, C. A. The regenerative cell in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini): a comparative study of workers and queens. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 23, p. 401-404, 2006.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. Glyphosate: A unique global herbicide. ACS Monograph 189; **American Chemical Society**, Whashington, DC, 1997.

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

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINE, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v.10.

GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B.; CORSO, I. C.; FERREIRA, B. S. C.; VILLAS BOAS, G. L.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R. et al. **Manejo de pragas da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSO, 1981. 44 p.

GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B.; CORSO, I. C.; FERREIRA, B. S. C.; VILLAS BOAS, G. L.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R. **Manejo de pragas da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSO, 1988. 44 p.

GAZZONI, D. L.; TUTIDA, F. Efeito de genótipos resistentes e suscetíveis sobre a biologia da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n.7, p.673-681, jun./jul. 1996.

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

GAZZONI, D. L.; YORINORI, J. T. **Manual de identificação de pragas e doenças da soja**. Brasília: EMBRAPA, 1995, 128p.

GEIER, P. W. Management of insect pests. **Annual Review of Entomology**, v. 11, p. 471-490. 1966.

GIOLO, S.R. **Introdução à análise de dados categóricos com aplicações**. Material Didático, 2012. 190p.

GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Eds.) **The biology of baculoviruses**, Boca Raton: CRC, 1986. v.1.

- GROVER, A.; SAHI, C.; SANAN, N.; GROVER, A. Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. **Plant Science**, v.143, p.101-111, maio, 1999.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os insetos um resumo de entomologia**. 3ed. São Paulo: Roca, 2007.
- HAKIM, R. S.; BALDWIN, K. M.; LOEB, M. The role of the stem cells in midgut growth and regeneration. **In Vitro Cell Development Biology Animal**, v.37, n. 6, p.338-342, 2001.
- HARBONE, J. B. Flavonoid pigments. In: ROSENTHAL, G. A.; BEREMBAUM, M. R. (Eds.). **Herbivores and their interaction with secondary metabolites**. London: Academic Press, 1991, p.389-429.
- HARPER, M. S.; GRANADOS, R. R. Peritrophic membrane structure and formation of larval *Trichoplusia nii* with an investigation on the secretion patterns of a PM mucin. **Tissue & Cell**, Oxford, v.31, n.2, p.202-211, maio, 1999.
- HARPER, M. S.; HOPINKS, T. L. Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). **Tissue & Cell**, Ouxford, v.29, n.2, p.463-475, ago. 1997.
- HARUTA, M.; MAJOR, J. J.; CRISTOPHER, M. E.; PATTON, J. J.; CONSTABELL, C. P. A kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michsc.: cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, v.46, p. 347-359, 2001.
- HATCHETT, J. H.; BELAND, G. L.; HARTWING, E. E. Leaf feeding resistance to bollworm and tobacco budworm in three soybean plant introductions. **Crop Science**, Stanford, v.16, p.277-280, 1976.
- HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, n.30, p. 1009-1015, 2000.
- HERBES, K.; SONNEWALD, U. Production of new /modified proteins in transgenic plant. **Plant biotechnology**, v.10, p. 163-168, 1999.
- HERZOG, D. C.; TODD, J. H. Sampling velvetbean carterpillar on soybean. In: KOGAN, M.; HERZOG, D. C. (Ed.). **Sampling methods in soybean entomology**. New York, Springer-Verlag, p. 107-140, 1980.
- HIRAI, K. A simple artificial diet for mass rearing of the armyworm *Leucania separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology** 11: 278-183, 1976.
- HOCK, G.; PILARSKA, D. K.; DOBART, N. Effect of midgut infection with the microsporidium *Endoreciculatus schubergi* on carbohydrate and lipid levels in *Lymantria dispar* larvae. **Journal Pest Science**, v.82, p.351-356, 2009.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. Dissertation (Doutorado em Botânica) - 165 p. The University of Reading, Reading.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B.; MOSCARDI, F. **Criação Massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 1985, 23p.

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). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p. 513-519, abr. 1994.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CÔRREA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2000.

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

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

HOMRICH, M. S.; PASSAGLIA, L. M. P.; PEREIRA, J. F.; BERTAGNOLLI, P. F.; PASQUALI, G.; ZAIDI, M. A.; ALTOSAAR, I.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified *Cry1Ac* endotoxin. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto; São Paulo, v.31, n.2, p.522-531. 2008.

HONGY, Z.; ZINIU, Y.; WANGXI, D. Composition and ecological distribution of Cry protein and their genotypes os *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China.. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.76, p.191-197, out. 2000.

HOY, M. A. Parasitoids and predators in management of arthropod pests. In: METCALF, R. L.; LUCKMAN, W. H. (Ed.). **Introduction to insect pest management**. New York: John Wiley and Sons, 1976. p. 129-198.

HUNTER-FUJITA, E. R.; ENTWISTLE, F. P.; EVANS, H. F.; CROOK, N. E. (Ed.). **Insect viruses and pest management**. New York: John Wiley, 1998. p. 632.

ISMAN, M. B.; DUFFEY, S. S. Toxicity of tomato phenolic compounds to the fruitworm, *Heliolhis zea*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.31, p.370-376, 1982.

IWANAGA, T.; FUGITA, T.; NISHIITSUTSUJI-UWO, J.; ENDO, Y. Immunohistochemical demonstration of PP⁺, somatostatin-enteroglucagon and VIP⁺ like immunoreactivities in the cock-roach midgut. **Biomedical Research**, Japan, v.2, p.202-207, 1981.

JORDÃO, B. P.; CAPELLA, A. N.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C. Nature of the anchors of membrane-bournd amino peptidase, amylase, trypsin a secretory mechanism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. **Journal of Insect Physiology**. v.45, p. 29-37, 1999.

JOUANIN, L.; BOTTINO-BONADÉ, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v.131, n.1, p.1-11, jan.1998.

KARBAN, R.; AGRAWAL, A.A. Herbivore offense. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.33, p.641-664, 2002.

KAWANISHI, C. Y.; SUMMERS, M. D.; STOLTZ, D. B.; ARNOTT, H. J. Entry of insect virus *in vivo* by fusion of viral envelope and microvilli membrane. **Journal of Invertebrate Pathology**, Netherlands, v.20, p.104-108, jul. 1972.

KAKAMAND, F. A. K. H.; MAHAMOUND, T. T.; AMIN, A. B. M. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. **Journal Dohuk University**, Kurdistan, v.11, n.1, p.144-151, maio 2008.

KENNEDY, J. S. The motivation of integrated control. **Integrated Pest Control**, v. 4, p. 492-499, 1967.

KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. Plant responses to herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.299-328, 2002.

KHAN, M. R.; FORD, J. B. Studies on digestive enzyme production and its relationship to the cytology of the midgut epithelium in *Dysdercus fasciatus* Sign. (Hemiptera, Pyrrhocoridae). **Journal Insect Physiology**, v.8, p.597-608, 1962.

KILBY, B. A. Intermediary metabolism and the insect fat body. In: GOODWIN, T. W. **Aspects of Insects Biochemistry**. New York: Academic Press, 1965, p.39-48.

KLIEBENSTEIN, D. J., KROYMANN, J.; BROWN, P.; FIGUTH, A.; PEDERSEN, D.; GERSHENZON, J.; MITCHELL-OLDS, T. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. **Plant Physiology**, v.126, p. 8811-8825, 2001.

KLOCKE, J. A.; KUBO, I. Defense of plants through regulation of insect feeding behavior. **Florida Entomologist**, v.74, p.18-22, 1991.

KOGAN, M. Plant resistance in pest management. In: METCALF, R. L.; LUCKMAN, W. H. (Ed.). **Introduction to insect pest management**. New York: John Wiley and Sons, 1976. p. 35-72.

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

KOGAN, M.; HERGZOG, D. C. **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer, 1980.

KOGAN, M. ORTMAN, E. E. Antixenosis a new term proposed to replace Painter's "Non-preference" modality of resistance. **Bulletin of the Entomological Society America**, Lanham, v.24, p.175-176, 1978.

KRAMER, C. Y. Extension of multiple range test to group means with unequal numbers of replications. **Biometrics**, v.12, p. 307-310, 1956.

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

LANE, N. J.; DALLAI, R.; ASHHURST, D. E. Structural macromolecules of the cell membranes and the extracellular matrices of the insect midgut, In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (Eds.) **Biology of the Insect Midgut**. Londres: Chapman & Hall, 1996. p.115-150.

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

LEE, S.J.; AHN, J.K.; KIM, S.H.; KIM, J.T.; HAN, S.J.; JUNG, M.Y.; CHUNG, M. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.11, p. 3382-3389, 2003.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **Biology of insect midgut**. Chapman and Hall: London, 1996.

LEPPLA, C. N.; ASHLEY, T.R.; GUY, R. H.; BUTLER, G. D. Laboratory life history of the velvetbean caterpillar. **Annals of the Entomological Society of America**, 70, p.66-72, 1977.

LEVY, S. M. **Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovírus (*AgMNPV*): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio**. 2005. Tese (Doutorado – Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Botucatu. Botucatu, 172p.

LEVY, S. M.; FALLEIROS, A. M. F.; BASSO, N. A.; MOSCARDI, F.; GERGÓRIO, E. A. Morfologia do intestino médio de *Anticarsia gemmatilis*, susceptível e resistente ao vírus da poliedrose nuclear (*AgMNPV*), em larvas controle e infectadas pelo vírus. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4, 2005, Recife. **Resumos...** Recife: FIOCRUZ, 2005. p.188.

LEVY, S. M.; FALLEIROS, A. M. F.; GREGÓRIO, E. A.; ARREBOLA, N. R.; TOLEDO, L. A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v.64, n. 3b, p.1-6, ago. 2004.

LEVY, S. M.; MOSCARDI, F.; FALLEIROS, A. M. F.; SILVA, R. J.; GREGÓRIO, E. A. A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (*AgMNPV*). **Journal of Invertebrate Pathology**, Netherlands, v.101, n.1, p.17-22, abr. 2009.

LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review Entomology**, n.52, p.231-253, 2007.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; OLIVEIRA, M. G. A.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; GOMES, S. M.; SEIXAS FILHO, J. T. Determinação da atividade de lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina. **Revista de Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 626-631, jul./set. 1999.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LIMA, L. R. P.; LEÃO, M. A.; LIMA, E. Q. Efeito de diferentes doses de rutina sobre as concentrações de albumina, creatina, uréia e ácido úrico no soro de coelhos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 86, n.1, p. 35-38, jan. 2005.

MACRAE, T. C.; BAUR, M. E.; BOETHEL, D. J.; FITZPATRICK, B. J.; GAO, A. G.; GAMUNDI, J. C.; HARRISON, L. A.; KABUYE, V. T.; McPHERSON, R. M.; MIKLOS, J. A.; PARADISE, M. S.; TOEDEBUSCH, A. S.; VIEGAS, A. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* for control Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v.98, n.2, p.577-587, abr. 2005.

MADDOX, J. V. Insect pathogens as biological control agents. In: METCALF, R. L.; LUCKMAN, W. H. (Ed.). **Introduction to Insect Pest Management**. New York: John Wiley and Sons, 1976. p. 199-244.

MARTINS, G. F.; NEVES, C. A.; CAMPOS, L. A.; SERRÃO, J. E. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. **Micron**, v.37, p.161-168, 2006.

MARTOJA, R.; BALLAN-DUFRANÇAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: KING, R. C.; AKAI, H. (Eds.). **Insect Ultrastructure**, New York: Plenum Press, 1984, v.2, p.119-261.

MASON, L. J.; JOHNSON, S. J.; WOODRING, J. P. Influence of carbohydrate deprivation and tethered flight on stored lipid, fecundity, and survivorship of the soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v.13, p.18-24, 1989.

MATHENGE, E. M.; GIMNING, J. E.; KOLCZAK, M.; OMBOK, M.; IRUNGU, L. W.; HAWLEY, W. A. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. **Journal Medical Entomology**, v.38, p.531- 536, 2001.

MBOGO, C. N.; BAYA, N. M.; OFULLA, A. V.; GITHURE, J. I.; SNOW, R. W. The impact of permethrin- impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. **Medical Veterinary Entomology**, v.10, p.251-259, 1996

MENEGUIM, A. M.; LUSTRI, C.; OLIVEIRA, D. D.; YADA, I. F. U.; PASINI, A. Caracterização bromatológica de cultivares de amoreira, *Morus* spp., e determinação dos índices nutricionais de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.39, n.4, p.506-512, 2010.

MENESES DA SILVA, E. L.; ROBLLOT, F.; MAHUTEAU, J.; CAVÉ, A. Coriadienin, the first annonaceous acetogenin with two double isolated from *Annona coriacea*. **Journal of Natural Products**. v.59, p.528-530, 1996.

METCALF, R. L. Insecticides in pest management. In: METCALF, R. L.; LUCKMAN, W. H. (Ed.). **Introduction to Insect Pest Management**. New York: John Wiley and Sons, 1976. p. 245-314.

MIHSFELDT, L. H.;PARRA, J. R. P. Biologia de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) em dieta artificial. **Scientia Agrícola**, v.56, p.769-776, 1999.

- MILANI, R. Genetical aspects of insecticide resistance. **Bull World Health Organ.** p.77-87, 1963.
- MOFETT, F.; KOCH, A. Electrophysiology of K⁺ transport by midgut epithelium of Lepidopteran insect larvae. **The Journal of Experimental Biology**, Londres, v.198, n.10, p.2115-2125, out. 1995.
- MONQUEIRO; P. A.; CRISTOFFOLETI, P. J.; OSUNA, M. D.; De PRADO, R. A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, v.22, n.3, p.445-451, 2004.
- MOSCARDI, F. **Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis***. Londrina, PR: Embrapa Soja, 1983. 21p.
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus para controle da lagarta da soja. In: ALVES, S. B.(Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p.188-202.
- MOSCARDI, F.; BARFIELD, C. S.; ALLEN, G. E. Consumption and development of velvetbean caterpillar as influenced by soybean phenology. **Environmental Entomology**, v. 10, p. 880-884, 1981.
- MOSCARDI, F.; CARVALHO, R. C. Z. Consumo e utilização de soja por *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) infectada, em diferentes estádios larvais, por seu vírus de poliedrose nuclear. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.22, n.2, p.267-280, jun.1993.
- MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. Biological control of soybean caterpillars. In: World Soybean Research Conference, 3., Ames. **Proceedings...** Boulder: Westview, 1985. p. 703-711.
- MOSCARDI, F.; SOUZA, M.L. Baculovirus para o controle de pragas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Londrina, n.24, p.22-29, jan./fev. 2002.
- MURPHY, P. A. Phytoestrogen content of processed soybean products. **Food Technology**, v.36, n.1, p.60-64, 1982.
- NAIM, M.; GESTETNER, B.; ZILKAH, S.; BIRK, Y.; BONDI, A. Soybean isoflavones characterization, determination, and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.22,n.5, p. 806-810, 1974.
- NAIM, M.; GESTETNER, BONDI, A. B.; BIRK, Y. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.24, n.6, p.1174-1177, 1976.
- NEGREIRO, M. C. C.; ANDRADE, F. G.; FALLEIROS, A. M. F. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina**, Londrina, v.25, n.4, p.293-308, out./dez., 2004.
- NELSON, D. L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2006.

- NIJHOUT, H. F. **Insect hormones**. Princeton: Princeton University Press, 1998. 267p.
- OKUDA, K.; ALMEIDA, F.; MORTARA, R. A.; KRIEGER, H.; MARINOTTI, O.; BIJOVSKY, A. T. Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, v.53, p.1307-1315, 2007.
- OLIVEIRA, L. J.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MAZZARIN, R. M. Aspectos biológicos e nutricionais de *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) em diversos genótipos de soja. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.22, p.547-552, 1993.
- OMYILAGHA, J. C.; GROTEWOLD, E. The biology and structural distribution of surface flavonoids. **Recent Research developments in plant science**, Columbus Ohio, v.2, p. 53-71, 2004.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, K. L.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. Salt Lake City, UT:W.H. Freeman, 1992.
- PAINTER, R. H. **Insect resistance in crop plants**. New York, 1951.
- PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Bioecologia e nutrição de insetos-base para manejo integrado de pragas**. Brasília: Embrapa, 2009.
- PARENTE, R. C. P. **Aspectos da Análise de Resíduos**. 1984. (Mestrado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 139p.
- PARRA, J. R. P. Consumo e utilização de alimentos por insetos In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.) **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991, p.9-66.
- PARROT, W. A.; HOFFMAN, L. M.; HILDEBRAND, D. F.; WILLIAMS, E. G.; COLLINS, G. B. Recovery of primary transformants of soybean. **Plant Cell Reports**, v. 7, p.615-617, mar.,1994.
- PATEL, N.; HAYES, T.; COAST, G. Evidence for the hormonal function of a CRF-related diuretic peptide (*Locusta*-DP) in *Locusta migratoria*. **The Journal of Experimental Biology**, London, v.198, n. 3, p.793-804, mar. 1995.
- PEARSE, A. G. E. (EDS.) **Histochemistry: theoretical and applied**. Edinburgh: Churchill Livingstone, v.1/2, 1985, 1055p.
- PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use *Bt* genes in crops. **Trends Biotechnology**, v.15, p.173-177, maio, 1997.
- PERRY, T.; BATTHERHAM, P.; DABORN, P. J. The biology of insecticidal activity and resistance. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, n.41,p.411-422, 2011.
- PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Cambridge, v.71, n.2, p. 255-281, 2007.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.86, n.1, p.23-29, 2006.

PINHEIRO, D. O.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GREGÓRIO, E. A. Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatrea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae. **Neotropical Entomology**, v.37, n.4, p.413-419, 2008.

PINHEIRO, D. O.; GREGÓRIO, E. A. Ultrastructure of the columnar epithelial cell along the midgut of the *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. **Acta Microscopia**. v.12, n.1, p. 27-30, 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. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Entomologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 152p.

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

PRATT, G. E.; FARNSWORTH, D. E.; SIEGEL, N. R.; FEYEREISEN, R. Identification of allatostatin from adult *Diploptera punctata*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Estados Unidos, v.163, n.3, p. 1243-1247, set. 1989.

PUROHIT, K. M.; KUMAR, P. Influence of various agronomical practices in India on the leaf quality in mulberry, a review. **Sericologia**, v.36, p.27-41, 1996.

RAUBENHEIMER, D.; SIMPSON. Analysis of covariance: an alternative to nutritional indices. **Entomologia Experimentalis Applicata** n.62, p.221-231, 1992.

REESE, J. C. Interactions of allelochemicals with nutrients in herbivore food. In: ROSENTHAL, G. A.; JANZEN, D. H. (Eds) **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. New York: Academic Press, 1979, p.309-330.

REZENDE, J. A. M.; ROSSETO, C. J.; MIRANDA, M. A. C. Comportamento de populações paternas de F1 de soja em relação a *Colapsis* sp. e *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824). **Bragantia**, Campinas, v.39, p.15-20, 1980.

REY, D.; PAUTOU, M. P.; MEYRAN, J. C. Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic diptera larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.173-181, 1999.

RHARRABE, K.; BAKRIM, A.; GHAILANI, N.; SAYAH, F. Bioinsecticidal effect of hamaline on *Plodia interpunctella* development (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.89, p.137-145, 2007.

RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. Morphological basis of digestion in insects. **Acta Microscopia**, v.6, p.71-73, 1997.

RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**, v.32, n.1, p.71-110, 1993.

RICHARDS, O. W.; DAVIES, R. G. **Imms' General Textbook of Entomology**. Londres: Chapman & Hall, 1994.

RITTER, L. Report of a panel on the relationship between public exposure to pesticides and cancer. **Cancer**, v.80, p.2019-33, 1997.

ROCHA, L.L.V.; NEVES, C.A.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Digestive cells in the midgut of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in different starvation periods. **Comptes Rendus Biologies**, v.333, n.5, p. 405-415, 2010.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de Herbicidas**. 5 ed. Londrina: IAPAR, 2005. 592p.

ROST-ROSZKOWSKA, M. M. Degeneration of the midgut epithelium in *Allacma fusca* L. (Insecta, Collembola, Symphypleona): apoptosis and necrosis. **Zoology Science**. v. 25, p.753-759, 2008.

ROST-ROSZKOWSKA, M. M.; VILIMOVA, J.; CHAJEC, L. Ultrastructure of two types of endocrine cells in the midgut epithelium of *Spodoptera exiqua* Hübner, 1808 (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae). **Zoologia Poloniae**, v.53, n.1-4, p.27-35, 2010.

ROSSETO, C. J.; MIRANDA, M. A. C. Preferência de alimentação de adultos de *Diabrotica speciosa* (Germar) e *Cerotoma arcuata* (Oliv.) em variedades de soja. **Bragantia**, Campinas, v.40, n.1, p.179-183, jan. 1981.

ROSSETO, C. J.; GALLO, P. B.; RAZERA, L. F.; BORTOLETTO, N.; IGHE, T.; MEDINA, P. F.; TISSELLI-FILHO, O.; AQUILERA, V.; VEIGA, R. F. A.; PINHEIRO, J. B. Mechanisms of resistance to stink bug complex in the soybean cultivar IAC-100. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.24, n.3, p.517-522, 1995.

RUESINK, W. G.; KOGAN, M. The quantitative basis of pest management: sampling and measuring. In: METCALF, R. L.; LUCKMAN, W. H. (Ed.). **Introduction to insect pest management**. New York: John Wiley and Sons, 1994. p. 355-392.

RUIZ-LARREA, M. B.; MOHAN, A. R.; PAGANGA, G.; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. P.; RICE-EVANS, C. A. Antioxidant activity of phytoesrogenic isoflavones. **Free Radical Research**, v.26, n.1, p.63-70, 1997.

RYERSE, J. S.; PURSELL, J. P.; SAMMON, R. D.; LAVRIX, P. B. Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. **Tissue & Cell**. v. 24, p. 751-771, 1992.

SALVADOR, M. C. **Efeito de genótipos de soja e flavonoides na biologia e no intestino médio de *Anticarsia gemmatilis***. 2008. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal. 116p.

SALVADORI, J. R.; PARRA, J. R. P. Seleção de dietas artificiais para *Pseudaletia sequax* (Lep.: Noctuidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, p.1701-171, 1990.

- SANFORD, J. C. The biolistic process. **Trends Biotechnology**, v.6, p. 299-302, dec.1988.
- SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. **Plantarum Physiology**, v.79, n.1, p.206-209, abr. 1990.
- SANTOS, C. D.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*) Ultrastructure, fluid fluxes, the secretory activity in relation to the organization of digestion. **Cell and Tissue Research**.v. 237, p. 565-574, 1984.
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics: version 8.2.6** Cary, 2001.
- SCHNEPF, E.; CRIKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.775-806, set. 1998.
- SCHOOFS, L.; VAN DEN BROECK, J.; De LOOF, A. The myotropic peptides of *Locusta migratoria*: structures, distribution, functions and receptors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Inglaterra, v.23, n.8, p.859-881, dez., 1993.
- SCRIBER, J. M.; SLANSKY JÚNIOR. R. F. The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology**, v.26, p.183-211, 1981.
- SCUDELER, E. L.; **Efeito do óleo de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no intestino médio de *Ceraechnys claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae): Estudo citoquímico, imunocitoquímico e ultraestrutural**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 228p.
- SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Gut structures in adult workers of necrophorus neotropical stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Ent Gen**. v. 19, p. 261-265, 1995.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n.1, p.67-103, 1992.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika.**, v.52, n.3/4, p. 591-611, 1965.
- SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; ALBINO, L. F. T.; ALMDEIDA, M. R.; MORAES, G. H. K.; PINTO, J. G. . Efeito hipolipidêmico dos flavonoides naringina e rutina. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.51, n.3, p. 258-264, abr. 2001.
- SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LEÃO, M. A. Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, Ribeirão preto, v.35, p. 127-133, abr./jun. 2002.
- SILVA, H. H. G. S.; SILVA, I. G.; SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES FILHO, E.; ELIAS, C. N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.37, n.5, p.396-399, set./out., 2004.

- SOSA-GÓMEZ, D. R. Controle biológico da lagarta-da-soja com *Baculovirus anticarsia*. In: _____ **PRÓ-GUAÍBA**: Subprograma Sistemas de Manejo e Controle da Contaminação por Agrotóxicos. Porto Alegre: **EMATER-RS**, 1995, p.27-35.
- SOSA-GÓMEZ, D. R.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, L. J.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; CORSO, I. C.; MOSCARDI, F. **Manual de Identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2006.
- SOUSA, M. E. C.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A.; SIQUEIRA, H.A.; SANTOS, F. A.; ALVES, L. C. Ultrastructure of the *Alabama argilacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. **Micron**, v.40, p.743-749, 2009.
- SRIVASTAVA, R.; SHUKLA, Y.N.; KUMAR, S. Recent advances in the chemistry of insect antifeedants. **Journal of Medical and Aromatic Plant Sciences**, v.21, p.59-76, 1999.
- STAMP, N. E.; SKROBOLA, K. L. Failure to avoid rutin diets results in altered food utilization and reduced growth rate of *Manduca sexta* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 68, n.2, p.127-142, ago. 1993.
- STERN, V. M.; SMITH, R. F.; VAN DE BOSCH, R.; HAGEN, K. S. The integrated control concept. **Hilgardia**, v. 29, p.81-101, 1959.
- STEWART, Jr., C. N.; ADANG, M. J.; ALL, J. N.; BOERMA, H. R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PARROT, W. A. Genetic transformation, recovery and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. **Plant Physiology**, v.112, p.121-129, 1996.
- STONE, B. F.; BROWN, A. W. Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied. **Bull World Health Organ**, n.40, p.401-408, 1969.
- TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 199-202, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- TANADA, Y.; KAYA, H. K. **Insect Pathology**. New York: Academic, 1993.
- TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.47, n. 2, p.47-61, jun. 2001.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; A digestão dos insetos. **Ciência Hoje**, v.12, p.28-38, 1991.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdã, v.109B, p.1-62, n.1, jan. 1996.
- TETTAMANTI, G.; GRIMALDI, A.; CASARTELLI, M.; AMBROSETTI, E.; PONTI, B.; CONGIU, T.; FERRARESE, R.; RIVAS-PENA, M. L.; PENNACHIO, F.; EGUILEOR, M. Programmed cell death and stem cell differentiation responsible for midgut replacement in

Heliothis virescens during prepupal instar. **Cell and Tissue Research**, v.330, p. 345-359, 2007.

THOMPSON, M.; SHOTKOSKI, F.; FFRENCH-CONSTANT, R. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow-fever mosquito *Aedes aegypti* - conservation of the gene and resistance-associated mutation with *Drosophila*. **FEBS Lett**, v.325, p.187-190, 1993.

TIFFIN, P.; GAUT, B. S. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip1 in *Zea* and related general. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, p. 2092-2101, 2001.

TOLEDO, T.; NAGEM, T. J.; MATOS, R.L.; ARAÚJO, A. L.; QUEIROGA, E. L.; SILVA, R. R.; SILVA, E.; FERREIRA, D. B. Effects of different rutin dosages on chloride, calcium and phosphorus levels serum of rabbits. **Revista Chilena de Nutrición**, Santiago, v.30,n.3, p.263-270, dez. 2003.

TRICK, H. N.; PUESCHEL C. M. Cytochemistry of pit plugs in *Bossiella californica* (Corallinales, Rhodophyta). **Phycologia**, v.29, n.403-409, 1990.

TUKEY, J. W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, v.5, p.232-242, 1949.

VALICENTE, F. H. Controle biológico de pragas com entomopatógenos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.251, p.48-55, jul/ago. 2009.

VALLADARES-INGLIS, M. C. C.; SOUZA, M. T.; SHILER, W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, L. S.; AZEVEDO, I. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998.v.1, p.208-217.

VALLE, G. E.; LOURENÇÃO, A. L. Resistência de genótipos de soja a *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, v.31, n.1, p.285-295, abr./jun. 2002.

VAN DEN BOSCH, R. Biological control of insects. **Annual Review Ecological Systems**, v. 2, p. 45-66, 1971.

VERNETTI, F. J. Genética da soja: características qualitativas. In: VERNETTI, F. J. (Ed.) **Soja: genética e melhoramento**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. p.93-124.

VOLKMAN, L.E. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts. **Advances in Virus Research**, Galveston, v.48, p.313-348, 1997.

WALDBAUER, G. P. The consumption, digestion and utilization of solanaceous and non-solanaceous plants by larvae of the tobacco hornworm, *Protoparce sexta* (Johan.) (Lepidoptera: Sphingidae). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 7: 253-269. 1964.

WALDBAUER, G. P. The consumption and utilization of food by insect. **Advances in Insect Physiology**, v.15, p.229-288, 1968.

WALDEN, R.; WINGENDER, R. Gene-transfer and plant-regeneration (techniques). **Trends Biotechnology**, v.13, p. 324-331, set. 1995.

WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; CUNHA, F. M.; COSTA, M. K. C. M.; VEIGA, A. F. L. S.; OLIVEIRA, J. V. Histological description of the midgut and the pyloric valve of the *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). **Brazilian Journal Biology**, p.1045-1049, 2006.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.47, n.2, p.110-118, jun. 2001.

WATSON, J. R. Life-history of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner. **Journal of Economic Entomology**, New York, v. 9, p. 521-528, 1916.

WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B. Isoflavonoids, In: **Methods in Plant Biochemistry**. Academic Press Limited, 1989.

WILSON, T. G. YERUSHALMI, Y.; DONNEL, D. M.; RESTIFO, L. L. Interaction between hormonal signaling pathways in *Drosophila melanogaster* revealed by genetic interaction between Methoprene-tolerant and Broad-Complex. **Genetics**, v.172, p.253-64, 2006.

WOOD, A. R.; LEHANE, M. J. Relative contributions of apocrine and eccrine secretion to digestive enzyme release from midgut cells of *Stomoxys calcitrans* (Insecta: Diptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 37, p. 161-166, 1991.

WOODHEAD, A. T.; STAY, B.; SEIDEL, S. L.; KHAN, M.A.; TOBE, S. S. Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Iowa City, v.86, n.15, p.5997-6001, ago. 1989.

YUAN, L.; KNAUF, V. C. Modification of plants componentes. **Current Opinion in Biotechnology**, v.7, p.227-233, 1997.

ZABLOTOWICZ; R. M.; REDDY, K. N. Impact of glyphosate and *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis; with glyposate-resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal Enviromental Quality**, v.33, n.3, p.825-831, maio, 2004.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A.; SILVA JUNIOR, P. **Sistema de Análise Estatística – SANEST**, Pelotas: UFPEL, 1982.