

FLÁVIA AUGUSTA CLOCLET DA SILVA

**FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS MEDIADORES DA OVIPOSIÇÃO DE
PENTATOMÍDEOS FITÓFAGOS EM SUBSTRATOS ARTIFICIAIS**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de “Doutor em Ciências” no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Entomologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Antônio Ricardo Panizzi

Curitiba – PR

2009

Aos meus pais, Neno e Lica.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos desafios diários que justificam plenamente a vida.

Ao Dr. Antônio Ricardo Panizzi, meu orientador e amigo, a quem tenho grande admiração pelo exemplo de dedicação à Entomologia.

Ao programa de Pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal do Paraná, a todo seu corpo docente, em especial às professoras Sonia Noemberg Lazzari e Lúcia Massutti de Almeida, pelo incentivo e sugestões valiosas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), especialmente a equipe de Entomologia pela amizade e colaboração.

Aos pesquisadores da Embrapa Cenargen: Dr. Miguel Borges, Dra. Maria Carolina de Moraes e Dr. Raúl Laumann, pela colaboração direta na elaboração deste trabalho e pela hospitalidade em Brasília.

Aos pesquisadores do Laboratório de Melhoramento Genético da Embrapa Soja, Dra. Mercedes Carrão-Panizzi e José Marcos Mandarino e ao laboratorista Rodrigo S. Leite, pela colaboração nas análises químicas.

Aos funcionários do Laboratório de Microanálise da Universidade Estadual de Londrina, em especial à professora Célia Guadalupe Andrade.

Às amigas de sempre: Ana Paula Vidotto, Andressa Murata, Janaína Rigonato e Karina Morelli, que apesar da distância sempre se fizeram presentes em minha vida.

Aos amigos de laboratório: Fábio Siqueira, Rogério Depieri, Fabiane Cunha e Talita M. Alexandre pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao laboratorista e amigo Jovenil J. da Silva, pelo apoio e grande exemplo de generosidade.

Aos meus pais Neno e Lica, à minha irmã Ana Rosa e meu sobrinho João Fernando, por representarem em minha vida, a verdadeira essência do amor.

À minha segunda família: Lúcia, Wagner, Luciana e Helô pela presença fraternal e pelo apoio em todos os momentos da minha vida “londrinense”.

Agradeço especialmente ao Fábio Coltro (Fá), pela amizade, paciência, amor incondicional e principalmente, por acreditar que este trabalho era possível.

Ao meu “filho peludo”, Teodoro, pelos momentos de descontração em meio às preocupações com a elaboração da tese.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1.1. Introdução	1
1.2. Objetivos	5
1.3. Literatura Citada	7

CAPÍTULO 2

Avaliação de substratos artificiais de oviposição para pentatomídeos fitófagos

2.1. Introdução	11
2.2. Material e métodos	13
2.3. Resultados e discussão	17
2.4. Literatura citada	30

CAPÍTULO 3

Oviposição de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) em substratos artificial e natural

3.1. Introdução	34
3.2. Material e métodos	35
3.3. Resultados e discussão	38
3.4. Literatura citada	44

CAPÍTULO 4

Análise do perfil químico de vagens verdes de soja da cultivar BRS 267

4.1. Introdução	48
4.2. Material e métodos	49
4.3. Resultados e discussão	56
4.4. Literatura citada	69
4.5. Anexos	79

CAPÍTULO 5

Resposta olfativa e oviposição de *Euschistus heros* em substrato artificial tratado com compostos químicos extraídos de vagens de soja da cultivar BRS 267

5.1. Introdução	81
5.2. Material e métodos	82
5.3. Resultados e discussão	89
5.4. Literatura citada	104

CAPÍTULO 6**Comparação do perfil químico e análise de preferência alimentar e de oviposição de *Euschistus heros* em vagens verdes de soja de diferentes cultivares**

6.1. Introdução	112
6.2. Material e métodos	114
6.3. Resultados e discussão	117
6.4. Literatura citada	131
CONSIDERAÇÕES FINAIS	138

RESUMO

Visando aprimorar a técnica de criação de pentatomídeos fitófagos em laboratório foram avaliados diferentes substratos artificiais para oviposição, identificando as características físicas e químicas envolvidas neste comportamento. Primeiramente, avaliou-se o algodão hidrófilo como substrato artificial de oviposição para os pentatomídeos: *Chinavia impicticornis* (Stål.), *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Edessa meditabunda* (F.), *Euschistus heros* (F.), *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildinii* (West.) e *Thyanta perditor* (F.). Cinco espécies mostraram preferência em ovipositar no algodão, apenas *E. meditabunda* e *N. viridula* apresentaram preferência pela caixa de plástico. Ao se comparar a oviposição de *E. heros* no algodão, no tule e no *voil*, observou-se preferência pelo algodão (85,2% de posturas) seguido pelo tule (13,7%) e o *voil* (1,1%). Ao se comparar o algodão com substratos naturais, *E. heros* ovipositou mais no algodão (74,3% posturas) do que em folhas (23,6 %) ou em vagens de soja (0,1%). Pedacos de algodão fixos em planta de soja receberam mais posturas (60%) do que a planta isoladamente (40%) e, em análise de microscopia eletrônica de varredura observou-se que fibras do algodão recobrem os ovos, porém a eclosão não é afetada. Para *P. guildinii* comparou-se o algodão com fio de lã sintética e com barbante de algodão. Obtiveram-se mais posturas no fio de lã (92,3%), indicando que esta espécie prefere superfícies alongadas e com fibras soltas para depositar os ovos. Ao se avaliar o perfil químico de vagens de soja 'BRS 267' buscando identificar compostos químicos condicionantes de oviposição e, que possam ser utilizados em associação com os substratos artificiais selecionados, identificou-se vários compostos voláteis [(*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexen-1-ol, 1-octen-3-ol, tridecano, pentadecano e hexadecano]. Também, açúcares como galactitol, glucopirranose, *D*-galactose, *D*-galactofuranose e isômeros de inositol foram identificados. A concentração total de açúcares no

extrato de vagens foi de 9,9% e de isoflavonas de 128,1 mg/100 g. Em olfatômetro, as fêmeas de *E. heros* responderam positivamente ao extrato de vagens de soja 'BRS 267', bem como às misturas de voláteis extraídos das vagens. Fêmeas aeradas com os voláteis extraídos das vagens de soja e com misturas de voláteis (aldeídos e alcanos) tiveram a oviposição estimulada 24 h após, observando-se redução acentuada após 48 h. Algodão tratado com extrato de vagens recebeu mais posturas (60%) do que a testemunha, ou seja, com metanol puro (40%). Soluções de açúcares e isoflavonas (daidzina, genistina e glicetina) causaram deterrence de oviposição para *E. heros*. Comparou-se o perfil químico de vagens de soja das cultivares BRS 267, BRS 213, BR 16 e IAC-100 e a preferência alimentar e de oviposição de *E. heros* pelas vagens dessas cultivares. As cultivares BRS 267 e BRS 213 liberaram mais voláteis em comparação às demais. A concentração de açúcares foi semelhante entre as cultivares. Níveis maiores de isoflavonas foram observados em 'IAC-100' e 'BR 16'. Fêmeas de *E. heros* apresentaram preferência alimentar e de oviposição pela cultivar BRS 267.

PALAVRAS-CHAVE: Heteroptera, *Glycine max*, comportamento, substrato artificial, oviposição, fitoquímicos.

ABSTRACT

To improve the rearing technique of stink bugs in the laboratory, we evaluated different ovipositing substrates. In addition, we identified physical and chemical traits involved in this behavior. Firstly, we tested commercial cotton balls as oviposition site of the pentatomid species *Chinavia impicticornis* (Stål.), *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Edessa meditabunda* (F.), *Euschistus heros* (F.), *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildinii* (West.) and *Thyanta perditor* (F.). *Chinavia impicticornis*, *D. melacanthus*, *E. heros*, *P. guildinii* and *T. perditor* showed preference to oviposit on cotton balls. *E. meditabunda* and *N. viridula* preferred to lay eggs on plastic boxes. Additionally, we showed that *E. heros* prefer to lay eggs on the cotton balls (85.2%) rather than polyester veil (13.7%) or cheesecloth (1.1%). When we compared cotton balls with natural substrates, *E. heros* showed preference to oviposit on balls (74.3%) compared to leaves (23.6%) or pods of soybean (0.1%). Cotton balls tied to soybean plants received more egg masses (60%) than the entire plants (40%). Although scanning electron microscopy showed cotton fibers surrounding the egg masses, the nymph's eclosion was not affected. *Piezodorus guildinii* preferred to lay eggs on syntetic wool string (92.3%) rather than cotton string, indicating its preference to lay eggs on elongated structures with loose fibers. Finally, we identified chemicals of soybean pods (cv. BRS 267) involved in the oviposition process and used those chemicals in association with the artificial substrates selected. We identified several volatile compounds, such as (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexen-1-ol, 1-octen-3-ol, tridecane, pentadecane and hexadecane. Additionally, we identified sugars as galactitol, glucopirranose, *D*-galactose, *D*-galactofuranose and isomers of inositol. Total sugar concentration on pod extracts was 9.9%, and of isoflavones on pods was 128.1 mg/100g. In olfactometer tests, females of *E. heros* showed positive response to soybean pod extract and to the mixtures of

volatiles. Females exposed for 10 min. to volatiles (aldehydes and alkanes) showed stimulated oviposition after 24 h, which decreased after 48 h. Cotton balls treated with pod extract received more egg masses (60%) than when treated with methanol (40%). Sugar and isoflavone (daidzin, genistin and glycitin) solution caused oviposition deterrence of *E. heros*. Chemical profile of soybean pods of cvs. BRS 267, BRS 213, BR 16 and IAC-100 were compared regarding *E. heros* feeding preference and oviposition. BRS 267 and BRS 213 released more volatiles, sugar concentration among varieties was similar, and isoflavone contents were greater for cvs. IAC-100 and BR 16. *E. heros* females showed feeding and oviposition preferences for cv. BRS 267.

KEY WORDS: Heteroptera, *Glycine max*, behavior, artificial substrates, oviposition, phytochemicals.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por <i>Euschistus heros</i> em substratos artificiais.	21
Tabela 2.2. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por <i>Piezodorus guildinii</i> em substratos artificiais em laboratório.	23
Tabela 2.3. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por <i>Piezodorus guildinii</i> em substratos artificiais em laboratório.	24

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por <i>Euschistus heros</i> em substratos artificial e natural em teste de dupla escolha em laboratório. ...	39
Tabela 3.2. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por <i>Euschistus heros</i> em substratos artificial e natural em teste de múltipla escolha em laboratório.	40

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1. Concentração média dos compostos voláteis obtidos por aeração forçada de vagens de soja (cultivar BRS 267) em estágio R6.	59
Tabela 4.2. Concentração de isoflavonas presentes em sementes de soja <i>in natura</i> , da cultivar BRS 267 (M.C. Carrão-Panizzi não-publicado).	68

CAPÍTULO 5

Tabela 5.1. Extratos químicos avaliados nos ensaios de olfatometria e o número de fêmeas de <i>Euschistus heros</i> avaliadas em cada tratamento.	85
Tabela 5.2. Extratos químicos avaliados nos ensaios de preferência de oviposição e o número de casais de <i>Euschistus heros</i> utilizados em cada tratamento.	87
Tabela 5.3. Comparação das porcentagens de primeira escolha e de residência de fêmeas de <i>Euschistus heros</i> em olfatômetro em “Y”, em resposta aos diferentes voláteis testados.	90
Tabela 5.4. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por <i>Euschistus heros</i> em substrato artificial tratado com diferentes soluções de açúcares (concentração de 0,1 mg/mL).	97
Tabela 5.5. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por <i>Euschistus heros</i> em substrato artificial tratado com diferentes soluções de isoflavonas (concentração de 0,01 mg/mL).	100

CAPÍTULO 6

Tabela 6.1. Concentração média ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) ($\pm$ EP) de compostos voláteis extraídos por aeração forçada de vagens das cultivares de soja BRS 213, BRS 267, BR 16 e IAC-100, em estágio R6.	119
Tabela 6.2. Porcentagem média (mg/100 g) ($\pm$ EP) de açúcares redutores totais presentes em vagens verdes desengorduradas, sementes verdes integrais e desengorduradas de soja, de quatro cultivares.	121
Tabela 6.3. Concentração média (mg/100 g) ($\pm$ EP) de isoflavonas presentes em vagens de soja das cultivares BRS 213, BR 16 e IAC-100, em estágio R6.	125

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 2.1. Oviposição em laboratório entre algodão hidrófilo, papel filtro, gerbox e alimento para sete espécies de percevejos fitófagos. Médias seguidas pela mesma letra dentro dos tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x + 1}$ para análise de comparação. 19
- Figura 2.2. Fêmeas de *Piezodorus guildinii* em posição de pré-oviposição sobre fio de lã sintética de tricô (A); posturas depositadas e detalhe (setas) para as fibras desfiadas do fio de lã (B). 25
- Figura 2.3. Número médio ($\pm$ EP) de posturas de *Piezodorus guildinii* em substratos artificiais em laboratório, distribuídas em diferentes classes de tamanho (ovos/postura). A) Comparação entre fio de lã, barbante e *voil* e B) comparação entre fio de lã e algodão. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) (A). Médias comparadas usando o teste t de Student ($P < 0,05$) (B). 26
- Figura 2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da genitália feminina de *Euschistus heros*. A) Vista ventral das placas da genitália revelando grande quantidade de sensilas (160X); B) Detalhe mostrando sensilas do tipo tricóidea, com base em soquete (setas) (600X). 28
- Figura 2.5. Microscopia eletrônica de varredura de ovos de *Euschistus heros* depositados em algodão e observação de ninfas recém-eclodidas. A) Posturas depositadas justapostas sobre as fibras de algodão e com muitas fibras de algodão ao redor e sobre os ovos (40X); B) Detalhe de fibra de algodão sobre ovo (150X); C) Fibras de algodão fixadas na base do ovo (seta) (150X); D) Ninfas recém eclodidas sobre os ovos (microscópio estereoscópico 10X). 29

CAPÍTULO 3

- Figura 3.1. Porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e porcentagem de eclosão de ninfas de *Euschistus heros* originadas de ovos depositados sobre algodão e planta de soja. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x + 1}$ para análise de comparação. 41
- Figura 3.2. A) Posturas de *Euschistus heros* depositadas sobre algodão hidrófilo e coletadas durante manutenção das colônias em laboratório. B) Posturas retiradas do algodão (com auxílio de pinça) e colocadas em caixa gerbox forrada com papel filtro umedecido. 43

CAPÍTULO 4

- Figura 4.1. Perfil químico das amostras de extrato de vagens verdes de soja 'BRS 267' derivatizadas com MSFTA, obtido por análise em cromatografia gasosa: A) extrato bruto; B) fração de metanol (100%) e C) fração de hexano (100%). 57
- Figura 4.2. Fórmula estrutural de três isômeros de inositol identificados em amostras de extrato de vagens de soja derivatizadas com MSFTA: A) mio-inositol; B) muco-inositol e C) scillo-inositol. 63
- Figura 4.3. Concentração média ($\pm$ EP) de açúcares identificados em extrato de vagens de soja (cultivar BRS 267) derivatizado com MSFTA. 63
- Figura 4.4. Porcentagem média ($\pm$ EP) de açúcares redutores presentes em diferentes amostras de soja R6 (cultivar BRS 267). Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). 64

Figura 4.5. Concentração de isoflavonas presentes em extrato bruto de vagens de soja (cultivar BRS 267). G-DAÍ= daidzina; G-GLY= glicitina; G-GEN= genistina; M-DAÍ= malonil-daidzina; M-GLY= malonil-glicitina, A-DAÍ= acetil-daidzina; M-GEN= malonil genistina; A-GEN= acetil-genistina, DAÍ= daidzeína; GLY= gliciteína e GEN= genisteína, (dados de 1 amostra, sem erro padrão).	66
---	----

CAPÍTULO 5

Figura 5.1. Imagens capturadas por câmera de vídeo durante estudo com <i>Euschistus heros</i> em olfatômetro tipo “Y”. A) Linhas demarcando as áreas contendo os tratamentos e B) Trilha do inseto formada pelo programa Sacan durante o monitoramento (10 minutos).	84
Figura 5.2. Porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por <i>Euschistus heros</i> em substrato artificial tratado com extrato bruto de soja ou metanol puro (controle). Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste t de Student ($P < 0,05$).	93
Figura 5.3. Porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por <i>Euschistus heros</i> em substrato artificial tratado com frações metanólica ou hexânica do extrato bruto de soja ou com hexano e metanol (controles). Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste t de Student ($P < 0,05$).	94
Figura 5.4. Número total de ovos depositados por <i>Euschistus heros</i> 24 e 48 horas após o contato com diferentes compostos voláteis, hexano e água, em olfatômetro.	103

CAPÍTULO 6

Figura 6.1. Concentração média ($\pm$ EP) de voláteis liberados por vagens de cultivares de soja.

Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). 118

Figura 6.2. Concentração média ($\pm$ EP) de isoflavonas presentes em vagens de soja de diferentes

cultivares. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). * Nd = não detectado. 122

Figura 6.3. Tempo médio ($\pm$ EP) de alimentação de fêmeas de *Euschistus heros* em vagens de

diferentes cultivares de soja, em testes com e sem chance de escolha. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). 127

Figura 6.4. Porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas de *Euschistus heros* depositadas em vagens de

diferentes cultivares de soja. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). 130

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1.1. Introdução

Os percevejos pentatomídeos (Heteroptera: Pentatomidae) caracterizam-se por serem pragas importantes de diversas culturas, entre as quais a soja, *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae). Várias espécies têm sido reportadas atacando essa leguminosa, os mais importantes sendo o percevejo verde, *Nezara viridula* (L.), o percevejo-verde-pequeno, *Piezodorus guildinii* (Westwood) e o percevejo marrom, *Euschistus heros* (F.) (Panizzi & Slansky 1985).

Atualmente, a principal forma de controle desses percevejos é através do uso de inseticidas químicos tradicionais, como monocrotophos e endosulfan (Panizzi *et al.* 2000a). Entretanto, tem se observado que esses inseticidas não apresentam a mesma eficiência, devido ao aparecimento de populações de percevejos resistentes (Sosa-Gomez *et al.* 2001). Dessa forma, medidas alternativas de controle têm sido investigadas e utilizadas com sucesso, entre as quais, o controle biológico através do uso de parasitóides de ovos, tendo como principal agente de controle o microhimenóptero *Trissolcus basalis* (Woll.) (Hymenoptera: Scelionidae), capaz de parasitar ovos de diferentes espécies de percevejos da soja (Corrêa-Ferreira 2002). Portanto, para atender aos programas de controle biológico é fundamental a manutenção de colônias de percevejos como fonte contínua de fornecimento de ovos para a multiplicação dos parasitóides em laboratório. Além disso, essas colônias viabilizam o desenvolvimento de pesquisas em entomologia básica e aplicada de

forma contínua, disponibilizando insetos sadios para bioensaios sem depender da ocorrência natural dos percevejos no campo.

Atualmente, a criação massal de percevejos em laboratório é realizada principalmente com dieta natural [vagem verde de feijão, *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae), sementes de amendoim, *Arachis hypogaea*, L. (Fabaceae) e soja] e plantas de soja como substrato para oviposição, porém tal metodologia demanda mão de obra, tempo em excesso e tem custo elevado. Portanto, tem-se buscado utilizar substratos artificiais de oviposição para facilitar o processo de manutenção das colônias de percevejos.

Em criações em laboratório, tem sido observado que os percevejos ovipositam freqüentemente nas paredes teladas das gaiolas, em especial, quando a planta não apresenta boas condições (p.ex., planta senescente). Da mesma forma, ao se criar o percevejo *N. viridula* em laboratório, pedaços de papel toalha suspensos no interior da gaiola servem como substrato de oviposição (Shearer & Jones 1996). Esta mesma espécie pode ovipositar em substratos artificiais que mimetizam folhas de soja, comportando-se exatamente como se estivessem ovipositando em plantas na natureza, isto é, no lado inferior dos folíolos (Panizzi *et al.* 2000b). Observou-se também que tiras de *voil* podem ser utilizadas como substrato para acomodar as posturas de diferentes espécies de pentatomídeos (Bundy & McPherson 2000).

Silva & Panizzi (2007) demonstraram que algodão comercial seco pode ser usado como substrato de oviposição para várias espécies de pentatomídeos e, recentemente, observou-se que o percevejo-verde-pequeno, *P. guildinii* oviposita em fio de lã sintética colocado no interior de gaiolas de criação (Silva & Panizzi 2008).

Em estudo sobre seleção de planta hospedeira, observou-se que o percevejo *Neomegalotomus parvus* (Westwood) (Heteroptera: Alydidae) oviposita em folhas de soja junto à

nervura central, o que facilitaria a fixação dos ovos (Panizzi *et al.* 1996). Em outra planta hospedeira, o guandu (*Cajanus cajan* L.) (Fabaceae) os percevejos ovipositam em fendas presentes nas vagens. Esses locais específicos de oviposição, possivelmente são selecionados por sensilas mecanorreceptoras presentes no abdome (Ventura 2000), indicando que para *N. parvus*, as características físicas do substrato são determinantes na seleção do local de oviposição.

Na natureza, os pentatomídeos depositam seus ovos em massas que variam em tamanho e forma. Em muitos casos, como *N. viridula*, os ovos são depositados em massas com formato hexagonal, e o número de ovos varia, sendo em média 80 ovos/postura (Kiritani & Hokyo 1965, Javahery 1994). Em geral, os ovos são depositados na face inferior das folhas (face abaxial) das suas plantas hospedeiras, como no caso da soja.

Em laboratório, estudo associando substratos artificiais e extratos químicos mostrou que fêmeas de *N. viridula* ovipositam preferencialmente em tecido tratado com extrato metanólico de vagens de soja do que em tecido tratado com água (Panizzi *et al.* 2004), reforçando pesquisas que demonstram que em insetos herbívoros a seleção do hospedeiro para alimentação, cópula e oviposição é mediada basicamente por substâncias químicas da planta (Bernays & Chapman 1994).

Nos últimos anos, uma grande variedade de compostos químicos de plantas foi identificada, e sua atividade sobre os comportamentos alimentar e reprodutivo, comprovada para herbívoros de diferentes ordens, como Lepidoptera (Du *et al.* 1995, Ibrahim *et al.* 2005) e Diptera (Morris *et al.* 2000, Gouinguené & Städler 2005), incluindo espécies de importância econômica. Estes estudos permitiram uma melhor compreensão das relações ecológicas entre plantas hospedeiras, insetos-praga e seus inimigos naturais, auxiliando no desenvolvimento de novos métodos de controle e no aprimoramento de métodos já existentes.

Entretanto, em estudos sobre as preferências de oviposição em heterópteros pouca atenção tem sido dedicada em examinar o papel de compostos químicos no processo. Apesar de existirem muitos estudos publicados com percevejos, há pouca informação sobre o papel das substâncias químicas originárias de plantas na preferência de oviposição de Heteroptera (Dwumfour 1992, Constant *et al.* 1996). Por outro lado, existem inúmeras referências a outros grupos de insetos como Lepidoptera e Diptera, entre outras ordens mencionadas (Honda 1995, Hilker & Meiners 2002, Städler 2002).

Por isso, conhecer os mecanismos envolvidos no comportamento de oviposição de heterópteros fornecerá informações sobre a interação desses insetos com suas plantas hospedeiras, auxiliando no desenvolvimento de táticas de controle mais eficientes. Além disso, essas informações poderão auxiliar no aprimoramento de técnicas de criação desses percevejos em laboratório.

Portanto, o presente estudo buscou elucidar os mecanismos envolvidos no comportamento de oviposição de diferentes espécies de pentatomídeos fitófagos, considerando as seguintes hipóteses:

- 1) A textura e a forma do substrato de oviposição influenciam no comportamento de oviposição dos pentatomídeos fitófagos;
- 2) A oviposição dos pentatomídeos é influenciada pelos compostos químicos extraídos de vagens de soja;
- 3) É possível utilizar substratos artificiais de oviposição para manter colônias de pentatomídeos fitófagos em laboratório.

1.2. Objetivos

O estudo teve os seguintes objetivos específicos:

- Selecionar substratos artificiais para receber as posturas de diferentes espécies de pentatomídeos fitófagos.
- Verificar a influência das características físicas (textura e forma) dos substratos artificiais sobre o comportamento de oviposição dos percevejos.
- Avaliar a porcentagem de eclosão de ninfas de *E. heros* provenientes de posturas depositadas em substratos artificiais e plantas de soja.
- Comparar a preferência de oviposição de *Euschistus heros* em substratos artificiais e plantas de soja.
- Avaliar a ação de extratos químicos de vagens de soja que possam ser utilizados para condicionar a oviposição de pentatomídeos em substratos artificiais.
- Extrair, identificar e quantificar compostos voláteis presentes em vagens de soja de diferentes cultivares.

- Extrair, identificar e quantificar isoflavonas e açúcares presentes em vagens de soja de diferentes cultivares.
- Avaliar a resposta olfativa de *E. heros* aos principais compostos voláteis identificados em diferentes cultivares de soja.
- Avaliar a oviposição de *E. heros* em substratos tratados com isoflavonas e açúcares presentes em vagens de soja de diferentes cultivares.
- Comparar a preferência alimentar e de oviposição de *E. heros* em vagens de soja de diferentes cultivares.
- Analisar e comparar o perfil químico de diferentes cultivares de soja visando selecionar genótipos que apresentem características químicas que condicionem a oviposição de percevejos pentatomídeos fitófagos.

1.3. Literatura Citada

- Bernays, E.A. & R.F. Chapman. 1994.** Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, London, UK, 312 p.
- Bundy, C.S. & R.M. McPherson. 2000.** Morphological examination of stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) eggs on cotton and soybeans, with a key to genera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 616-624.
- Constant, B., S. Grenier & G. Bonnot. 1996.** Artificial substrate for egg laying and embryonic development by the predatory bug *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). *Biol. Control.* 7: 140-147.
- Corrêa-Ferreira, B.S. 2002.** *Trissolcus basal* para o controle de percevejos da soja. In Parra, J.R.P.; P.S.M. Botelho; B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento. (eds.). *Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores*. Manole, São Paulo, Brasil, 609 p.
- Du, Y., J.A.A. Renwick & J.J.A. Van Loon. 1995.** Sensory responses of tarsal chemoreceptors of *Pieris napi napi* and *Pieris napi oleracea* to oviposition-stimulating glucosinolates. *Physiol. Entomol.* 20: 164-174.
- Dwunfour, E.F. 1992.** Volatile substances evoking orientation in the predatory flowerbug *Anthocoris nemorum* (Heteroptera: Anthocoridae). *Bull. Entomol. Res.* 1: 157-161.

- Gouinguéné, S.P.D. & E. Städler. 2005.** Comparison of the sensitivity of four *Delia* species to host and non-host plants compounds. *Physiol. Entomol.* 30: 62-74.
- Hilker, M. & T. Meiners. 2002.** Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Blackwell Publishers, Berlin, Germany, 390 p.
- Honda, K. 1995.** Chemical basis of differential oviposition by lepidopterous insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 30: 1-23.
- Ibrahim, M.A., A. Nissinen & J.K. Holopainen. 2005.** Response of *Plutella xylostella* and its parasitoid *Cotesia plutellae* to volatile compounds. *J. Chem. Ecol.* 31: 1969-1984.
- Javahery, M. 1994.** Development of eggs in some true bugs (Hemiptera: Heteroptera). Part I. Pentatomoidea. *Can. Entomol.* 126: 401-433.
- Kiritani, K. & N. Hokyo. 1965.** Variation of egg mass size in relation to the oviposition pattern in Pentatomidae. *Kontyû* 33: 427-433.
- Morris, B.D., S.P. Foster & M.O. Harris. 2000.** Identification of 1-octacosanal and 6-methoxy-2-benzoxazolinone from wheat as ovipositional stimulants for Hessian fly, *Mayetiola destructor*. *J. Chem. Ecol.* 26: 859-873.

- Panizzi, A.R. & F. Slansky, Jr.. 1985.** Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. Fla. Entomol. 68: 184-214.
- Panizzi, A.R., E. Hirose & E.D.M. Oliveira. 1996.** Egg allocation by *Megalotomus parvus* (Heteroptera: Alydidae) on soybean. An. Soc. Entomol. Brasil 25: 537-543.
- Panizzi, A.R., J.E. McPherson, D.G. James, M. Javahery & R.M. McPherson. 2000a.** Stink bugs (Pentatomidae). In Schaefer, C.W. & A.R. Panizzi. (eds.). Heteroptera of economic importance. CRC Press, Boca Raton, Flórida, USA. 474 p.
- Panizzi, A.R., J.R.P. Parra, C.H. Santos & D.R. Carvalho. 2000b.** Rearing the southern green stink bug using an artificial dry diet and an artificial plant. Pesq. Agropec. Bras. 35: 1709-1715.
- Panizzi, A.R., M. Berhow & R.J. Bartelt. 2004.** Artificial substrate bioassay for testing oviposition of southern green stink bug conditioned by soybean plant chemical extracts. Environ. Entomol. 33: 1217-1222.
- Shearer, P.W. & V.P. Jones. 1996.** Suitability of macadamia nut as a host plant of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). J. Econ. Entomol. 89: 996-1003.
- Silva, F.A.C. & A.R. Panizzi. 2007.** Cotton balls as an oviposition substrate for laboratory rearing of phytophagous stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 100: 745–748.

- Silva, F.A.C. & A.R. Panizzi. 2008.** The adequacy of artificial oviposition substrates for laboratory rearing of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera, Pentatomidae). Rev. Brasil. Entomol. 52: 131-134.
- Sosa-Gomez, D.R., I.C. Corso & L. Morales. 2001.** Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and metamidophos in the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). Neotrop. Entomol. 30: 317-320.
- Städler, E. 2002.** Plant chemicals cues important for egg deposition by herbivorous insects. In Hilker, M. & T. Meiners (eds.). Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Blackwell Publishers, Berlin, Germany, 390 p.
- Ventura, M.U. 2000.** Seleção hospedeira em *Neomegalotomus parvus* West. (Hemiptera: Alydidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 106 p.

CAPÍTULO 2

Avaliação de substratos artificiais de oviposição para pentatomídeos fitófagos

2.1. Introdução

Várias espécies de insetos têm sido reportadas atacando a soja, *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae), as mais importantes são o percevejo verde, *Nezara viridula* (L.), o percevejo-verde-pequeno, *Piezodorus guildinii* (Westwood) e o percevejo marrom, *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). A maioria desses insetos causa danos à soja com a introdução do aparelho bucal nas vagens e, ao atingirem as sementes, danificam diretamente os tecidos, tornando-as chochas e enrugadas, afetando, conseqüentemente, a produção e a qualidade dos grãos (Panizzi & Slansky 1985).

Vários estudos têm sido realizados buscando conhecer aspectos ecológicos, comportamentais e evolutivos dessas espécies de pentatomídeos, visando principalmente, estabelecer táticas eficazes de controle. Dentro deste âmbito, a criação de percevejos fitófagos em laboratório é hoje uma atividade de extrema importância, disponibilizando insetos para uso em testes de biologia, testes de linhagens resistentes, testes de eficiência de inseticidas, uso em programas de controle biológico com parasitóides e identificação de feromônios, entre outros.

Atualmente, a criação de pentatomídeos em laboratório depende do uso contínuo de plantas de soja, oferecidas como substratos para oviposição, porém essa metodologia demanda mão-de-obra e tempo excessivos e tem custo elevado; fazendo-se necessário o seu aprimoramento, através do uso de materiais mais baratos e da utilização de espaços físicos menores, sem afetar a qualidade dos

insetos. Um dos principais problemas encontrados ao criar pentatomídeos fitófagos em laboratório é fornecer substratos artificiais de oviposição adequados. Muitos materiais como papel toalha, *voil* e telas de *nylon* têm sido relatados como possíveis substratos artificiais de oviposição para pentatomídeos fitófagos (Shearer & Jones 1996, Bundy & McPherson 2000, Panizzi *et al.* 2004, Silva *et al.* 2008). Estruturas de plástico que imitam plantas de soja, também foram utilizadas como substrato de oviposição para *N. viridula* (Panizzi *et al.* 2000), sendo que nesse substrato artificial as fêmeas apresentaram comportamento semelhante ao observado em plantas de soja, ovipositando no lado inferior (abaxial) dos folíolos.

Em estudos em laboratório, Bianco (1998) utilizou algodão hidrófilo para agrupar as posturas do percevejo barriga verde *Dichelops furcatus* (Dallas) e, recomendou o uso deste substrato artificial embora, não tenha comparado o algodão com outros substratos para oviposição. Ao criar o percevejo marrom, *E. heros* em laboratório, observou-se também que as fêmeas preferiam ovipositar no algodão utilizado para fornecer água (F.A.C. Silva, observação pessoal). A partir desta observação casual e do estudo de Bianco (1998) decidiu-se testar o algodão hidrófilo como substrato de oviposição para diferentes espécies de pentatomídeos fitófagos.

Em testes com o percevejo marrom comparou-se o algodão hidrófilo com pedaços de tule e de *voil*, pois esses tecidos geralmente, são utilizados para recobrir gaiolas de criação em laboratório e, ocasionalmente, são encontradas posturas de *E. heros* sobre esses materiais (Villas Bôas & Panizzi 1980).

Para *P. guildinii* foram testados substratos artificiais de forma longilínea (fio de lã e barbante de algodão), pois na natureza estes pentatomídeos ovipositam preferencialmente em superfícies alongadas, como vagens de soja (Panizzi & Smith 1977) ou em vagens das plantas hospedeiras alternativas pertencentes ao gênero *Indigofera* (Fabaceae) (Panizzi 1992). Além disso,

estudos com *Piezodorus hybneri* Gmelin demonstraram que as fêmeas ovipositam preferencialmente em fios de juta (Higuchi 1994a), indicando que para este gênero de percevejo possivelmente, a forma alongada do substrato é importante.

Portanto, visando aprimorar a técnica de criação de pentatomídeos fitófagos em laboratório, foram avaliados substratos artificiais de oviposição para diferentes espécies de percevejos, verificando principalmente, a influência das características físicas (textura e forma) dos substratos sobre o comportamento de oviposição.

2.2. Material e métodos

Adultos dos pentatomídeos *E. heros*, *N. viridula*, *P. guildinii*, *Chinavia impicticornis* (Stål), *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Edessa meditabunda* (F.) e *Thyanta perditor* (F.) foram coletados em campos de soja e milho [*Zea mays* (L.) (Poaceae)] e em plantas não cultivadas [picão-preto, *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) e rubim, *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae)] na fazenda da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, em Londrina, PR (latitude 23° 18'S), de dezembro de 2005 a janeiro de 2006.

Os insetos (30 casais) foram colocados em caixas de plástico (20 x 20 x 25 cm), forradas com papel filtro e alimentados com vagem verde de feijão, *Phaseolus vulgaris* L., sementes de soja e amendoim, *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae) e frutos maduros de ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait. (Oleaceae). Tanto na criação estoque como nos experimentos a seguir, os insetos foram mantidos em ambiente climatizado a 25 ± 1 °C, $65 \pm 5\%$ UR e fotoperíodo 14h L: 10h E.

2.2.1. Avaliação de algodão hidrófilo como substrato artificial de oviposição para diferentes espécies de pentatomídeos fitófagos

Dez casais de cada espécie dos pentatomídeos em estudo foram selecionados da criação estoque e colocados individualmente em caixa gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5 cm), forrada com papel filtro, contendo alimento (mesmo utilizado para criação em laboratório) e um pedaço (2,0 cm de diâmetro) de algodão hidrófilo seco (Cremer S.A., Blumenau, SC), distribuídos aleatoriamente nas caixas. Diariamente, as caixas foram observadas, os alimentos e o pedaço de algodão foram trocados e o número de posturas e ovos depositados no algodão, no papel filtro, no alimento e nas laterais e/ou tampa da gerbox foi avaliado. Cada casal de inseto foi considerado uma unidade experimental em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

2.2.2. Comparação de algodão hidrófilo, tule e *voil* como substrato de oviposição para *Euschistus heros*

Quinze casais de *E. heros* foram selecionados da criação de laboratório e colocados individualmente, em caixa gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) forrada com papel filtro. Em cada caixa foi colocado um pedaço (2,0 cm de diâmetro) de algodão hidrófilo seco (Cremer S.A., Blumenau, SC), um pedaço (3,0 cm de comp. x 3,0 cm de larg.) de tule branco (malha de 1,0 mm) (Bankike - Com. e Ind. de Rendas Ltda, Nova Friburgo, RJ) e um pedaço (3,0 cm de comp. x 3,0 cm de larg.) de *voil* extra-fino (Têxtil São João Ltda., São João da Boa Vista, RS). Os insetos foram alimentados com vagem verde de feijão e sementes de amendoim e soja.

As caixas foram observadas diariamente durante seis dias. Os alimentos foram trocados a cada dois dias. Diariamente, os substratos de oviposição foram trocados e o número de posturas e ovos depositados nos diferentes substratos foi avaliado. Cada casal de inseto foi considerado uma unidade experimental em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

2.2.3. Comparação de algodão hidrófilo, barbante de algodão, fio de lã sintética e *voil* como substrato de oviposição para *Piezodorus guildinii*

Dez casais de *P. guildinii* provenientes de criação em laboratório foram colocados em gaiolas teladas (50 x 50 x 70 cm) forradas com papel filtro. Na tampa de cada gaiola foram pendurados: um fio (30 cm de comp. x 0,2 cm de diâmetro) de barbante de algodão (Têxtil São João Ltda., São João da Boa Vista, RS), um fio (30 cm de comp. x 0,3 cm de diâmetro) de lã sintética branca de tricô (Família®, São Paulo, SP) e uma fita (30 cm de comp. x 2,0 cm de larg.) de *voil* (Têxtil São João Ltda., São João da Boa Vista, RS), fixados com auxílio de fita adesiva transparente e distanciados 15 cm entre si.

Em experimento semelhante, dez casais de *P. guildinii* foram colocados em gaiolas contendo uma linha de tricô (30 cm de comp. x 0,3 cm de diâmetro) e um pedaço (2,0 cm de diâmetro) de algodão hidrófilo seco (Cremer S.A., Blumenau, SC). Os insetos foram alimentados com vagem verde de feijão, sementes de amendoim e soja e frutos maduros de ligustro.

Para cada experimento foram utilizadas quatro gaiolas observadas diariamente, durante seis dias. Os alimentos foram trocados a cada dois dias. Diariamente, os substratos de oviposição foram trocados e o número de posturas e ovos depositados nos diferentes substratos foi avaliado. Cada

gaiola foi considerada uma unidade experimental em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

2.2.4. Microscopia eletrônica de varredura das placas genitais femininas e de ovos de *Euschistus heros* depositados em algodão hidrófilo

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Laboratório de Microanálise e Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de Londrina, PR.

Fêmeas de *E. heros* com 10 dias de idade foram mortas por congelamento e tiveram a região genital dissecada com auxílio de lâmina de bisturi. O material foi fixado durante 3 horas em glutaraldeído 2,5%, solução tampão fosfato 0,1M e água; em seguida foram dados três banhos de 15 minutos em tampão fosfato 0,1M. Uma fixação secundária foi realizada durante 1 hora em solução de ósmio 1% e solução tampão fosfato 0,1M. O material recebeu três banhos de 15 minutos em tampão fosfato 0,1M e foi desidratado em álcool 70% “overnight” e em três banhos de 10 minutos em álcool 80%, 90% e 100%. Para desidratação total, o material foi colocado em ponto crítico durante 30 minutos com álcool absoluto. O material foi colado com fita adesiva de carbono em suportes para microscopia eletrônica (“stubs”) e metalizado com ouro. O mesmo procedimento foi realizado para a análise dos ovos de *E. heros* depositados sobre o algodão hidrófilo.

Os materiais foram observados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo Fei Quanta 200 (Fei Company, Hillsboro, Oregon, EUA).

2.2.5. Análise dos dados

O número médio de posturas, de ovos e ovos/postura foi calculado e submetido à análise de variância (ANOVA). As porcentagens de posturas e ovos foram transformadas em arcoseno $\sqrt{x + 1}$ para comparação pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa estatístico SAS 8.2. (SAS Institute 1981, Zar 1984).

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Avaliação de algodão hidrófilo como substrato artificial de oviposição para diferentes espécies de pentatomídeos fitófagos

Das sete espécies de percevejos estudadas, cinco espécies (*C. impicticornis*, *D. melacanthus*, *E. heros*, *P. guildinii* e *T. perditor*) mostraram preferência significativa em ovipositar no algodão hidrófilo (Fig. 2.1), porém também ovipositaram no papel filtro, mas não no alimento, sendo que apenas *C. impicticornis* o fez na caixa gerbox. Aparentemente, o tamanho e a forma das posturas podem ter influenciado nesses resultados, pois em geral, a maioria dessas espécies de pentatomídeos apresenta posturas de no máximo 25 ovos, agrupados em poucas linhas. Um exemplo são as posturas de *E. heros* que possuem de 3 a 14 ovos dispostos em duas ou três linhas paralelas (Villas Bôas & Panizzi 1980); *D. melacanthus* apresenta posturas com 5 a 14 ovos em três linhas (A.R.P. comunicação pessoal); *C. impicticornis* de 12 a 14 ovos em três ou quatro linhas

(Grazia *et al.* 1982); *T. perditor* de 11 a 25 ovos em duas linhas (Panizzi & Herzog 1984) e *P. guildinii* de 11 a 15 ovos em duas linhas (Panizzi & Smith 1977).

Apenas *E. mediotabunda* e *N. viridula* não ovipositaram no algodão. *E. mediotabunda* ovipositou preferencialmente na lateral da caixa gerbox (75%), seguida pelo alimento (vagem de feijão - 25%), não ovipositando no algodão e no papel (Fig. 2.1). Sanchez *et al.* (1999) também observaram oviposição de *E. mediotabunda* sobre vagem verde de feijão (45%) e na lateral de caixas de criação (25%).

O fato de *E. mediotabunda* não ter ovipositado no algodão, embora apresente posturas pequenas (12 a 14 ovos dispostos em duas linhas; Rizzo 1976), pode estar relacionado ao tamanho dos ovos, que são maiores do que os das outras espécies testadas e, isso pode ter prejudicado a fixação dos ovos devido à disposição irregular das fibras do algodão. Uma característica interessante desta espécie refere-se ao comportamento apresentado pelas ninfas recém-eclodidas, que permanecem imóveis e com a cabeça encostada no córion até atingirem o 2º instar (Rizzo 1971). Embora não haja estudos conclusivos sobre a importância biológica, fisiológica e/ou evolutiva desse comportamento, é possível que o tipo de substrato de oviposição interfira nesse comportamento.

N. viridula não ovipositou no algodão, possivelmente devido ao tamanho e forma de suas posturas (usualmente >100 ovos depositados em cinco a sete linhas; Rizzo 1976), o que sugere a necessidade de uma superfície mais plana para acomodar os ovos, como o caso de folíolos de soja, um substrato natural (Todd 1989) ou ainda *voil* esticado, um substrato artificial (Panizzi *et al.* 2004).

Os resultados demonstram que o algodão hidrófilo pode ser usado como substrato para receber as posturas de várias espécies de pentatomídeos fitófagos associados com a soja e provavelmente, para outras espécies que depositam posturas com poucos ovos.

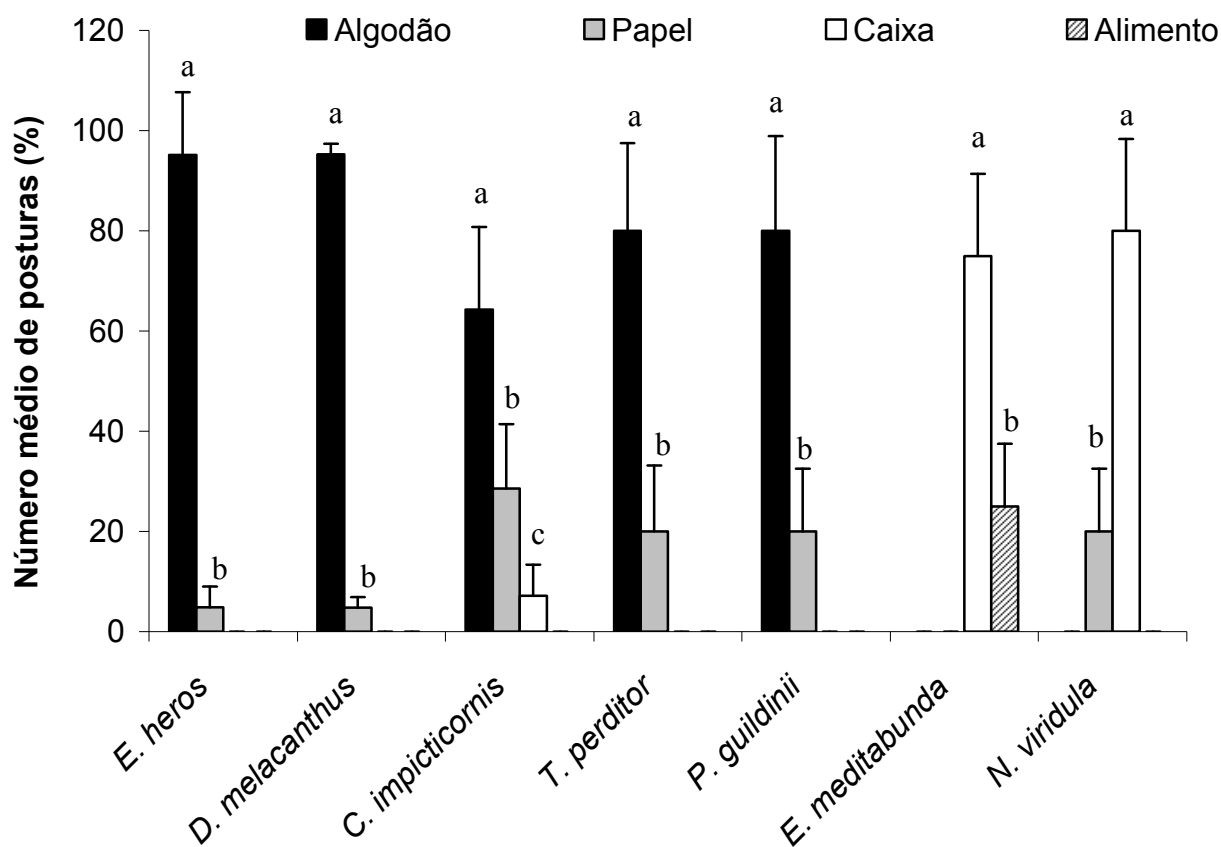


Figura 2.1. Oviposição em laboratório entre algodão hidrófilo, papel filtro, gerbox e alimento para sete espécies de percevejos fitófagos. Médias seguidas pela mesma letra dentro dos tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x + 1}$ para análise de comparação.

2.3.2. Comparação de algodão hidrófilo, tule e *voil* extra fino como substrato de oviposição para *Euschistus heros*

O número médio de posturas e ovos depositados por *E. heros* foi significativamente maior no algodão comparado com o tule e o *voil* extra fino (Tabela 2.1). Aproximadamente 80% das posturas foram depositadas no algodão, comparado com 14% no tule e 1% no *voil*. A porcentagem de ovos foi significativamente maior no algodão (87,3%), seguido pelo tule (11,9%), e pelo *voil* (0,8%). Embora o número médio de ovos/postura tenha variado entre os diferentes substratos, não foi observada diferença significativa entre eles (Tabela 2.1).

Esses resultados reforçam estudos anteriores que demonstram que o algodão hidrófilo é um substrato de oviposição preferido por *E. heros* (Silva & Panizzi 2007). Além disso, esses resultados confrontam que o *voil*, substrato de oviposição preferido por outras espécies de pentatomídeos como *N. viridula* (Panizzi *et al.* 2004), poderia ser adequado para receber as posturas de *E. heros*.

Tabela 2.1. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por *Euschistus heros* em substratos artificiais.

Substrato	Número médio ($\pm$ EP) ¹				Média ($\pm$ EP) de ovos/postura
	Posturas	Posturas (%) ²	Ovos	Ovos (%) ²	
Algodão	10,9 $\pm$ 0,8 a	85,2 $\pm$ 3,4 a	73,3 $\pm$ 6,6 a	87,3 $\pm$ 3,1 a	6,9 $\pm$ 0,6 a [163] ³
Voil	0,13 $\pm$ 0,1 c	1,1 $\pm$ 1,1 c	0,4 $\pm$ 0,4 c	0,8 $\pm$ 0,8 c	3,0 $\pm$ 0,1 a [2]
Tule	1,7 $\pm$ 0,3 b	13,7 $\pm$ 2,9 b	9,5 $\pm$ 2,5 b	11,9 $\pm$ 2,7 b	5,4 $\pm$ 0,5 a [25]

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05).

² Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x+1}$ para análise de comparação.

³ Número de posturas em cada substrato, entre colchetes.

Observou-se que as posturas depositadas sobre o tule apresentaram uma distribuição irregular, com muitos ovos sobrepostos. Possivelmente, isso ocorreu devido ao tamanho da malha do tecido, que por apresentar abertura maior, impediu o arranjo característico observado nas posturas de *E. heros* [3 a 14 ovos dispostos em duas a três linhas paralelas (Villas Bôas & Panizzi 1980)]. Bundy & McPherson (2000) mencionam que posturas de diferentes espécies de pentatomídeos também apresentaram padrão irregular de distribuição dos ovos quando os autores usaram tiras de *voil* como substrato para oviposição. No presente estudo, por ter sido utilizado um *voil* extra fino, observou-se arranjo normal das posturas, sugerindo que o tamanho da malha é um fator importante para o arranjo correto dos ovos nas posturas de pentatomídeos.

2.3.3. Comparação de algodão hidrófilo, barbante de algodão, fio de lã sintética e *voil* como substrato de oviposição para *Piezodorus guildinii*

O número total de posturas depositadas nas estruturas de forma longilínea (lã de tricô e no barbante) foi maior do que no *voil* (Tabela 2.2). Considerando a porcentagem de ovos, observou-se preferência pela lã de tricô (54,4%) em relação aos outros dois substratos (barbante 31,7% e *voil* 13,9%). O número médio de ovos/postura foi maior na lã de tricô do que no *voil*, com valores intermediários para o barbante (Tabela 2.2).

Na natureza, *P. guildinii* deposita preferencialmente os ovos em estruturas alongadas, como vagens de soja comparada com os folíolos (Panizzi & Smith 1977, Higuchi 1994b). Em laboratório observou-se que a espécie asiática, *P. hybneri* oviposita em fios de juta pendurados no interior de gaiolas de criação (Higuchi 1994a). Ambas as espécies apresentam posturas pequenas e arranjadas em duas linhas paralelas.

Portanto, o padrão de postura (linhas paralelas) apresentado por *P. guildinii* pode ter determinado a preferência pela lã de tricô, seguida pelo barbante. Outro fator importante pode estar relacionado ao fato de a lã de tricô apresentar grande quantidade de fibras (Figs. 2.2 A e B) que possivelmente, estimulem sensilas mecanoreceptoras presentes nas placas genitais das fêmeas. Esta hipótese é reforçada com base em outros estudos de comportamento de oviposição de heterópteros, que demonstram que a escolha do local de oviposição é dada por mecanoreceptores, que são estimulados após a fêmea esfregar o ovipositor na superfície de oviposição (Ventura & Panizzi 2000). Outro estudo verificou que fêmeas de *N. viridula* tocam o substrato de oviposição com o abdome antes de depositar os ovos, provavelmente para estimular mecanoreceptores (Panizzi 2006).

Para todas as categorias de tamanho de posturas (amplitude), o número médio (Fig. 2.3 A)

indicou que a maioria das posturas foi depositada no fio de lã de tricô, seguida pelo barbante e a tira de *voil*. A diferença foi particularmente marcada pelas posturas localizadas na categoria de 11 a 20 ovos/postura. Esta classificação inclui o tamanho das posturas usualmente depositadas pelas fêmeas de *P. guildinii* na natureza, em média 14 ovos (Panizzi & Smith 1977).

Tabela 2.2. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por *Piezodorus guildinii* em substratos artificiais em laboratório.

Substrato	Número médio ($\pm$ EP) ¹				Média ($\pm$ EP) de ovos/postura
	Posturas	Posturas (%) ²	Ovos	Ovos (%) ²	
Lã de tricô	3,8 $\pm$ 0,6 a	53,8 $\pm$ 0,3 a	71,4 $\pm$ 10,0 a	54,4 $\pm$ 0,3 a	17,9 $\pm$ 1,6 a [38] ³
Barbante	2,2 $\pm$ 0,4 ab	31,0 $\pm$ 0,3 b	41,6 $\pm$ 9,1 ab	31,7 $\pm$ 0,3 b	15,5 $\pm$ 2,3 ab [22]
Voil	1,1 $\pm$ 0,3 b	15,2 $\pm$ 0,2 b	18,3 $\pm$ 5,0 b	13,9 $\pm$ 0,2 b	9,7 $\pm$ 2,1 b [11]

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P < 0,05).

² Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{(x + 1)}$ para análise de comparação.

³ Número de posturas em cada substrato, entre colchetes.

No teste onde foram comparados a lã de tricô e o algodão hidrófilo, observou-se que foram colocadas 10x mais posturas na lã de tricô do que no algodão (Tabela 2.3). Mais de 90% das posturas e mais de 80% dos ovos foram depositados na lã. O número de ovos/postura foi significativamente maior para as posturas depositadas na lã de tricô. Como observado no primeiro

teste, o número médio de posturas de todos os tamanhos foi significativamente maior na lã de tricô do que no algodão, exceto para as posturas maiores (21-30 ovos) (Fig. 2.3 B). Esses resultados indicam que fêmeas de *P. guildinii* preferem substratos longilíneos (fio de lã) do que substratos com áreas maiores no sentido da largura (por ex., bolas de algodão).

Portanto, os testes demonstram a viabilidade do fio de lã sintética de tricô como um substrato artificial de oviposição para *P. guildinii*. Embora outros fios sejam rotineiramente usados para receber posturas de *P. guildinii* (A.R. Panizzi não-publicado) e *P. hybneri* (Higuchi 1994a), fios que apresentam grande quantidade de fibras soltas apresentam melhores resultados e devem ser preferencialmente utilizados em criações em laboratório.

Tabela 2.3. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por *Piezodorus guildinii* em substratos artificiais em laboratório.

Substrato	Número médio ($\pm$ EP) ¹				Média ($\pm$ EP) de ovos/postura
	Posturas	Posturas (%) ²	Ovos	Ovos (%) ²	
Lã de tricô	5,5 $\pm$ 2,6 a	92,3 $\pm$ 1,9 a	33,2 $\pm$ 4,6 a	82,9 $\pm$ 0,5 a	18,0 $\pm$ 2,1 a [55] ³
Algodão	0,5 $\pm$ 0,2 b	7,7 $\pm$ 0,1 b	6,8 $\pm$ 2,4 b	17,1 $\pm$ 0,3 b	6,0 $\pm$ 1,9 b [5]

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

² Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{(x + 1)}$ para análise de comparação.

³ Número de posturas em cada substrato, entre colchetes.

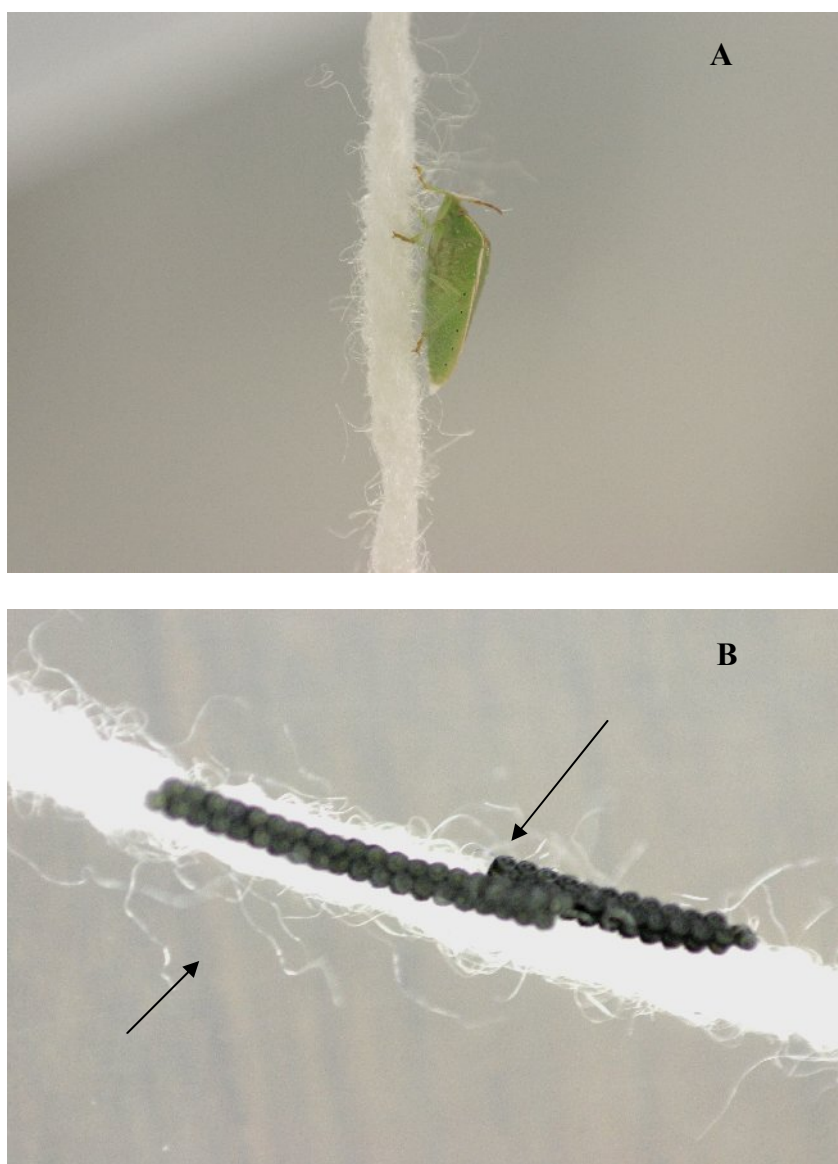


Figura 2.2. Fêmeas de *Piezodorus guildinii* em posição de pré-oviposição sobre fio de lã sintética de tricô (A); posturas depositadas e detalhe (setas) para as fibras desfiadas do fio de lã (B).

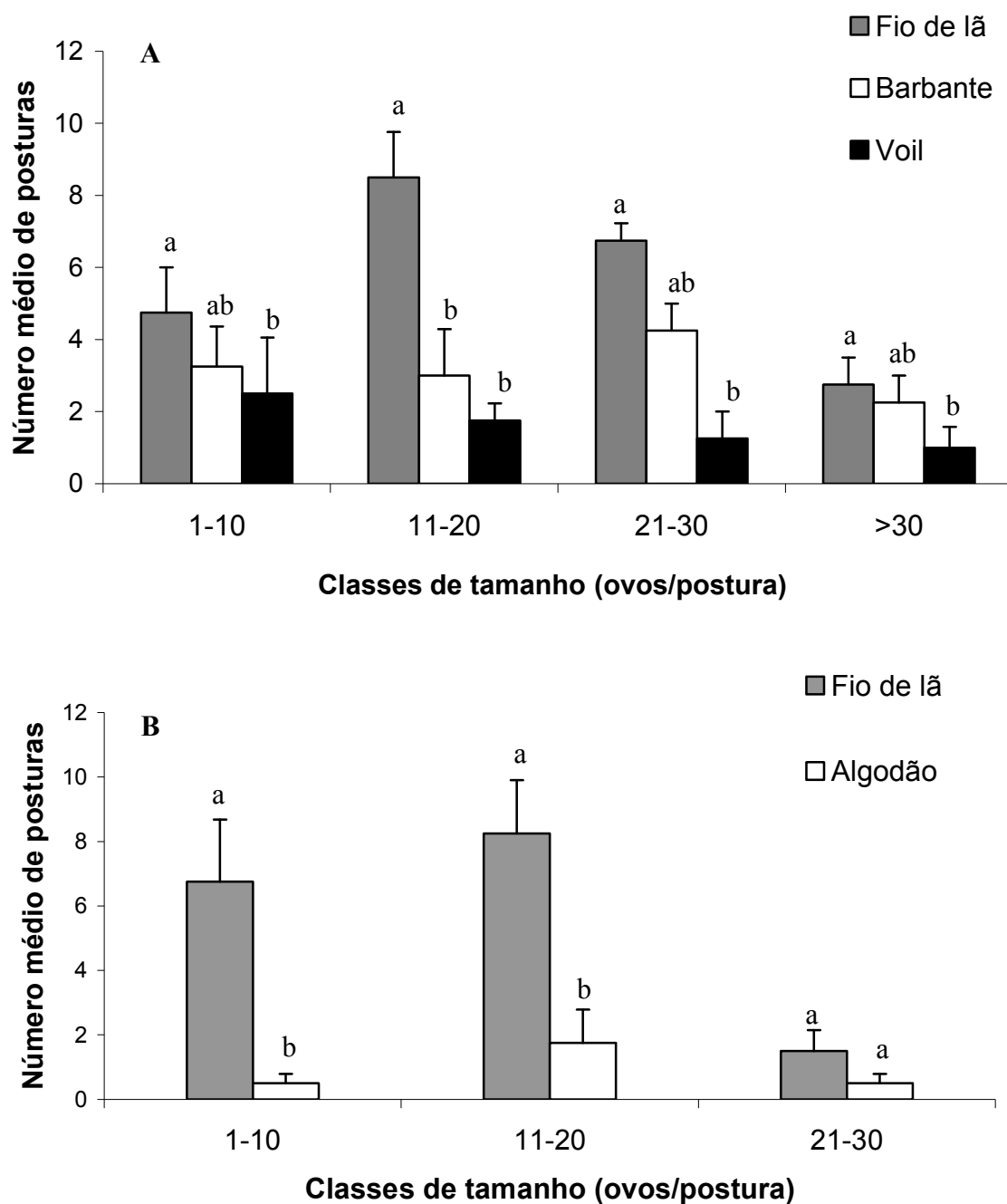


Figura 2.3. Número médio ($\pm$ EP) de posturas de *Piezodorus guildinii* em substratos artificiais em laboratório, distribuídas em diferentes classes de tamanho (ovos/postura). A) Comparação entre fio de lã, barbante e *voil* e B) comparação entre fio de lã e algodão. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) (A). Médias comparadas usando o teste t de Student ($P < 0,05$) (B).

2.3.4. Microscopia eletrônica de varredura da genitália feminina e de ovos de *Euschistus heros* depositados em algodão hidrófilo

Imagens da genitália feminina de *E. heros* obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram a presença de sensilas longas, em forma de cerdas, com soquetes flexíveis com provável função mecanorreceptora (Fig. 2.4 A, B) (Altner & Prillinger 1980; Frazier 1985).

Em MEV foi revelado que muitas fibras de algodão ficam localizadas ao redor e sobre os ovos (Figs. 2.5 A e B) e, bem fixadas na base dos ovos (Fig. 2.5 C). Em microscópio estereoscópico (aumento 10X) observou-se que as ninfas recém-eclodidas puderam se movimentar facilmente até a parte superior dos ovos (Fig. 2.5 D), demonstrando que as fibras não interferem negativamente, no comportamento de agregação das ninfas de *E. heros* recém-eclodidas. Testes indicam que a porcentagem de eclosão não é afetada pelas fibras de algodão que recobrem os ovos (ver Capítulo 3, item 3.3.3).

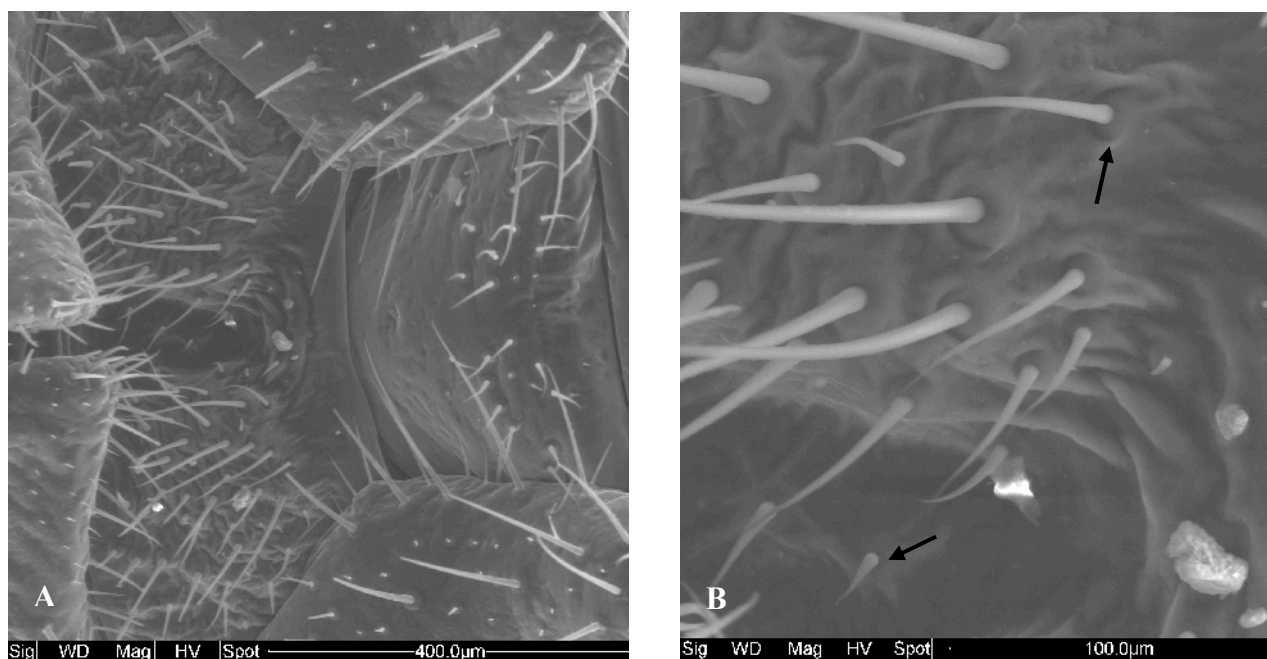


Figura 2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da genitália feminina de *Euschistus heros*.

A) Vista ventral das placas da genitália revelando grande quantidade de sensilas (160X); B) Detalhe mostrando sensilas do tipo tricóidea, com base em soquete (setas) (600X).

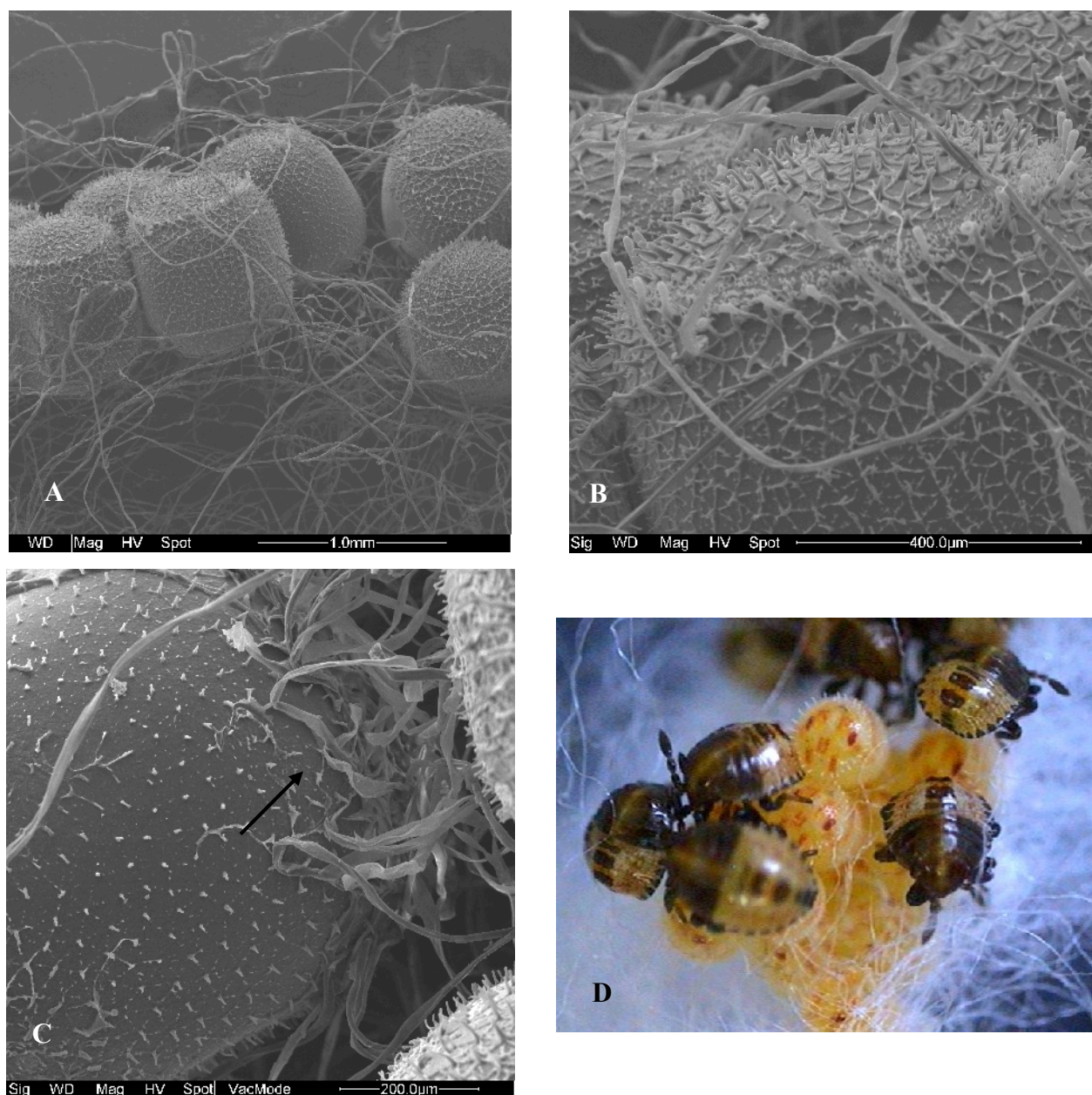


Figura 2.5. Microscopia eletrônica de varredura de ovos de *Euschistus heros* depositados em algodão e observação de ninfas recém-eclodidas. A) Posturas depositadas justapostas sobre as fibras de algodão e com muitas fibras de algodão ao redor e sobre os ovos (40X); B) Detalhe de fibra de algodão sobre ovo (150X); C) Fibras de algodão fixadas na base do ovo (seta) (150X); D) Ninfas recém eclodidas sobre os ovos (microscópio estereoscópico 10X).

2.4. Literatura citada

- Altner, H. & L. Prillinger. 1980.** Ultrastructure of invertebrate chemo, thermo, and hygroreceptor and its functional significance. *Intern. Rev. Cytol.* 67: 69-139.
- Bianco, R. 1998.** Técnica de criação do percevejo barriga verde, *Dichelops furcatus*. In XVII Congresso Brasileiro de Entomologia, Rio de Janeiro, RJ, p. 202.
- Bundy, C.S. & R.M. McPherson. 2000.** Morphological examination of stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) eggs on cotton and soybeans, with a key to the genera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 616-624.
- Frazier, J.L. 1985.** Nervous system: sensory system. In Blum, M.S. (ed). *Fundamentals of insect physiology*. John Wiley & Sons, New York, USA, 598 p.
- Grazia, J., M.C. Del Vecchio & R. Hildebrand. 1982.** Estudo das ninfas de pentatomídeos (Heteroptera) que vivem sobre soja (*Glycine max* (L.) Merrill): IV- *Acrosternum impicticorne* (Stal, 1872). *An. Soc. Entomol. Brasil.* 11: 261-268.
- Higuchi, H. 1994a.** Photoperiodic induction of diapause, hibernation and voltinism in *Piezodorus hybneri* (Heteroptera: Pentatomidae). *Appl. Entomol. Zool.* 29: 585-592.

- Higuchi, H. 1994b.** Seasonal prevalence and mortality factors of eggs of *Piezodorus hybneri* Gmelin (Heteroptera: Pentatomidae) in a soybean field. Japan. J. Appl. Entomol. Zool. 38: 17-21.
- Panizzi, A.R. & J.G. Smith. 1977.** Biology of *Piezodorus guildinii*: Oviposition, development time, adult sex ratio and longevity. Ann. Entomol. Soc. Am. 70: 35-39.
- Panizzi, A.R. & F. Slansky, Jr.. 1985.** Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. Fla. Entomol. 68: 184-214.
- Panizzi, A.R. 1992.** Performance of *Piezodorus guildinii* on four species of *Indigofera*. Ent. Exp. Appl. 63: 221-228.
- Panizzi, A.R. 2004.** Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). In Capinera, J.L. (ed.). Encyclopedia of Entomology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1545 p.
- Panizzi, A.R. 2006.** Possible egg positioning and gluing behavior by ovipositing southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). Neotrop. Entomol. 35: 149-151.
- Panizzi, A.R. & D.C. Herzog. 1984.** Biology of *Thyanta perditor* (Hemiptera: Pentatomidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 77: 646- 650.

- Panizzi, A.R., M. Berhow & R.J. Bartelt. 2004.** Artificial substrate bioassay for testing oviposition of southern green stink bug conditioned by soybean plant chemical extracts. *Environ. Entomol.* 33: 1217-1222.
- Panizzi, A.R., J.R.P. Parra, C.H. Santos & D.R. Carvalho. 2000b.** Rearing the southern green stink bug using an artificial dry diet and an artificial plant. *Pesq. Agropec. Brasil.* 35: 709-1715.
- Rizzo, H.F. 1971.** Aspectos morfológicos y biológicos de *Edessa meditabunda* (F.) (Hemiptera, Pentatomidae). *Rev. Per. Entomol.* 14: 272-281.
- Rizzo, H.F. 1976.** Hemípteros de interés agrícola. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 69 p.
- Sánchez, M.C., D. Díaz & M. Maselli. 1999.** El comportamiento y tiempo de desarrollo de la chinche *Edessa meditabunda* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). *Rev. Fac. Agron. Maracay.* 25: 149-158.
- SAS Institute. 1981.** SAS for linear models. A guide to the ANOVA and GLM procedures. SAS Institute, Cary, N.C.
- Shearer, P.W. & V.P. Jones. 1996.** Suitability of macadamia nut as a host plant of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 996-1003.

- Silva, F.A.C. & A.R. Panizzi. 2007.** Cotton balls as an oviposition substrate for laboratory rearing of phytophagous stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 100: 745-748.
- Silva, C.C., R.A. Laumann, M.C. Blassioli, M. Pareja & M. Borges. 2008.** *Euschistus heros* mass rearing technique for the multiplication of *Telenomus podisi*. *Pesq. Agropec. Bras.* 43: 575-580.
- Todd, J.W. 1989.** Ecology and behavior of *Nezara viridula*. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 273-292.
- Ventura, M.U. & A.R. Panizzi. 2000.** Oviposition behavior of *Neomegalotomus parvus* (West.) (Hemiptera: Alydidae): Daily rhythm and site choice. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 391-400.
- Villas Bôas, G. L. & A.R. Panizzi. 1980.** Biologia de *Euschistus heros* (Fabricius, 1789) em soja (*Glycine max* L. Merrill). *An. Soc. Entomol. Brasil* 9: 105-113.
- Zar, J.H. 1984.** Biostatistical analysis, 2nd ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.

CAPÍTULO 3

Oviposição de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) em substratos artificial e natural

3.1. Introdução

Alguns estudos têm mostrado que o percevejo marrom, *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) pode ser facilmente criado em condições de laboratório, obtendo-se altas taxas de sobrevivência e fecundidade (Peres & Corrêa-Ferreira 2001, Silva *et al.* 2008). Entretanto, um dos principais desafios ao criar em laboratório esta e outras espécies de pentatomídeos é oferecer substratos de oviposição adequados para concentrar as posturas e reduzir o tempo de manuseio na manutenção das colônias.

Os pentatomídeos são conhecidos por ovipositar em papel toalha pendurados no interior de gaiolas (Shearer & Jones 1996), sobre *voil* (Bundy & McPherson 2000), em estruturas de plástico que imitam folhas de soja (Panizzi *et al.* 2000b) ou em *voil* esticado tratado com extrato químico de vagens de soja (Panizzi *et al.* 2004). Para espécies de pentatomídeos que depositam os ovos em linhas duplas, como *Piezodorus guildinii* (Westwood), substratos com forma longilínea, como fios de lã, têm se mostrado adequados (Silva & Panizzi 2008).

Demonstrou-se que algodão hidrófilo adquirido comercialmente é considerado um substrato adequado para receber as posturas de diferentes espécies de pentatomídeos fitófagos, incluindo *E. heros* (Silva & Panizzi 2007). Entretanto, os estudos anteriores com *E. heros* não compararam o algodão com hospedeiros naturais. Portanto, este estudo foi conduzido para comparar a oviposição e

a taxa de eclosão das ninfas de *E. heros* nos substratos artificial (algodão hidrófilo comercial) e natural (planta de soja).

3.2. Material e métodos

De dezembro de 2007 a março de 2008, adultos de *E. heros* foram coletados em campos de soja, na fazenda da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, em Londrina, PR (latitude 23° 18'S).

Trinta casais foram colocados em caixas de plástico (20 x 20 x 25 cm), forradas com papel filtro e alimentados com vagem verde de feijão, *Phaseolus vulgaris* L., sementes de soja e amendoim, *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae) e frutos maduros de ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait. (Oleaceae). As caixas foram mantidas em sala climatizada (25 ± 1 °C, $65 \pm 5\%$ UR, fotoperíodo 14h L: 10h E). Os alimentos foram trocados a cada dois dias.

3.2.1. Oviposição em substratos artificial vs. natural utilizando partes de plantas de soja

Para o teste de dupla escolha, cinco casais de *E. heros* foram selecionados da colônia estabelecida em laboratório e colocados individualmente, em caixas gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) forradas com papel filtro umedecido. Em cada caixa colocou-se um folíolo de soja da cultivar BRS 267 (com o pecíolo embebido em água em um Eppendorf® de 2 mL), um pedaço de algodão hidrófilo comercial (2,0 cm diâmetro) e o alimento (uma semente de amendoim). Em outro

tratamento usou-se uma vagem de soja da mesma cultivar em estágio R6, um pedaço de algodão e o alimento (uma semente de amendoim).

As caixas foram observadas diariamente durante doze dias, as posturas foram removidas de cada substrato e o número de posturas, ovos e ovos/postura foi avaliado. O número médio e a porcentagem média de posturas e ovos/postura foram calculados para cada substrato.

Para o teste de múltipla escolha, oito casais de *E. heros* foram avaliados utilizando-se a mesma metodologia descrita anteriormente, exceto que neste bioensaio os substratos (folíolo e vagem de soja e algodão hidrófilo) foram oferecidos aos insetos simultaneamente. Os casais foram mantidos em BOD (25 ± 1 °C, $65 \pm 5\%$ UR, fotofase 14h) e observados diariamente durante três dias. O número médio e a porcentagem média de posturas, ovos e ovos/postura foram calculados.

3.2.2. Oviposição em substratos artificial vs. natural utilizando plantas inteiras de soja

Para complementar o estudo anterior, no qual foram testados folíolos e vagens de soja destacados da planta, um teste adicional foi conduzido com plantas inteiras de soja, buscando-se eliminar algum possível efeito negativo causado pela remoção dos folíolos e vagens da planta; Moraes *et al.* (2005) observaram que danos mecânicos em soja induzem a emissão de voláteis específicos que influenciam na interação inseto-planta.

Dez casais de *E. heros* foram colocados em gaiolas teladas (50 x 50 x 30 cm) contendo um vaso com duas plantas de soja (cultivar BRS 267) na fase reprodutiva de desenvolvimento (R6). Dois pedaços de algodão hidrófilo (2,0 cm diâmetro) foram amarrados com fio de nylon, em cada planta, sendo um fixado na parte basal e outro na parte apical da planta. As gaiolas foram mantidas

em sala climatizada (25 ± 1 °C, $65 \pm 5\%$ UR, fotofase 14h) e observadas diariamente durante quatro dias. O número médio e a porcentagem média de posturas, ovos e ovos/postura foram calculados.

3.2.3. Avaliação da viabilidade de ovos *Euschistus heros* depositados em diferentes substratos

Posturas de *E. heros* depositadas no algodão hidrófilo ($n = 640$ ovos), folíolos de soja ($n = 321$ ovos) e vagens de soja ($n = 312$ ovos), foram coletadas no dia da oviposição e colocadas individualmente, em placas de Petri (9,0 x 1,5 cm) forradas com papel filtro umedecido, para evitar a dessecação. As placas foram mantidas em condições controladas (25 ± 1 °C, $70 \pm 5\%$ UR, fotofase 14 h) e o número de ninfas eclodidas foi avaliado diariamente. A porcentagem de eclosão foi calculada para cada substrato testado.

3.2.4. Análise dos dados

O número médio de posturas, de ovos e ovos/postura foi calculado e submetido à análise de variância (ANOVA). As porcentagens de posturas e ovos foram transformadas em arcoseno $\sqrt{x + 1}$ para comparação pelo teste de Tukey para comparações múltiplas e pelo teste t de Student para comparar duas médias, utilizando-se o programa estatístico SAS 8.2. (SAS Institute 1981, Zar 1984).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Oviposição em substrato artificial vs. natural utilizando partes de plantas de soja

Fêmeas de *E. heros* apresentaram preferência em ovipositar no algodão hidrófilo quando este substrato foi comparado com o substrato natural (vagens e folíolos de soja).

O número médio de posturas foi 40 vezes maior no substrato artificial do que no folíolo de soja e, a porcentagem média de posturas foi significativamente maior no algodão (98,6%) do que no folíolo (1,4%) (Tabela 3.1). Além disso, o número médio de ovos/postura foi numericamente maior no algodão (4,2) do que no folíolo de soja (2,0), mas como ocorreu apenas uma postura no folíolo, não foi possível realizar a comparação estatística dos dados.

Observou-se preferência de oviposição de *E. heros* pelo substrato artificial, semelhante ao observado no tratamento anterior quando se comparou o algodão com vagem de soja. O número de posturas e de ovos foi cinco vezes maior no algodão do que nas vagens. A porcentagem de posturas foi de 80% no algodão contra 20% na vagem e apenas o número médio de ovos/postura não foi significativamente diferente entre os dois substratos (Tabela 3.1).

No teste de múltipla escolha onde, algodão, folíolo e vagem de soja foram oferecidos simultaneamente, observaram-se três vezes mais posturas depositadas no algodão do que no folíolo e 30 vezes mais no algodão comparado com a vagem. O número médio de ovos foi aproximadamente 5 e 26 vezes maior no algodão do que no folíolo e na vagem, respectivamente. A porcentagem de posturas foi significativamente ($P < 0,05$) maior no algodão (74,3%), seguida pelo folíolo (23,6%) e pela vagem de soja (2,1%). Além disso, o número médio de ovos/postura foi

significativamente maior no algodão do que no folíolo de soja sendo que, na vagem de soja apenas uma postura foi depositada, impedindo a inclusão dos dados na análise estatística (Tabela 3.2).

De modo geral, o número de ovos/postura foi baixo em todos os substratos testados, considerando que *E. heros* geralmente, oviposita de 3 a 14 ovos/postura (Villas Bôas & Panizzi 1980); isso que pode estar relacionado às características genéticas e/ou fisiológicas da população de insetos utilizada em ambos os experimentos.

Tabela 3.1. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por *Euschistus heros* em substratos artificial e natural em teste de dupla escolha em laboratório.

Substrato	Número médio ($\pm$ EP) ¹				Média ($\pm$ EP) de ovos/postura
	Posturas	Posturas (%) ²	Ovos	Ovos (%) ²	
Algodão vs.	8,2 $\pm$ 1,9 a	98,6 $\pm$ 3,2 a	39,2 $\pm$ 10,8 a	99,4 $\pm$ 0,6 a	4,2 $\pm$ 0,6 [41] ^{3,4}
Folha de soja	0,2 $\pm$ 0,2 b	1,4 $\pm$ 1,43 b	0,4 $\pm$ 0,4 b	0,6 $\pm$ 0,6 b	2,0 [1] ⁴
Algodão vs.	2,2 $\pm$ 2,0 a	80,0 $\pm$ 11,8 a	10,2 $\pm$ 6,4 a	75,2 $\pm$ 18,1 a	5,0 $\pm$ 0,6a [11]
Vagem de soja	0,4 $\pm$ 0,4 b	20,0 $\pm$ 11,8 b	2,2 $\pm$ 1,9 b	24,8 $\pm$ 18,1 b	5,5 $\pm$ 2,8a [2]

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

² Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x + 1}$ para análise de comparação.

³ Número de posturas colocado em cada substrato, entre colchetes.

⁴ A comparação estatística não foi realizado porque apenas um valor foi obtido para folha de soja.

Tabela 3.2. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por *Euschistus heros* em substratos artificial e natural em teste de múltipla escolha em laboratório.

Substrato	Número médio ($\pm$ EP) ¹				Média ($\pm$ EP) de ovos/postura
	Posturas	Posturas (%) ²	Ovos	Ovos (%) ²	
Algodão	3,2 $\pm$ 0,6 a	74,3 $\pm$ 8,3 a	30,9 $\pm$ 3,9 a	83,2 $\pm$ 7,8 a	11,0 $\pm$ 1,1 a [26] ^{3,4}
Folha de Soja	1,0 $\pm$ 0,3 b	23,6 $\pm$ 6,9 b	6,4 $\pm$ 3,3 b	14,6 $\pm$ 6,0 b	6,5 $\pm$ 0,9 b [8]
Vagem de soja	0,1 $\pm$ 0,1 b	2,1 $\pm$ 2,1 c	1,2 $\pm$ 1,2 c	2,2 $\pm$ 2,1 b	10,0 [1] ⁵

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05).

² Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x + 1}$ para análise de comparação.

³ Número de posturas colocado em cada substrato, entre colchetes.

⁴ Médias comparadas usando o teste t de Student (P < 0,05).

⁵ Dados não incluídos na análise estatística porque apenas um valor foi obtido para vagem de soja.

3.3.2. Oviposição em substrato artificial vs. natural utilizando plantas inteiras de soja

Euschistus heros depositou 58% das posturas sobre os pedaços de algodão amarrados nas plantas de soja. Embora a área natural (planta) disponível para que as fêmeas depositassem seus ovos fosse maior, apenas 36% das posturas foram depositadas nos folíolos e apenas cerca de 6% nas vagens (Fig. 3.1). *E. heros* é conhecido por apresentar preferência em ovipositar em folhas de soja

comparadas com as vagens (Villas Bôas & Panizzi 1980), diferente do que se observa para outros pentatomídeos como *P. guildinii* (Panizzi & Smith 1977).

Esses resultados demonstram de maneira conclusiva, que para o percevejo marrom o algodão hidrófilo foi o substrato de oviposição preferido.

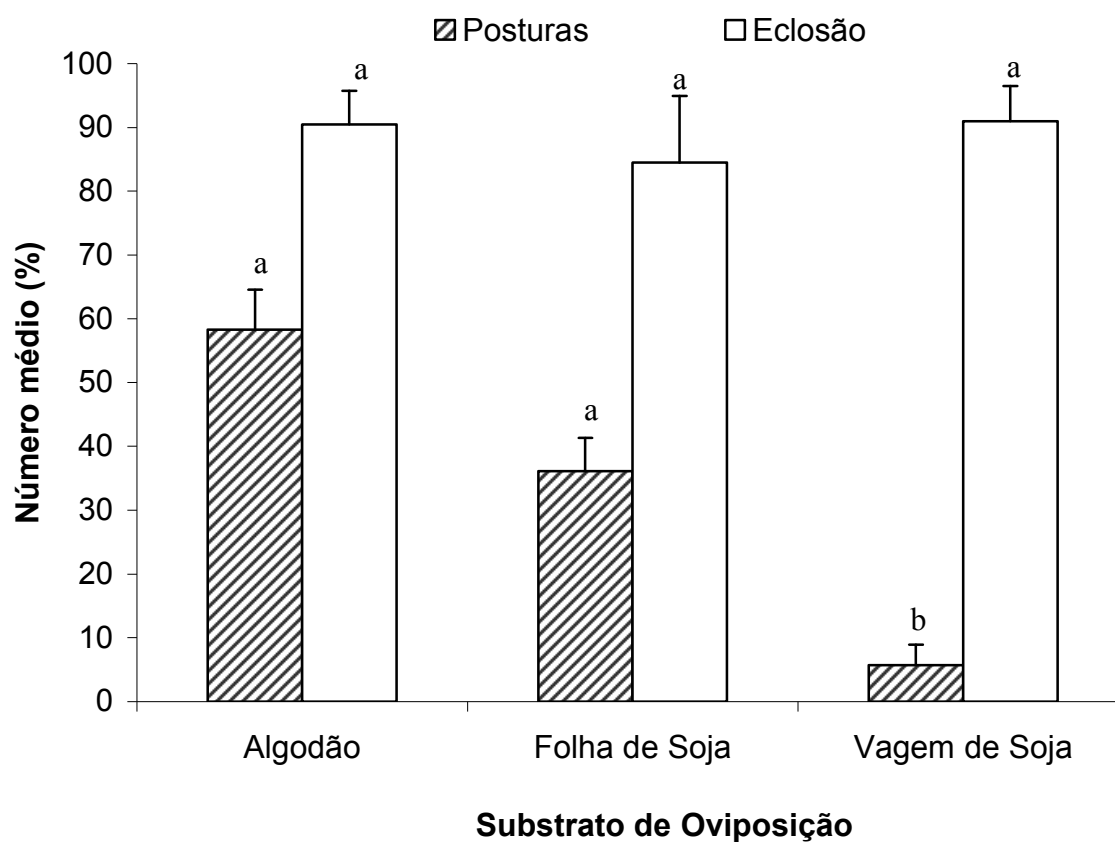


Figura 3.1. Porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e porcentagem de eclosão de ninfas de *Euschistus heros* originadas de ovos depositados sobre algodão e planta de soja. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x + 1}$ para análise de comparação.

3.3.3. Viabilidade de ovos de *E. heros* depositados sobre algodão hidrófilo e plantas de soja

Posturas depositadas em substrato artificial e natural (58,3% no algodão; 36,1% nos folíolos de soja e 5,7% nas vagens de soja) mostraram porcentagem de eclosão semelhante. Observou-se porcentagem média de eclosão de 90,5% no algodão, 84,5% nos folíolos e 91% nas vagens de soja (Fig. 3.1). Esses resultados reforçam dados preliminares (Silva & Panizzi 2007) que demonstraram que as ninfas de *E. heros* recém-eclodidas não são afetadas pelas fibras de algodão que eventualmente recobrem as posturas.

Portanto, esse estudo confirma a viabilidade de uso do algodão hidrófilo comercial como substrato para concentrar as posturas de *E. heros*, em condições de laboratório, além de permitir que os ovos sejam arranjados na postura de forma semelhante àquela encontrada na natureza e sem prejudicar a eclosão das ninfas. Rotineiramente, o uso do algodão como substrato de oviposição tem facilitado a manutenção das colônias de percevejos, pois as posturas concentradas sobre ele são facilmente removidas com auxílio de pinça e transferidas para as caixas de criação de ninfas (Fig. 3.2 B) (Silva & Panizzi 2007).

Adicionalmente, o potencial de uso deste substrato artificial pode ser intensificado com estudos que investiguem a possibilidade de oferecer diretamente, as “bolinhas” de algodão contendo as posturas de *E. heros* ao parasitóide de ovos, *Telenomus podisi* (Ashmead) (Hymenoptera: Scelionidae), espécie comumente criada em laboratório para liberação massal no campo e que preferencialmente, parasita ovos de *E. heros* (Corrêa-Ferreira & Moscardi 1995, Sujii *et al.* 2002). Portanto, se a capacidade de parasitismo e a emergência dos parasitóides não forem afetadas, será possível utilizar o algodão contendo as massas de ovos parasitados diretamente no campo. Isso irá

tornar o processo atual, em que os ovos são reunidos em cartelas e então oferecidos aos parasitóides, muito mais prático e eficiente, com economia de tempo e recursos.

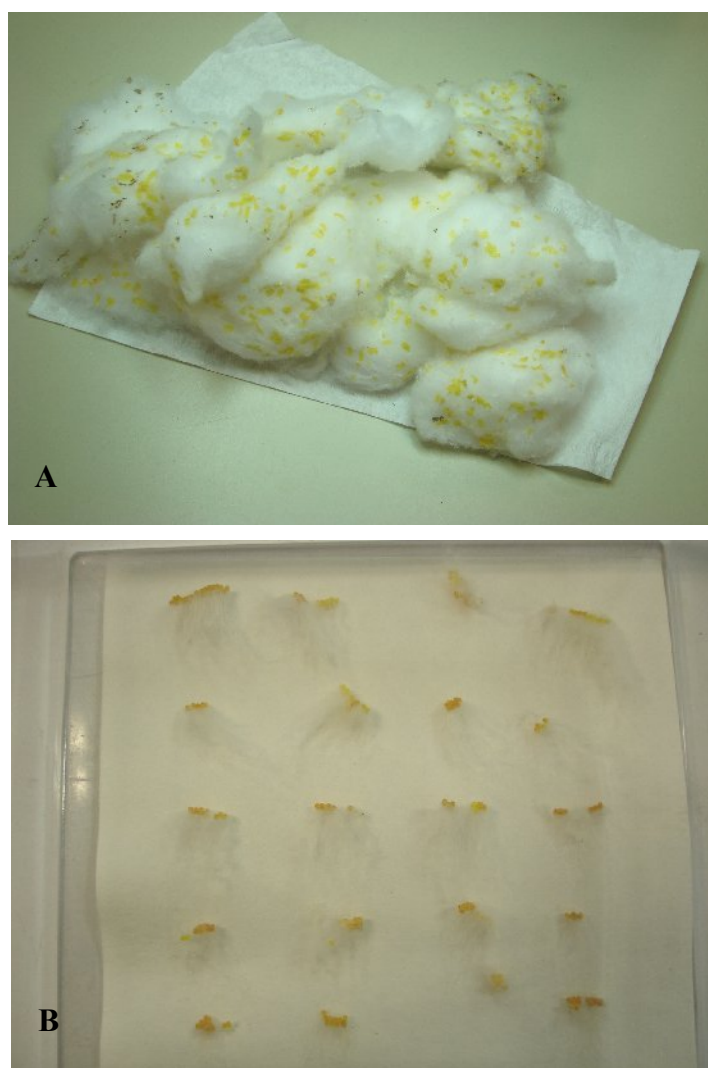


Figura 3.2. A) Posturas de *Euschistus heros* depositadas sobre algodão hidrófilo e coletadas durante manutenção das colônias em laboratório. B) Posturas retiradas do algodão (com auxílio de pinça) e colocadas em caixa gerbox forrada com papel filtro umedecido.

3.4. Literatura citada

- Bundy, C.S. & R.M. McPherson. 2000.** Morphological examination of stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) eggs on cotton and soybeans, with a key to genera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 616-624.
- Borges, M., M.L.M. Costa, E.R. Sujii, M.A.G. Medeiros, G.F. Redígolo, I.S. Resck & E.F. Vilela. 1999.** Semiochemical and physical stimuli involved in host recognition by *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae) towards *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Physiol. Entomol.* 24: 227-233.
- Borges, M., S. Colazza, L.P. Ramirez-Lucas, K.R. Chauhan, M.C.B. Moraes & J.R. Aldrich. 2003.** Kairomonal effect of walking traces from *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) on two strains of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). *Physiol. Entomol.*, 28: 349-355.
- Corrêa-Ferreira, B.S. & F. Moscardi. 1995.** Seasonal occurrence and host spectrum of egg parasitoids associated with soybean stink bugs. *Biol. Control* 5: 196-202.
- Corrêa-Ferreira, B.S. 2002.** *Trissolcus basal* para o controle de percevejos da soja. In Parra, J.R.P., P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento. (eds.) *Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores*. Manole, São Paulo, Brasil, 609 p.

- Moraes, M.C.B., R. Laumann, E.R. Sujii, C. Pires & M. Borges. 2005.** Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. Entomol. Exp. Appl. 155: 227-237.
- Panizzi, A.R. & J.G. Smith. 1977.** Biology of *Piezodorus guildinii*: Oviposition, development time, adult sex ratio and longevity. Ann. Entomol. Soc. Am. 70: 35-39.
- Panizzi, A.R. 2004.** Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). In Capinera, J.L. (ed.). Encyclopedia of Entomology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1545 p.
- Panizzi, A.R., J.E. McPherson, D.G. James, M. Javahery & R.M. McPherson. 2000a.** Stink bugs (Pentatomidae). In Schaefer, C.W. & A.R. Panizzi. (eds.). Heteroptera of economic importance. CRC Press, Boca Raton, FLórida, USA. 474 p.
- Panizzi, A.R., J.R.P. Parra, C.H. Santos & D.R. Carvalho. 2000b.** Rearing the southern green stink bug using an artificial dry diet and an artificial plant. Pesq. Agropec. Brasil. 35: 709-1715.
- Panizzi, A.R., M. Berhow & R.J. Bartelt. 2004.** Artificial substrate bioassay for testing oviposition of southern green stink bug conditioned by soybean plant chemical extracts. Environ. Entomol. 33: 1217-1222.

- Panizzi, A.R. & C.H. Santos. 2001.** Unusual oviposition on the body of conspecifics by phytophagous heteropterans. *Neotrop. Entomol.* 30: 471-472.
- Peres, W.A.A. & B.S. Corrêa-Ferreira. 2001.** Nymphal and adult performance of *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae), as a potential alternative host for egg parasitoids multiplication. *Neotrop. Entomol.* 30: 535-540.
- Rizzo, H.F. 1976.** Hemípteros de interés agrícola. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 69 p.
- SAS Institute. 1981.** SAS for linear models. A guide to the ANOVA and GLM procedures. SAS Institute, Cary, N.C.
- Shearer, P.W. & V.P. Jones. 1996.** Suitability of macadamia nut as a host plant of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 996-1003.
- Silva, F.A.C. & A.R. Panizzi. 2007.** Cotton balls as an oviposition substrate for laboratory rearing of phytophagous stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 100: 745-748.
- Silva, F.A.C. & A.R. Panizzi. 2008.** The adequacy of artificial oviposition substrates for laboratory rearing of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera, Pentatomidae). *Rev. Bras. Entomol.* 52: 131-134.

- Silva, C.C., R.A. Laumann, M.C. Blassioli, M. Pareja & M. Borges. 2008.** *Euschistus heros* mass rearing technique for the multiplication of *Telenomus podisi*. Pesq. Agropec. Bras. 43: 575-580.
- Sosa-Gomez, D.R., I.C. Corso & L. Morales. 2001.** Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and metamidophos in the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). Neotrop. Entomol. 36: 317-320.
- Sujii, E.R., M.L.M. Costa, C.S.S. Pires, S. Colazza & M. Borges. 2002.** Inter and intra-guild interactions in egg parasitoid species of the soybean stink bug complex. Pesq. Agropec. Brasil. 37: 1541-1549.
- Villas Bôas, G. L. & A.R. Panizzi. 1980.** Biologia de *Euschistus heros* (Fabricius, 1789) em soja (*Glycine max* L. Merrill). An. Soc. Entomol. Brasil 9: 105-113.
- Zar, J.H. 1984.** Biostatistical analysis, 2nd ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.

CAPÍTULO 4

Análise do perfil químico de vagens verdes de soja da cultivar BRS 267

4.1. Introdução

Parâmetros morfológicos e bioquímicos estão envolvidos no processo de escolha dos insetos pelas plantas hospedeiras (Norris & Kogan 1980) sendo que, muitos compostos fitoquímicos podem influenciar no comportamento de busca por locais para oviposição (Bernays & Chapman 1994). Deste modo, a identificação de compostos químicos, que atuam como estimulantes de oviposição para diferentes espécies de insetos, vem ganhando importância nas últimas décadas, devido ao potencial de uso na manipulação do comportamento de pragas no campo (Städler 1992), além de servir como ferramentas para estudos em laboratório.

Várias pesquisas com diferentes espécies de plantas demonstram que substâncias presentes na superfície das folhas (Jackson *et al.* 1986, Derridj *et al.* 1996, Lin *et al.* 1998, Morris *et al.* 2000, Coyle *et al.* 2003) e frutos (Lombarkia & Derridj 2002) atuam como estimulantes de oviposição para insetos de diferentes ordens. Entretanto, há poucos estudos sobre o papel das substâncias químicas originárias de plantas na preferência de oviposição de Heteroptera (Dwumfour 1992, Constant *et al.* 1996), embora haja inúmeras referências a outros grupos como Lepidoptera e Diptera, entre outras ordens mencionadas (Renwick 1989, Städler & Schöni 1990, Foster & Harris 1992, Honda 1995, Udayagiri & Mason 1995, Hilker & Meiners 2002, Städler 2002).

Em estudo com o percevejo-verde, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae), Panizzi *et al.* (2004) observaram que extratos de soja podem atuar como condicionantes de

oviposição. Com base neste estudo, tem-se buscado identificar compostos químicos presentes em vagens de soja que possam ser utilizados para condicionar a oviposição dos percevejos em substratos artificiais, auxiliando na manutenção de colônias em laboratório.

Para identificação dos diferentes compostos químicos selecionou-se a cultivar de soja BRS 267, por tratar-se de um genótipo suscetível ao ataque de percevejos. Esta soja apresenta sabor mais adocicado, podendo inclusive ser consumida ainda verde, sendo considerada ideal para alimentação humana (Silva & Carrão-Panizzi 2004). Por esta razão, acredita-se que esta cultivar possui compostos químicos mais atrativos aos percevejos.

Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar o perfil químico de vagens de soja da cultivar BRS 267, identificando alguns compostos para posterior utilização em bioensaios de atratividade com pentatomídeos fitófagos.

4.2. Material e métodos

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Bioecologia de Percevejos, no Laboratório de Melhoramento Genético da Embrapa Soja, Londrina, PR e no Laboratório de Ecologia e Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, de outubro de 2006 a setembro de 2007.

4.2.1. Cultivo das plantas de soja

Sementes de soja (cultivar BRS 267) foram semeadas em vasos de plástico (5,0 L) contendo solo esterilizado. Os vasos foram colocados em casa de vegetação em condições controladas de temperatura (28 °C), umidade relativa ($70 \pm 10\%$), luminosidade (25000 Lux) e fotoperíodo (14hL: 10hE). Para todos os ensaios foram utilizadas plantas no estágio reprodutivo (R6) (Fehr *et al.* 1971).

4.2.2. Extração, identificação e quantificação de compostos totais em vagens de soja

Para obtenção do extrato bruto, 136 g de vagens de soja (estágio R6) foram liofilizadas, moídas em liquidificador e adicionadas a um balão volumétrico equipado com extrator Soxhlet contendo 800 mL de éter de petróleo. O material foi refluxado por 24 horas e em seguida a solução foi separada e o resíduo sólido foi refluxado em 800 mL de metanol por 48 horas. A solução metanólica obtida foi concentrada sob vácuo a 40 °C, resultando em um material viscoso (24,8 g) que foi submetido às análises cromatográficas e aos testes biológicos. O resíduo sólido foi descartado.

4.2.3. Fracionamento e derivatização do extrato bruto

Para o fracionamento dos extratos utilizou-se uma coluna de vidro de 20 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro, preenchida com 2,0 g de sílica gel (Sigma, malha de 70-230, 63-200 μ , diâmetro médio do poro 60 Å). A coluna foi eluída com 5,0 mL de metanol e 5,0 mL de hexano. Diluiu-se 50 mg do extrato bruto de vagens soja em 5,0 mL de hexano e adicionou-se 1,0

mL da solução na parte superior da coluna. Em seguida a coluna foi eluída com um gradiente de solventes diluídos em água, primeiramente o hexano (de 20 a 100%) e em seguida o metanol (de 20 a 100%). Para cada concentração de solvente foram realizadas três eluições e as amostras foram coletadas separadamente, para análise e uso em bioensaios.

Para extração de alguns compostos não voláteis foi conduzida uma extração na fase líquida (EFL) com a derivatização do extrato. Para tanto, vagens de soja foram moídas em nitrogênio líquido e 100 mg do material ainda congelado foi transferido para um frasco de 10 mL onde adicionou-se 3 mL de HCl (0,001 M) e a solução foi sonicada durante 10 minutos. A amostra foi extraída com 10 mL de éter etílico e o sobrenadante foi transferido para um frasco de 30 mL. O solvente foi evaporado sobre fluxo de nitrogênio filtrado. Adicionou-se a cada amostra 0,1 mL de padrão interno (η -tetracosano 5,0 $\mu\text{g/mL}$), a solução foi evaporada novamente e adicionou-se 0,1 mL de *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamina (MSFTA). A solução foi aquecida a 60 °C por 1 hora. Foram preparadas três amostras. As amostras foram analisadas diretamente por cromatografia gasosa (CG).

4.2.4. Extração, identificação e quantificação de compostos voláteis

Para extração dos compostos voláteis de vagens de soja adaptou-se a metodologia de Moraes *et al.* (2005). Para tanto, as vagens (25 g) foram colocadas em câmaras de vidro (5 L) adaptadas para coleta de compostos voláteis. Na tampa de cada câmara foram feitos dois furos para conectar tubos de vidro (8,0 cm comp. x 0,7 cm diâmetro) contendo 60 mg de adsorvente químico Super Q (co-polímero de *p*-devinilbenzeno-vinilbenzeno) (Alltech, malha de 80/100; Alltech Associates Inc., Deerfield, Illinois, EUA). As câmaras foram aeradas durante 24 horas, com ar filtrado através de

carvão ativado em fluxo contínuo de $1.200 \text{ mL min}^{-1}$. Após a aeração os adsorventes químicos foram retirados e eluídos com aproximadamente 1,0 mL de hexano. A solução obtida foi concentrada a 200 μL , com auxílio de N_2 puro.

Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa (Perkin-Elmer, Überlingen, Alemanha, usando uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 μm de espessura; J&W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA). A coluna foi mantida a 50 °C por dois minutos e em seguida programada a 5 °C min^{-1} até 180 °C/0,1 s e 10 °C /min até 250 °C/20 minutos. Foi injetado 1,0 μL de amostra. Os dados foram coletados com o Software Autosystem e foram analisados usando o programa Origin 5.0 (Microcal Software). Para a quantificação dos compostos foi comparada a área da base dos picos de cada composto com a área total do padrão interno utilizado (η -tetracosano 5 $\mu\text{g/mL}$). Foram analisadas três amostras.

Para comparar os voláteis emitidos os extratos selecionados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) usando um equipamento Shimadzu QP-2010, detector seletivo de massa (Schimadzu Corp., Kyoto, Japão), com ionização de impacto de elétrons (70 eV). Utilizou-se uma coluna TRB-5 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 μm de espessura; Teknokroma, Barcelona, Espanha) usando o mesmo programa de temperatura da análise por cromatografia gasosa, o injetor foi mantido a 250 °C e a injeção foi no modo *splitless*, a linha de transferência foi mantida a 250 °C. Os compostos foram identificados através da comparação do tempo de retenção e do espectro de massa com padrões autênticos.

4.2.5. Extração, identificação e quantificação de açúcares totais

Para identificação dos açúcares foi realizada a diluição de 10,0 mg do extrato bruto de soja em 1,0 mL de metanol. A solução foi derivatizada com MSFTA e 1,0 µL foi injetado e analisado em cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Foram analisadas três amostras.

Para a determinação do teor de açúcares redutores totais presentes em soja (cultivar BRS 267) foi realizada a análise de Somogy (1945) e Nelson (1944). Foram comparadas amostras de sementes integrais (SI), sementes desengorduradas (SD) e vagens cheias desengorduradas (VD).

Para desengordurar as amostras, inicialmente foi realizada a desidratação das vagens e sementes de soja (R6) em estufa 30 °C durante 24 horas. O material desidratado foi triturado em liquidificador, obtendo-se uma farinha integral. Porções de 5,0 g da farinha integral foram colocadas separadamente em extrator Soxhlet com 100 mL de hexano P.A., durante 6,0 horas. Após a extração, o hexano foi retirado por evaporação e condensação no próprio extrator. A amostra de farinha restante no cartucho foi colocada em estufa para evaporação total do solvente e foi utilizada nas análises.

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram colocados individualmente, 1,0 g de cada amostra (SI; SD e VD), 100 mL de água destilada e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, em seguida a solução foi deixada em banho-maria a 65 °C, por 30 minutos. A solução foi resfriada até 15 °C e teve o pH neutralizado (NaOH 5N). Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 200 mL que teve o volume completado com água destilada. A solução foi filtrada em papel filtro.

Colocou-se 1 mL do material filtrado em tubos de ensaio e acrescentou-se 1,0 mL de Reativo de Somogy (Anexo 4.5.1). A mistura foi levada ao banho-maria fervente por 10 minutos,

tampando os tubos com bolinhas de gude. Os tubos foram resfriados em água corrente e em seguida adicionou-se 1,0 mL de Reativo de Nelson (Anexo 4.5.2) e 7,0 mL de água destilada, agitando a solução em agitador magnético por 3 minutos. Foram realizadas três repetições para cada tipo de amostra (SI; SD e VD) e as amostras foram analisadas em espectrofotômetro (Cecil mod. 3000) com absorvância em 535 nm.

Para o cálculo do teor de açúcares redutores totais foi utilizada a fórmula:

$$\% \text{ Somogy Nelson} = \frac{A \cdot D \cdot K \cdot 100}{1.000.000} = \quad \text{ou} \quad \frac{A \cdot K \cdot 100}{\mu\text{g}} \quad \text{onde:}$$

A = absorvância da amostra

K = constante da curva padrão de glicose (Anexo 4.5.3)

D = volume da diluição do material inicial

μg = massa da amostra presente na alíquota da reação, em microgramas

4.2.6. Extração, identificação e quantificação de isoflavonas

Realizou-se a identificação e quantificação de isoflavonas presentes no extrato bruto de vagens de soja e nas vagens *in natura*, adaptando-se a metodologia proposta por Kudou *et al.* (1991). Para tanto, amostras de 100 mg de vagens de soja (estágio R6) foram moídas e colocadas em tubos de ensaio com 4,0 mL de etanol aquoso a 70%, contendo 0,1% de ácido acético, à temperatura ambiente por uma hora e agitados a cada 15 minutos.

Nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), 1,5 mL de amostra foi centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm, a 4 °C (centrífuga Eppendorf mod. 5417R). Em seguida,

o sobrenadante foi filtrado com membrana 0,45 μm e transferido para os frascos de vidro depositados nas bandejas do auto-aplicador de amostras do cromatógrafo. Para cada amostra (extrato bruto e vagem *in natura*) foram injetados 20 μL , em triplicata.

As análises de isoflavonas foram realizadas em cromatógrafo líquido (Waters, mod. 2690), com injetor automático de amostras. Foi utilizada coluna de fase reversa do tipo ODS C18 (YMC Pack ODS-AM Column) com 250 mm de comprimento x 0,4 mm de diâmetro interno e partículas de 5 μm .

Para a separação das isoflavonas, adotou-se o sistema de gradiente linear binário, tendo-se como fases móveis: 1) metanol contendo 0,025% de ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A) e 2) água destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% de TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A, que aos 40 minutos atingiu a concentração de 100% para, em seguida, retornar a 20% aos 41 minutos e permanecer nestas condições até os 60 minutos. Portanto, o tempo total de corrida para cada amostra foi de 60 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/min e a temperatura durante a corrida foi de 24 °C. Para a detecção das isoflavonas, foi utilizado um detector de arranjo de foto diodo (Waters, mod. 996), ajustado para o comprimento de onda igual a 260 nm.

Para a identificação dos picos correspondentes a cada uma das isoflavonas foram utilizados padrões de glicitina, daidzina, daidzeína, genistina e genisteína (Sigma), solubilizados em metanol (grau HPLC), nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL, respectivamente.

Para a quantificação das 12 formas de isoflavonas, por padronização externa (área dos picos), foram utilizados os padrões como referência, bem como o coeficiente de extinção molar de cada uma delas para o cálculo das outras formas (malonil e acetil).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Perfil químico do extrato e das frações derivatizadas do extrato de vagens de soja

Quando o extrato de vagens de soja foi fracionado com diferentes concentrações de hexano (fração apolar) e metanol (fração polar), observou-se pela análise de cromatografia gasosa que a maior parte dos compostos presentes no extrato bruto foi separada na fração polar e apenas uma pequena parte dos compostos foi separada na fração apolar (Figs. 4.1 A, B e C). A maioria dos compostos detectados nas amostras do extrato bruto e na fração de metanol apresenta baixa volatilidade, indicada pelo maior tempo de retenção (acima de 25 min) na coluna cromatográfica.

Panizzi *et al.* (2004) demonstraram que a fração metanólica (polar) obtida de extrato de vagens de soja apresenta efeito condicionante de oviposição para *N. viridula*. Em estudo semelhante, Gouinguéné *et al.* (2005) compararam a atividade biológica de diferentes frações de extrato de bulbo de cebola para a mosca *Delia antiqua* (Meigen) (Diptera: Anthomyiidae) e observaram que compostos voláteis presentes nas frações polares também atuam como estimulantes de oviposição. Devido às diferenças observadas entre os perfis químicos do extrato de vagens de soja 'BRS 267' e das frações do extrato, a ação biológica sobre os percevejos foi avaliada, no capítulo 5.

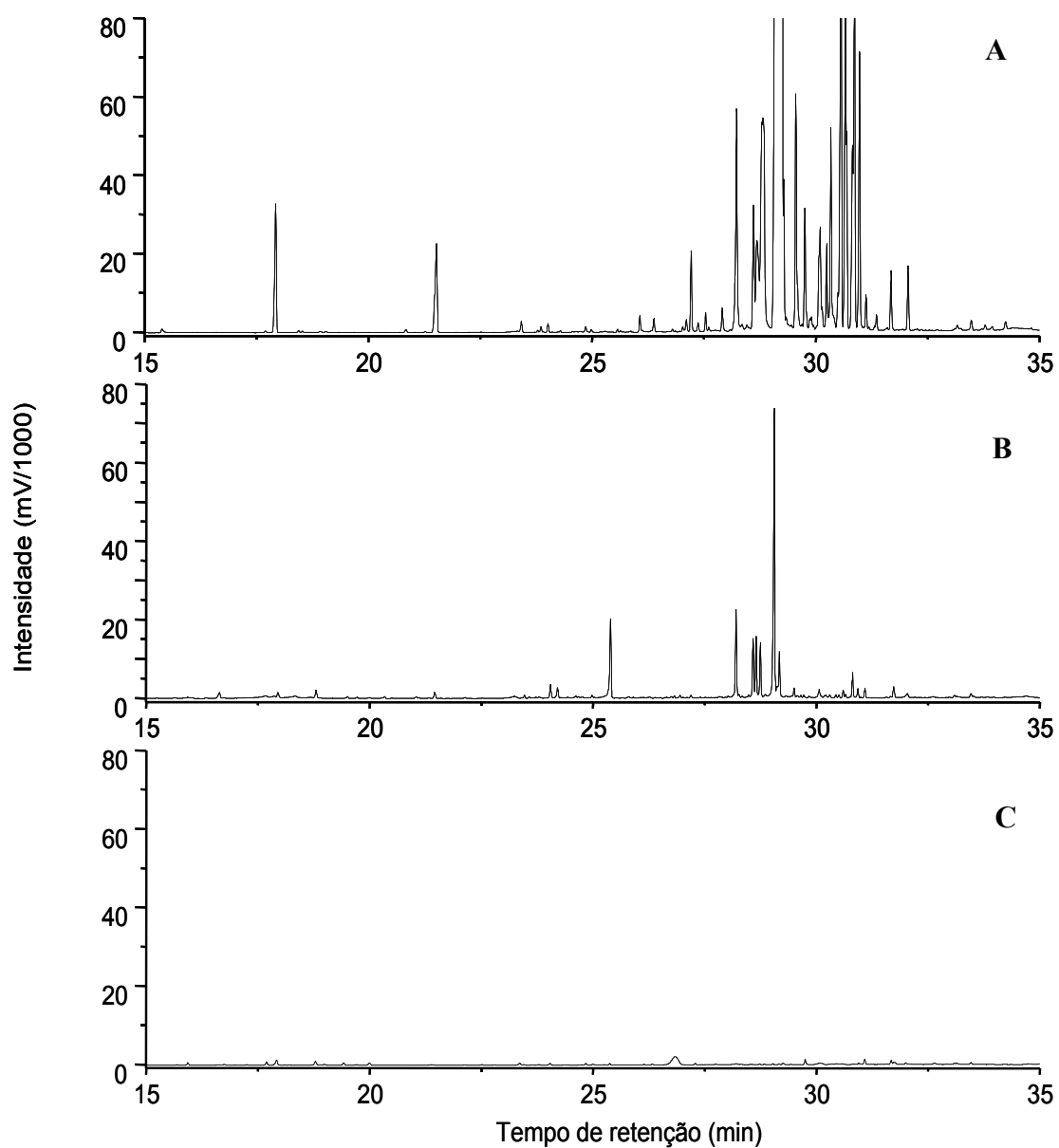


Figura 4.1. Perfil químico das amostras de extrato de vagens verdes de soja 'BRS 267' derivatizadas com MSFTA, obtido por análise em cromatografia gasosa: A) extrato bruto; B) fração de metanol (100%) e C) fração de hexano (100%).

4.3.2. Identificação e quantificação de compostos voláteis em vagens de soja

Os principais compostos voláteis identificados em vagens de soja BRS 267 foram: (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexen-1-ol, 1-octen-3-ol, 3-octanona, tridecano, pentadecano e hexadecano. Os compostos e suas respectivas concentrações estão agrupados por grupos químicos na Tabela 4.1.

Boué *et al.* (2003) compararam os voláteis presentes em sementes de soja em diferentes estágios de desenvolvimento, e observaram que no estágio inicial (R6) as sementes apresentam maiores concentrações de 3-hexanona, (*E*)-2-hexenal, 1-hexanol e 3-octatona. A concentração desses compostos reduz nos estágios mais avançados (R7 e R8), observando-se aumento na concentração de hexanal, (*E*)-2-heptenal, (*E*)-2-octenal, etanol, 1-hexanol e 1-octen-3-ol. Para os autores, esses voláteis podem servir como indicadores do estágio de maturidade da planta e como marcadores bioquímicos para avaliar a qualidade das sementes.

Os voláteis de soja presentes em sementes cruas e torradas foram analisados por Rosario *et al.* (1984), que observaram concentrações maiores de ácido acético, 2-metil e 3 metil-1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, α -pineno e limoneno em soja crua. Nas sementes torradas observaram-se concentrações maiores de 1-octen-3-ol, pentanal, hexanal e acetona.

Tabela 4.1. Concentração média dos compostos voláteis obtidos por aeração forçada de vagens de soja (cultivar BRS 267) em estágio R6.

Compostos voláteis presentes vagens de soja	Concentração média ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) ($\pm \text{EP}$)
<i>Alcoois</i>	
(Z)-3-hexen-1-ol	$1,5399 \pm 1,798$
Hexanol	$0,3525 \pm 0,303$
Nonanol	$0,39972 \pm 0,227$
1-Octen-3-ol	$5,1912 \pm 29,752$
(E)-2-None-1-ol	$0,2007 \pm 0,161$
2,6 nonadiol	$0,4077 \pm 0,182$
<i>Aldeídos</i>	
(E)-2-Hexenal	$1,2744 \pm 0,386$
Nonanal	$1,7516 \pm 1,070$
Decanal	$2,2024 \pm 1,064$
<i>Cetonas</i>	
3-Octanona	$3,6147 \pm 2,062$
<i>Alcanos</i>	
Geranil acetona	$0,6068 \pm 0,319$
(Z)-3-Hexenil acetato	$1,8824 \pm 2,532$
α -pineno	$0,5113 \pm 0,085$
Canfeno	$1,2547 \pm 0,468$
Mirceno	$3,0285 \pm 1,703$
Undecano	$0,8719 \pm 0,303$
Dodecano	$0,6294 \pm 0,140$
Tridecano	$3,4102 \pm 0,749$
Pentadecano	$3,0876 \pm 0,483$
Hexadecano	$3,1349 \pm 1,137$

Nas amostras de soja BRS 267 não foi detectado o hexanal, embora muitos estudos demonstrem que este composto volátil está presente em quase todos os produtos de soja (Fujimaki *et al.* 1965), que passam por processamentos industriais que geralmente, ativam as enzimas lipoxigenases que participam da formação do hexanal, composto responsável pelo sabor ruim nos derivados de soja. As enzimas lipoxigenases têm como seu principal substrato o ácido linoléico e linolênico, que foram detectados em baixas concentrações nas amostras derivatizadas. Traços dos ácidos ferrúlico e vanílico também foram detectados nas amostras de vagens de soja BRS 267, em estágio R6.

A maioria dos estudos tem avaliado os compostos voláteis presentes em sementes e em alimentos à base de soja, por atuarem como indicadores de atividades bioquímicas que podem produzir diferentes sabores em produtos vegetais (Fujimaki *et al.* 1965, Honig & Rackis 1975, Hsieh *et al.* 1981). Entretanto, ainda são escassas as informações sobre a composição dos voláteis presentes em vagens de soja *in natura*, e seu papel na interação com os insetos.

Liu *et al.* (1989) compararam os voláteis presentes em folhas de cultivares de soja resistente (PI 227687) e suscetível (Davis) ao ataque por *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Os autores observaram a presença de compostos como o 2-hexenal, 4-hexen-1-ol-acetato e 2,2-dimethylhexanal nas duas cultivares, porém em concentrações muito diferentes. Por exemplo, o composto 4-hexen-1-ol-acetato, considerado atrativo aos insetos, foi observado em concentração maior na cultivar suscetível (68%) do que na cultivar resistente (29%). Compostos como o 3-tetradecano e 1-dodecano estão presentes apenas na cultivar resistente, bem como traços de alguns hidrocarbonetos insaturados e terpenóides, indicando que estes compostos possivelmente estão associados com o efeito repelente que esta cultivar apresenta.

Alguns compostos voláteis identificados nas vagens de soja (BRS 267) como o α -pineno e mirceno têm sido relatados como mediadores da atividade alimentar de coleópteros (Fan & Sun 2006). Além disso, o α -pineno é considerado um dos principais compostos envolvidos na escolha de locais para oviposição por cerambrídeos (Ikeda *et al.* 1980). Em muitos casos, esses voláteis podem ser produzidos pelas plantas após o ataque por insetos, como demonstrado por Rodríguez *et al.* (2002), que observaram que a atividade alimentar e de oviposição de fêmeas de *Lygus hesperus* Knight (Heteroptera: Miridae) causa a liberação de α -pineno, mirceno e β -cariofileno. Muitos desses voláteis constitutivos da planta têm sido relatados como importantes na interação entre os insetos herbívoros e seus inimigos naturais (Colazza *et al.* 2004, Moraes *et al.* 2005).

Portanto, a identificação precisa dos compostos voláteis de soja pode servir como ferramenta para muitos estudos, ajudando a esclarecer aspectos envolvidos nos mecanismos de resistência de plantas e na interação tritrófica.

4.3.3. Identificação e quantificação de açúcares totais

Nas amostras derivatizadas com MSFTA foram identificados vários açúcares como galactitol, glucopirranose, *D*-galactose, *D*-galactofuranose e três isômeros de inositol (Fig. 4.2. A, B, C).

A concentração desses açúcares variou de 25,62 $\mu\text{g/mL}$ (*D*-galactofuranose) a 2472,08 $\mu\text{g/mL}$ (scillo-inositol) (Fig. 4.3). O mio-inositol é comumente encontrado em sementes de várias plantas (Cosgrove 1980), entretanto, nas amostras de extrato de vagens de soja analisadas, observou-se concentração maior do scillo-inositol. Este composto na forma livre tem sido freqüentemente detectado em animais e algumas plantas (Posternak 1965). Hou *et al.* (2008)

detectaram a presença de mio-inositol em sementes de soja de diferentes cultivares. Os autores também observaram outros açúcares como sacarose, estaquiose, glicose, frutose e rafinose, sendo os dois primeiros açúcares os que ocorreram em concentrações maiores nos diferentes genótipos estudados.

Dreyer *et al.* (1979) observaram, em soja, a presença de outro isômero do inositol, o 3-*O*-metil-quiroinositol e discutem que este composto pode atuar como um fator de resistência, conferindo à planta efeito antibiótico. Entretanto, em estudo realizado por Schoonhoven & Derksen-Koppers (1973), observou-se que o percevejo *Dysdercus fulvoniger* (De Geer) (Pyrrhocoridae) não teve o comportamento alimentar afetado quando ingeriu solução de inositol 0,01 M.

Muitos açúcares desempenham papel importante no comportamento dos insetos, atuando como fagoestimulantes (Bernays & Chapman 1994) e estimulantes de oviposição (Eisemann & Rice 1985, Derridj *et al.* 1996). Portanto, a identificação e quantificação desses açúcares em soja, bem como a avaliação de sua atividade biológica, podem elucidar mecanismos envolvidos na interação dos insetos com as plantas de soja. Além disso, estudos que demonstrem se há associação entre os comportamentos de busca por alimento e de local de oviposição para pentatomídeos fitófagos, também poderão ser conduzidos utilizando-se açúcares específicos da planta hospedeira desses insetos.

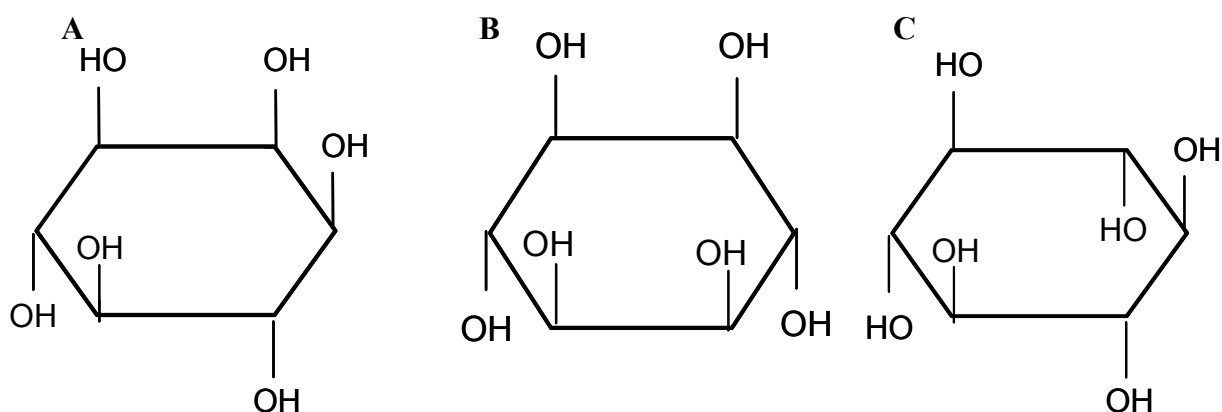


Figura 4.2. Fórmula estrutural de três isômeros de inositol identificados em amostras de extrato de vagens de soja derivatizadas com MSFTA: A) mio-inositol; B) muco-inositol e C) scillo-inositol.

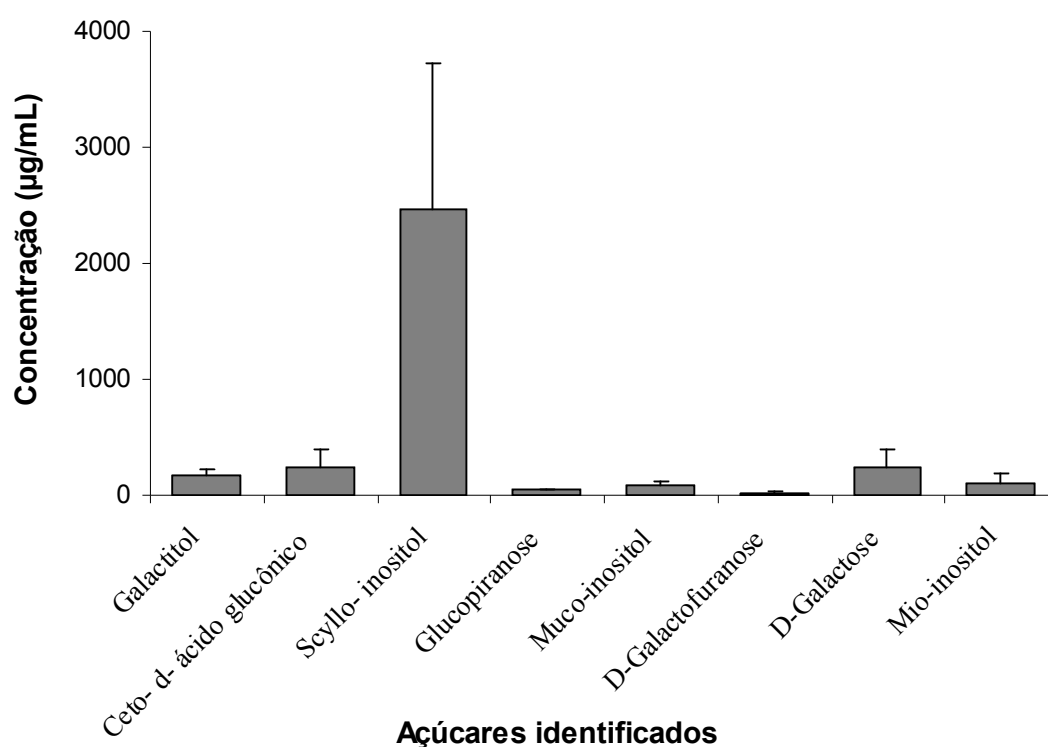


Figura 4.3. Concentração média ($\pm$ EP) de açúcares identificados em extrato de vagens de soja (cultivar BRS 267) derivatizado com MSFTA.

Através da análise de Somogy & Nelson verificou-se que a concentração de açúcares redutores totais foi de 8,3% nas amostras de sementes integrais, 10,9% nas sementes desengorduradas e 9,9% nas vagens cheias desengorduradas (Fig. 4.4). A cultivar BRS 267 apresenta concentração alta de sacarose (Carrão-Panizzi *et al.* 2006), o que lhe confere sabor adocicado característico. É possível que esta característica também atue sobre os comportamentos alimentar e de oviposição dos insetos, pois alguns estudos demonstram que certos açúcares atuam como fagoestimulantes e estimulantes de oviposição (Simmonds *et al.* 1991, Eisemann & Rice 1985). Portanto, a atividade biológica dos diferentes açúcares combinados entre si foi avaliada no Capítulo 5.

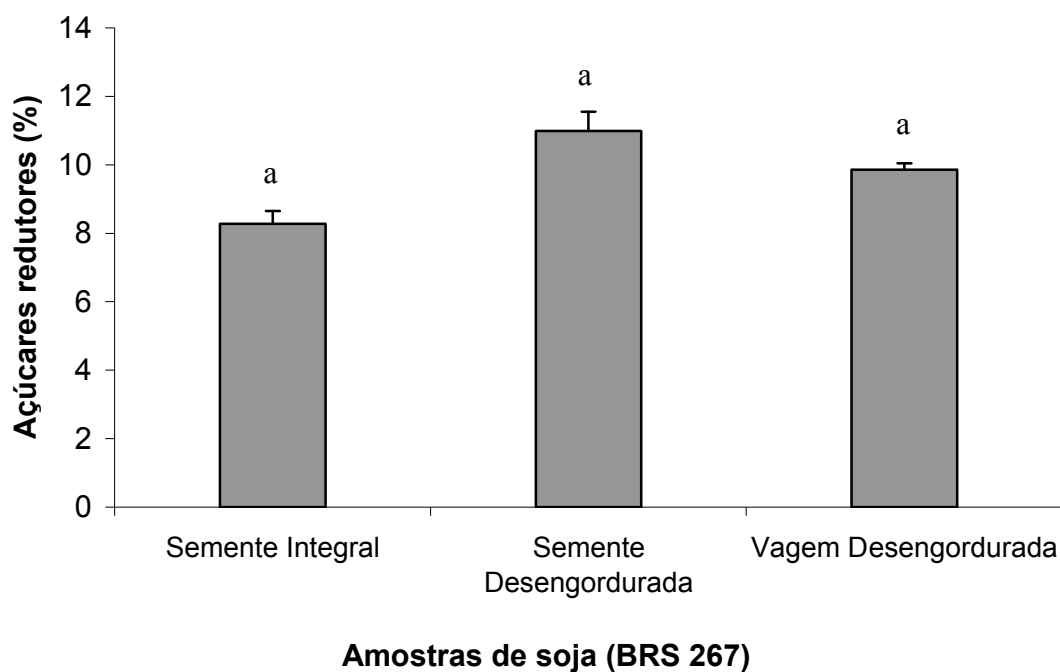


Figura 4.4. Porcentagem média ($\pm$ EP) de açúcares redutores presentes em diferentes amostras de soja R6 (cultivar BRS 267). Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.3.4. Identificação e quantificação de isoflavonas

A análise de isoflavonas presentes no extrato bruto de vagens de soja indicou concentrações maiores das formas glicosídicas daidzina, genistina e glicitina, respectivamente. Observaram-se baixas concentrações das formas malonil-glicitina e malonil-genistina. (Fig. 4.5).

Genistina, daidzina e suas formas agliconas, genisteína e daidzeína são as principais isoflavonas encontradas em soja (Murphy 1982). As formas acetil e malonil são termicamente instáveis e são convertidas nas suas formas glicosídicas correspondentes quando aquecidas (Kudou *et al.* 1991, Carrão-Panizzi *et al.* 2004). Avaliando diferentes cultivares de soja, Park *et al.* (2001) observaram aumento no teor de isoflavonas glicosídicas com extração após aquecimento. Portanto, isso pode explicar as concentrações mais elevadas das formas de isoflavonas glicosídicas do que malonil, observadas no extrato bruto de vagens de soja, pois este foi obtido por aquecimento (ver item 4.2.2).

A concentração total de isoflavonas observadas no extrato bruto de soja foi de 128,1 mg/100 g, corroborando com outros estudos que observaram que a concentração de isoflavonas pode variar de 126,1 a 409,2 mg/100 g (Tsukamoto *et al.* 1995, Araújo *et al.* 1997, Carrão-Panizzi *et al.* 1999).

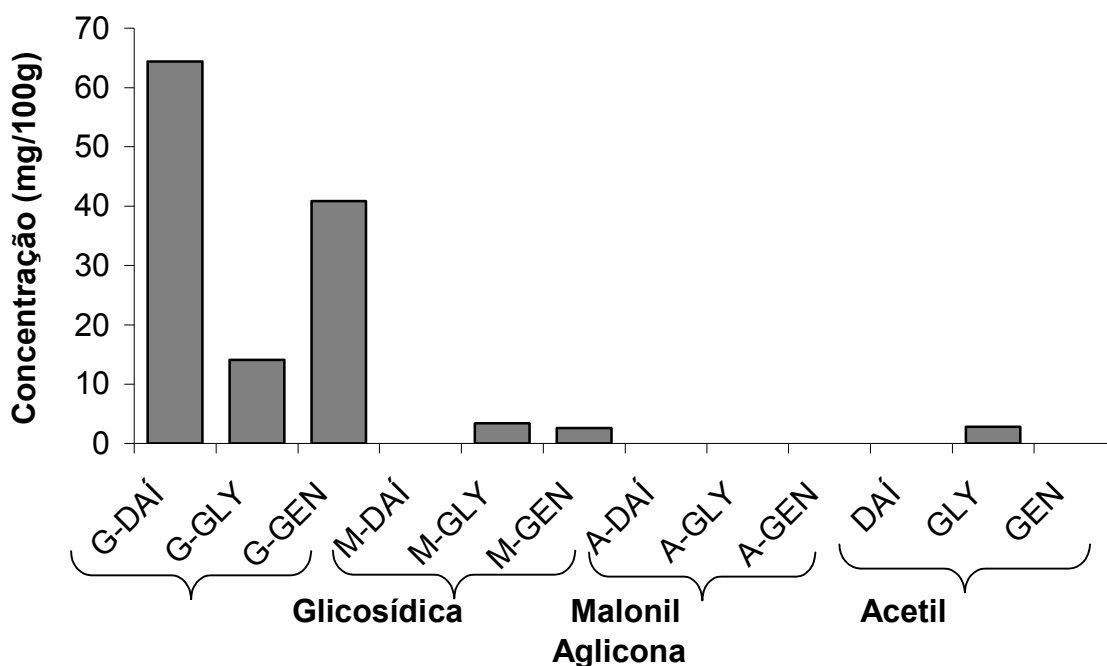


Figura 4.5. Concentração de isoflavonas presentes em extrato bruto de vagens de soja (cultivar BRS 267). G-DAÍ= daidzina; G-GLY= glicitina; G-GEN= genistina; M-DAÍ= malonil-daidzina; M-GLY= malonil-glicitina, A-DAÍ= acetil-daidzina; M-GEN= malonil genistina; A-GEN= acetil-genistina, DAÍ= daidzeína; GLY= gliciteína e GEN= genisteína, (dados de 1 amostra, sem erro padrão).

Não foi possível detectar a porcentagem de isoflavonas nas vagens de soja *in natura*, possivelmente devido às baixas concentrações presentes nas amostras avaliadas. É possível que o tratamento térmico que as sementes receberam para desidratação e preparo da farinha de soja, tenha alterado a concentração de isoflavonas. Em estudo recentemente realizado por Carrão-Panizzi (não-publicado) foram quantificadas isoflavonas nas formas glicosídicas e malonil em sementes verdes de soja BRS 267 (Tabela 4.2), as formas acetil e agliconas não foram observadas. De acordo com vários estudos, a concentração das diferentes formas de isoflavonas nas sementes de soja pode variar significativamente de acordo com o genótipo, com as variações de temperatura durante o

cultivo, o tipo de solo, a localização geográfica, partes da semente e metodologia de extração (Coward *et al.* 1993, Carrão-Panizzi & Kitamura 1995, Carrão-Panizzi *et al.* 1999, Park *et al.* 2001, Carrão-Panizzi *et al.* 2004, Ribeiro *et al.* 2006, 2007).

As isoflavonas têm sido amplamente estudadas, pois apresentam propriedades biológicas importantes, exercendo atividades antioxidantes (Shahidi *et al.* 1992, Esaki *et al.* 1999), antifúngicas (Naim *et al.* 1974), anticancerígenas (Coward *et al.* 1993, Denis *et al.* 1999) e propriedades estrogênicas. Além disso, alguns estudos demonstram que as isoflavonas têm papel fundamental na resistência de plantas contra insetos (Sutherland *et al.* 1980, Rao *et al.* 1990, Piubelli *et al.* 2005).

As isoflavonas estão associadas com o sabor amargo e adstringente que algumas cultivares de soja apresentam e é possível, que esta característica influencie no comportamento de escolha pelos insetos. Por esta razão, a atividade biológica das isoflavonas sobre os insetos deve ser melhor investigada.

Tabela 4.2. Concentração de isoflavonas presentes em sementes de soja *in natura*, da cultivar BRS 267 (M.C. Carrão-Panizzi não-publicado).

Vagens de soja <i>in natura</i>	Concentração (mg/100 g)
Daidzina	6,62
Glicitina	4,39
Genistina	10,94
6''-O-Malonil-Daidzina	54,85
6''-O-Malonil-Glicitina	34,23
6''-O-Malonil-Genistina	74,63
6''-O-Acetil-Daidzina	0,00
6''-O-Acetil-Glicitina	0,00
6''-O-Acetil-Genistina	0,00
Daidzeína	0,00
Gliciteína	0,00
Genisteína	0,00

A análise do perfil químico de vagens de soja da cultivar BRS 267 demonstrou haver quantidades acentuadas de açúcares (principalmente inositol), baixos teores de isoflavonas e uma ampla variedade de voláteis. Portanto, esses compostos se apresentam como possíveis mediadores do comportamento de oviposição de percevejos e, assim, tiveram sua atividade biológica testada, no capítulo 5.

4.4. Literatura citada

- Araújo, J.M.A., J.C.S. Carlos & C.S. Sedyama. 1997.** Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de beta-glucosidase na formação do sabor amargo e adstringente. *Ciênc. Tec. Alim.* 17: 137–141.
- Bernays, E.A. & R.F. Chapman. 1994.** Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, London, UK, 312 p.
- Boué, S.M., B.Y. Shih, C.H. Carter-Wientjes & T.E. Cleveland. 2003.** Identification of volatile compounds in soybean at various developmental stages using solid phase microextraction. *J. Agr. Food Chem.* 51: 4873-4876.
- Carrão-Panizzi, M.C. & K. Kitamura. 1995.** Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. *Breeding Sci.* 45: 295-300.
- Carrão-Panizzi, M.C., A.D.P. Beléia, K. Kitamura & M.C.N. Oliveira. 1999.** Effects of genetics and environment of isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. *Pesq. Agrop. Brasil.* 34: 1787–1795.
- Carrão-Panizzi, M.C., S.P.G. Favoni & A. Kikuchi. 2002.** Extraction time for isoflavone determination. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 45: 515-518.

- Carrão-Panizzi, M.C., S.P.G. Favoni & A. Kikuchi. 2004.** Hydrothermal treatments in the development of isoflavone glycones in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) grains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47: 225-232.
- Carrão-Panizzi, M.C., A.E. Pípolo, L.A. Almeida, J.M.G. Mandarino, M. Kaster, C.A.A. Arias, G.E.S. Carneiro, J.F.F.Toledo, L.C. Miranda, J.T. Yorinori, W.P. Dias, A.M.R. Almeida, L.A. Domit, V.T. Benassi, N.E. Arantes, A.C.B. Oliveira, R.L. Brogin, E.S. Lambert, P.F. Bertagnolli, M.A.S. Rangel & P.I.M. Souza. 2006.** BRS 267: cultivar de soja para alimentação humana. In *Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil*, 28, Uberaba. MG., p. 315-317.
- Colazza S., A. Fucarino, E. Peri, G. Salerno, E. Conti & F. Bin. 2004.** Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *J. Exp. Biol.* 207: 47-53.
- Constant, B., S. Grenier & G. Bonnot. 1996.** Artificial substrate for egg laying and embryonic development by the predatory bug *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). *Biol. Control.* 7: 140-147.
- Cosgrove, D.J. & C.G.J. Irving. 1980.** Inositol phosphates: their chemistry, biochemistry and physiology. Elsevier Scientific, Amsterdam, The Netherlands, 214 p.

- Coward, L., N.C. Barnes, K.D.R. Setchell & S. Barnes. 1993.** Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods American and Asian diets. *J. Agr. Food Chem.* 41: 1961-1967.
- Coyle, D.R., J.D. McMillin, R.B. Hall & E.R. Hart. 2003.** Effects of cotton wood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larval defoliation, clone, and season on *Populus* foliar phagostimulants. *Environ. Entomol.* 32: 452-462.
- Denis, L., M.S. Morton & K. Griffiths. 1999.** Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur. Urol.* 35: 377-387.
- Derridj, S., B.R. Wu, L. Stammitti, J.P. Garrec & A. Derrien. 1996.** Chemicals on the leaf surface, information about the plant available to insects. *Entomol. Exp. Appl.* 80: 197-201, 1996.
- Dreyer, D.L., R.G. Binder, B.G. Chan, A.C. Waiss Jr., E.E. Hartwig & G.L. Beland. 1979.** Pinitol, a larval growth inhibitor for *Heliothis zea* in soybeans. *Experientia* 35: 1182-1183.
- Dwunfour, E.F. 1992.** Volatile substances evoking orientation in the predatory flowerbug *Anthocoris nemorum* (Heteroptera: Anthocoridae). *Bull. Entomol. Res.* 1: 157-161.
- Eisemann, C.H. & M.J. Rice. 1985.** Oviposition behaviour of *Dacus tryoni*: effects of some sugars and salts. *Entomol. Exp. Appl.* 39: 61-71.

- Esaki, H., S. Kawakishi, Y. Morimitsu & T. Osawa. 1999.** New potent antioxidative o-dihydroxyisoflavones in fermented Japanese soybean products. *Biosci. Biotech. Bioch.* 63: 1637-1639.
- Fan, J.T. & J.h. Sun. 2006.** Influences of host volatiles on feeding behaviour of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*. *J. Appl. Entomol.* 130: 238-244.
- Fehr, W.R., C.E. Caviness, D.T. Burmood & J.S. Pennington. 1971.** Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.* 11: 929-31.
- Foster, S.P. & M.O. Harris. 1992.** Foliar chemicals of wheat and related grasses influencing oviposition by Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say) (Diptera: Cecidomyiidae). *J. Chem. Ecol.* 18: 1965-1980.
- Fujimaki, M., S. Arai, N. Kirigaya & Y. Sakurai. 1965.** Studies on flavor components in soybean. Part 1. Aliphatic carbonyl compounds. *Agr. Biol. Chem.* 29: 855.
- Gouinguéné, S.P., H.R. Buser & E. Städler. 2005.** Host-plant leaf surface compounds influencing oviposition in *Delia antiqua*. *Chemoecology* 15: 243-249.
- Hilker, M. & T. Meiners. 2002.** Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Blackwell Publishers, Berlin, Germany, 390 p.

- Honda, K. 1995.** Chemical basis of differential oviposition by lepidopterous insects. Arch. Insect Biochem. Physiol. 30: 1-23.
- Honig, D.H. & J.J. Rackis. 1975.** Volatile components of maturing soybeans. Cereal Chem. 52: 396-401.
- Hou, A., P. Chen, A. Shi, B. Zhang & Y.J. Wang. 2008.** Sugar variation in soybean seed assessed with a rapid extraction and quantification method. Inter. J. Agron. 2009: 1-8.
- Ikeda T., N. Enda, A. Yamane, K. Oda & T. Toyoda. 1980.** Attractants for the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 15: 358-361.
- Jackson, D.M., R.F. Severson, A.W. Johnson & G.A. Herzog. 1986.** Effects of cuticular duvane diterpenes from green tobacco leaves on tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition. J. Chem. Ecol. 12: 1349-1359.
- Kudou, S., Y. Fleury, D. Welti, D. Magnolato, T. Uchida, K. Kitamura & K. Okubo. 1991.** Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill). Agr. Biol. Chem. 55: 2227-2233.
- Lin, S., B.F. Binder & E.R. Hart. 1998.** Chemical ecology of cotton wood leaf beetle adult feeding preferences on *Populus*. J. Chem. Ecol. 24: 1791-1802.

- Liu, S.H., D.M. Norris & P. Lyne. 1989.** Volatiles from the foliage of soybean, *Glycine max*, and lima bean, *Phaseolus lunatus*: their behavioral effects on the insects *Trichoplusia ni* and *Epilachna varivestis*. J. Agr. Food Chem. 37: 496-501.
- Lombarkia, N. & S. Derridj. 2002.** Incidence of apple fruit and leaf surface metabolites on *Cydia pomonella* oviposition. Entomol. Exp. Appl.. 104: 79-87.
- Moraes, M.C. B., R. Laumann, E.R. Sujii, C. Pires & M. Borges. 2005.** Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. Entomol. Exp. Appl. 155: 227-237.
- Morris, B.D., S.P. Foster & M.O. Harris. 2000.** Identification of 1-octacosanal and 6-methoxy-2-benzoxazolinone from wheat as ovipositional stimulants for Hessian fly, *Mayetiola destructor*. J. Chem. Ecol. 26: 859-873.
- Murphy, P.A. 1982.** Phytoestrogen content of processed soybean products. Food Technol. 36: 60-64.
- Naim, M., B. Gestetner, S. Zilkah, Y. Birk & A. Bondi. 1974.** Soybean isoflavones: characterization, determination, and antifungal activity. J. Agr. Food Chem. 22: 806-810.

- Nelson, N.A. 1944.** Photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380.
- Norris, D.M. & M. Kogan. 1990.** Biochemical and morphological bases of resistance. In Maxuwell, F.G & P.R. Jenning (eds.). Breeding plants resistant to insects. John Wiley and Sons, New York, USA, 683 p.
- Panizzi, A.R., M. Berhow & R.J. Bartelt. 2004.** Artificial substrate bioassay for testing oviposition of southern green stink bug conditioned by soybean plant chemical extracts. Environ. Entomol. 33: 1217-1222.
- Park, Y.K., C.L. Aguiar, S.M. Alencar, H.A.A. Mascarenhas & A.R.P. Scamparini. 2001.** Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. Ciên. Tec. Alim. 3: 156-160.
- Piubelli, G.C., C.B. Hoffmann-Campo, F. Moscardi, S.H. Miakubo & M.C.N. Oliveira. 2005.** Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? J. Chem. Ecol. 31: 1509-1525.
- Posternak, T. 1965.** The cyclitols, chemistry, biochemistry, biology. Hermann, Paris, France, 286 p.
- Rao, K.V., S.K. Chattopadhyay & G.C. Reddy. 1990.** Flavonoids with mosquito larval toxicity. J. Agr. Food Chem. 38: 1427-1430.

- Renwick, J.A.A. & F.S. Chew. 1994.** Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 377-400.
- Renwick, J.A.A. 1989.** Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. *Experientia* 45: 223-228.
- Ribeiro, M.L.L., J.M.G. Mandarino, M.C. Carrão-Panizzi, M.C.N. Oliveira, C.B.H. Campo, A.L. Nepomuceno & E.I. Ida. 2006.** β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. *J. Food Biochem.* 30: 453-465.
- Ribeiro, M.L.L., J.M.G. Mandarino, M.C. Carrão-Panizzi, M.C.N. Oliveira, C.B.H. Campo, A.L. Nepomuceno & E.I. Ida. 2007.** Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *J. Food. Compos. Anal.* 20: 19-24.
- Rodriguez-Saona, C., S.J. Crafts-Brandner, L. Williams III & P.W. Paré. 2002.** *Lygus hesperus* feeding and salivary gland extracts induce volatile emissions in plants. *J. Chem. Ecol.* 28: 1733-1747.
- Rosario, R.D., B.O.D. Lumen, H. Tsutomu, R.A. Flath, R. Mon & R. Teranishi. 1984.** Comparison of headspace of volatiles from winged beans and soybeans. *J. Agr. Food Chem.* 32: 1011-1015.

- Shahidi, F. & P.K.J.P.D. Wanasundara. 1992.** Phenolic antioxidant. CRC Critical Review Food Sci. Nutr. 32: 67-103.
- Schoonhoven, L.M. & I. Derksen-Koppers. 1973.** Effects of secondary plant substances on drinking behaviour in some Heteroptera. Ento. Exp. Appl. 16: 141-145.
- Silva, J.B. & M.C. Carrão-Panizzi. 2004.** Evaluation of soybean genotypes for consumption in natura as edamame. P. 66. In Resumos VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Brazilian Soybean Congress, Foz do Iguaçu, Paraná.
- Simmonds, M.S.J., L.M. Schoonhoven & W.M. Blaney. 1991.** Changes in the responsiveness of the maxillary styloconic sensilla of *Spodoptera littoralis* to inositol and sinigrin correlate with feeding behaviour during the final larval stadium. J. Insect Physiol. 37: 261-268.
- Somogy, M. 1945.** Determination of blood sugar. J. Biol. Chem. 160: 69-73.
- Städler, E. & R. Schöni. 1990.** Oviposition behavior of the cabbage root fly, *Delia radicum* (L.) influenced by host plant extracts. J. Insect Behav. 3:195-209.
- Städler, E. 1992.** Behavioral responses of insect to plant secondary compounds. In: Rosenthal, G.A. & M.R. Berenbaum (eds.). Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, vol. II. Academy Press, San Diego, USA, 256 p.

- Städler, E. 2002.** Plant chemicals cues important for egg deposition by herbivorous insects. In Hilker, M. & T. Meiners (eds.). Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Blackwell Publishers, Berlin, Germany, 390 p.
- Sutherland, O.R.W., G.B. Russell, D.R. Biggs & G.A. Lane. 1980.** Insect feeding deterrent activity of phytoalexin isoflavonoids. *Biochem. Syst. Ecol.* 8: 73-75.
- Tsukamoto, C. S., S. Shimada, K. Igita, S. Kudou, M. Kokubun, K. Okubo & K. Kitamura. 1995.** Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavonoids, saponins, and composition on fatty acids at different temperatures during seed development. *J. Agr. Food Chem.* 43: 1184-1192.
- Udayagiri, S. & C.E. Mason. 1995.** Host plant constituents as oviposition stimulants for a generalist herbivore: European corn borer. *Entomol. Exp. Appl.* 76: 59-65.

4.5. Anexos

4.5.1. Reativo de Somogy

- Pesar 28 g de Na_2HPO_4 e adicionar 40 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 700 mL de água destilada;
- Adicionar 100 mL de NaOH 1N;
- Gotejar 80 mL de uma solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 10% sob agitação constante;
- Juntar 180 mL de Na_2SO_4 e completar o volume com água destilada a 1000 mL;
- Deixar em repouso por 2 dias e filtrar em papel filtro;
- Guardar o Reativo em frasco de vidro escuro e temperatura ambiente.

4.5.2. Reativo de Nelson

- Pesar 50 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (molibdato de amônio) e dissolver em 800 mL de água;
- Adicionar 52 mL de H_2SO_4 concentrado;
- Juntar 6 g de Na_2HASO_4 (hidrogênio arseniato de sódio) dissolvidos em 50 mL de água e completar o volume com água destilada a 1000 mL;
- Deixar o Reativo em frasco escuro de vidro por 2 dias e conservar em temperatura ambiente.

4.5.3. Determinação da curva padrão de glicose

- Pesar 1 g de glicose P.A. anidro e completar com água a 100 mL;
- Retirar do balão: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mL e transferir para balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se 2; 4; 6; 8; 10 mg/100 mL;
- Retirar de cada balão 1 mL da solução de glicose e transferir para tubos de ensaio;
- Acrescentar 1mL de Reativo de Somogy e levar ao banho-maria fervente durante 10 minutos, tampando os tubos com bolinhas de gude;
- Retirar do banho-maria e resfriar em água corrente;
- Acrescentar 1 mL de Reativo de Nelson e 7mL de água destilada, agitar em agitador magnético e fazer leitura em absorbância a 535 nm;
- Calcular a constante K da curva
- $K = \text{Somatório das concentrações (20 + 40 + 60 + 80 + 100 mg/L)}$.

CAPÍTULO 5

Resposta olfativa e oviposição de *Euschistus heros* em substrato artificial tratado com compostos químicos extraídos de vagens de soja da cultivar BRS 267

5.1. Introdução

Na década de 1970 o percevejo marrom *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) era classificado como praga secundária da soja [*Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae)] na América do Sul, mas recentemente, tem aumentado em número e causado danos severos a esta cultura nas principais áreas produtoras (Panizzi *et al.* 2000a).

Adultos de *E. heros* podem ser manejados eficientemente através da liberação massal de parasitóides de ovos (Corrêa-Ferreira 2002) ou pelo uso de armadilhas com feromônios sexuais (Borges *et al.* 1998, 1999, Laumann *et al.* 2007). Essas técnicas de manejo dependem da manutenção de colônias de percevejos em laboratório, para o fornecimento contínuo de ovos para a multiplicação dos parasitóides em laboratório e de adultos com idade conhecida para a identificação, isolamento e determinação da atividade biológica de feromônios. Além disso, essas colônias viabilizam o desenvolvimento de outras pesquisas em entomologia básica e aplicada de forma contínua, disponibilizando insetos sadios para bioensaios sem depender da ocorrência natural dos percevejos no campo.

Durante muitos anos, tem se buscado aprimorar as técnicas de criação de percevejos fitófagos. O uso de substratos artificiais para concentrar as posturas tem facilitado a manutenção das colônias em laboratório e, vários substratos artificiais foram testados para diferentes espécies de

percevejos (Panizzi *et al.* 2000b, Bundy & McPherson 2000). Panizzi *et al.* (2004) avaliaram extratos químicos de vagens de soja como possíveis condicionantes de oviposição para o percevejo-verde, *Nezara viridula* (L.), buscando aumentar a atratividade das fêmeas pelos substratos artificiais. Os autores observaram que as fêmeas depositam significativamente mais ovos em substrato artificial (tule) tratado com extrato metanólico de vagens de soja do que em áreas não tratadas. Porém, não identificaram a natureza química dos compostos presentes no extrato e tampouco avaliaram a ação dos compostos isolados sobre o comportamento dos percevejos.

Recentemente, Silva & Panizzi (2007, 2008) desenvolveram metodologia para criação de pentatomídeos em laboratório, utilizando substratos artificiais para oviposição, porém não associaram aos substratos características químicas atrativas aos percevejos.

Portanto, buscando identificar compostos condicionantes de oviposição que possam ser associados aos substratos artificiais em criações de percevejos em laboratório, conduziu-se o presente estudo, que teve como objetivo principal avaliar a ação de extratos químicos de vagens de soja da cultivar BRS 267, sobre o comportamento de oviposição de *E. heros*.

5.2. Material e métodos

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Bioecologia de Percevejos, no Laboratório de Melhoramento Genético da Embrapa Soja, Londrina, PR e no Laboratório de Ecologia e Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, de junho a dezembro de 2006.

5.2.1. Resposta olfativa de fêmeas de *Euschistus heros* aos compostos químicos extraídos de vagens de soja

Para avaliar a resposta olfativa das fêmeas de *E. heros* aos voláteis extraídos de vagens de soja da cultivar BRS 267, utilizou-se um olfatômetro em forma de “Y” (corpo 9,0 cm; braços 8,0 cm cada, com ângulo de 130°, diâmetro interno de 1,5 cm) confeccionado em placa de acrílico, que foi colocada sobre uma placa de vidro translúcido e coberto com uma placa de vidro transparente. As três placas foram fixadas com auxílio de grampos de metal (clips) e na parte de baixo receberam iluminação com lâmpadas de infravermelho (emissão homogênea de comprimento de onda de 950 nm fornecida por 108 LEDs). O olfatômetro foi acoplado a uma fonte contínua de ar filtrado, com fluxo de 800 mL/min. regulado com fluxômetro. Para registro e processamento das imagens, o olfatômetro foi monitorado usando um monitor de vídeo (Sony SSM-14 N5E) conectado a uma câmera monocromática (Sony SPT M324CE) ajustada com lentes de 12,5 a 75,0 mm. As imagens foram capturadas e digitalizadas utilizando uma placa de vídeo (PC-Studio PCTV Pinnacle System) e os dados foram processados pelo programa Sacan (Jorge *et al.* 2005) (Fig. 5.1).

Fêmeas de *E. heros* com 15 dias de idade foram selecionadas da criação de laboratório e utilizadas nos bioensaios. As fêmeas foram introduzidas no olfatômetro individualmente pela extremidade de saída de ar e foram monitoradas durante 10 minutos. As posições dos braços do olfatômetro foram invertidas entre tratamento e controle a cada quatro avaliações, para evitar qualquer influência. Os extratos químicos avaliados (Tabela 5.1) foram aplicados (10 µL) em tiras de papel filtro (1,5 x 0,5 cm) e colocados na extremidade dos braços do olfatômetro. Os extratos foram reaplicados a cada três avaliações. As análises foram conduzidas em sala com temperatura controlada (25 ± 1 °C). Foram calculadas as porcentagens de primeira escolha (o lado do

olfatômetro em que o inseto entrou pela primeira vez, entre tratamento e controle) e de residência, ou seja, o tempo de permanência em cada local do olfatômetro, entre tratamento e controle.

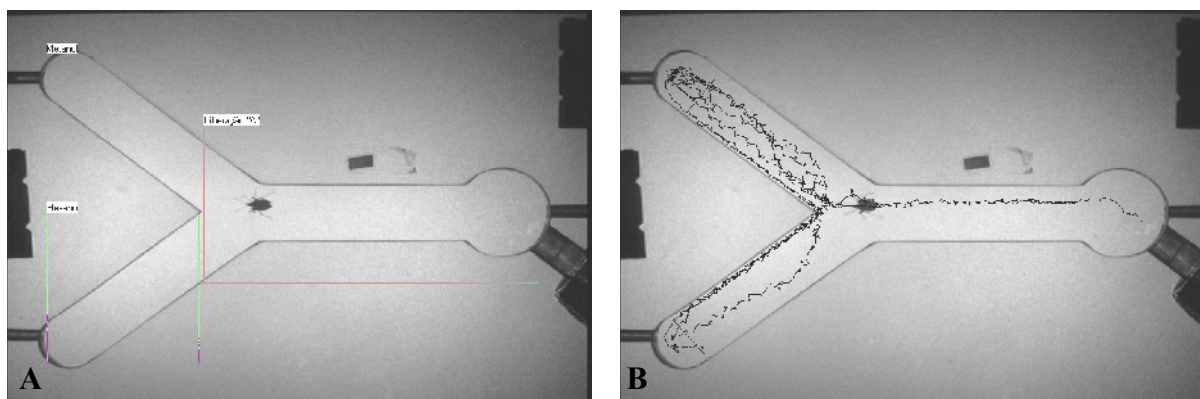


Figura 5.1. Imagens capturadas por câmera de vídeo durante estudo com *Euschistus heros* em olfatômetro tipo “Y”. A) Linhas demarcando as áreas contendo os tratamentos e B) Trilha do inseto formada pelo programa Sacan durante o monitoramento (10 minutos).

Tabela 5.1. Extratos químicos avaliados nos ensaios de olfatometria e o número de fêmeas de *Euschistus heros* avaliadas em cada tratamento.

Tratamento	Controle	Repetições
Extrato metanólico de vagens de soja (10 mg/mL)	Metanol puro	43
Fração de extrato bruto de vagens de soja obtida com hexano 100% (1 mg/mL)	Hexano puro	20
Fração de extrato bruto de vagens de soja obtida com metanol 100% (1 mg/mL)	Metanol puro	20
Fração de extrato bruto de vagens de soja obtida com metanol 100% (1 mg/mL)	Fração de extrato bruto de vagens de soja obtida com hexano 100%	20
Voláteis extraídos de vagens de soja (200 µL) (0,01 mg/mL)	Diclorometano	20
Misturas de padrões de voláteis alcanos (0,1 mg/mL)	Hexano puro	20
Mistura de padrões de voláteis aldeídos (0,1 mg/mL)	Diclorometano	20

5.2.2. Preferência de oviposição de *Euschistus heros* em substrato artificial tratado com compostos químicos extraídos de vagens de soja

Casais de *E. heros* com 10 dias de idade foram selecionados da criação de laboratório e colocados individualmente, em caixa gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) forrada com papel filtro. Em cada caixa foram colocadas duas tampinhas de plástico (1,5 cm de diâmetro), preenchidas com algodão hidrófilo seco (Cremer S.A., Blumenau, SC). Em uma das tampinhas foi aplicado sobre o algodão 0,5 mL do tratamento e na outra, a mesma quantidade do controle (Tabela 5.2). Os insetos foram alimentados com vagem verde de feijão e sementes de amendoim e soja.

As caixas foram mantidas em câmara BOD (25 ± 1 °C, $65 \pm 5\%$ UR, fotoperíodo 14h L: 10h E) e observadas diariamente durante oito dias. Os alimentos e as tampinhas com os tratamentos e controles foram trocados a cada dois dias. Diariamente, avaliou-se o número de posturas e ovos depositados em cada tratamento, durante seis dias. Cada casal de inseto foi considerado uma unidade experimental em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Tabela 5.2. Extratos químicos avaliados nos ensaios de preferência de oviposição e o número de casais de *Euschistus heros* utilizados em cada tratamento.

Tratamento	Controle	Repetições
Extrato metanólico de vagens de soja (10 mg/mL)	Metanol puro	20
Fração de extrato bruto de vagens de soja obtida com hexano 100%	Hexano puro	20
Fração de extrato bruto de vagens de soja obtida com metanol 100%	Metanol puro	20
Solução de isoflavonas a 0,01 mg/mL (daidzina, genistina e glicetina)	Água	10
Solução de açúcares a 0,1 mg/mL (Solução 1)*	Água	10
Solução de açúcares a 0,1 mg/mL (Solução 2)**	Água	10
Solução de açúcares a 0,1 mg/mL (Solução 3)***	Água	15

* Solução 1: sacarose, frutose, glicose, maltose, galactose e sorbitol.

** Solução 2: sacarose, frutose, glicose, maltose, galactose, sorbitol, sillo-inositol, mio-inositol, glucopiranose e galactitol.

*** Solução 3: sillo-inositol, mio-inositol, glucopiranose e galactitol (açúcares identificados em soja 'BRS 267').

5.2.3. Efeito dos voláteis extraídos de vagens de soja sobre a oviposição de *Euschistus heros*

Dez fêmeas férteis de *E. heros* selecionadas da criação de laboratório foram colocadas individualmente, durante dez minutos, em olfatômetro contendo voláteis extraídos de vagens de soja (200 µL), mistura de voláteis alcanos (0,1 mg/mL) e mistura de voláteis aldeídos (0,1 mg/mL). Como controle foram utilizadas fêmeas aeradas com hexano ou água destilada. Após o contato com os compostos voláteis as fêmeas foram colocadas individualmente, em caixas gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) forradas com papel filtro e em cada caixa foi colocado um macho de *E. heros* com aproximadamente oito dias de idade. Os insetos foram alimentados com vagem verde de feijão e sementes de amendoim e soja. Como substrato para oviposição foi colocado um pedaço (2,0 cm de diâmetro) de algodão hidrófilo seco em cada caixa.

As caixas foram mantidas em câmara BOD (25 ± 1 °C, $65 \pm 5\%$ UR, fotoperíodo 14h L: 10h E). Avaliou-se o número de ovos depositados após 24 e 48 horas. Cada casal de inseto foi considerado uma unidade experimental em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

5.2.4. Análise dos dados

O número médio de posturas, de ovos e ovos/postura observados nos testes de preferência de oviposição foi calculado e submetido à análise de variância (ANOVA). As porcentagens de primeira escolha e de residência observadas nos testes em olfatômetro, assim como as porcentagens de posturas e ovos observadas no teste de oviposição, foram transformadas em $\arcseno \sqrt{x + 1}$ para comparação entre duas médias, pelo teste t de Student, utilizando-se o programa estatístico SAS 8.2. (SAS Institute 1981, Zar 1984).

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Resposta olfativa de fêmeas de *Euschistus heros* aos compostos químicos extraídos de vagens de soja da cultivar BRS 267

De modo geral, as fêmeas de *E. heros* apresentaram atratividade olfativa aos compostos químicos testados. As porcentagens de primeira escolha foram maiores nos tratamentos com extrato bruto de soja, frações do extrato, voláteis isolados de vagens de soja e misturas de padrões de voláteis do que nos seus respectivos controles (Tabela 5.3).

Observou-se que a porcentagem de residência foi maior para o extrato bruto (52,6%) do que para o metanol (29,2%). Resultado semelhante foi observado quando se comparou a fração metanólica do extrato (54,7%) com o controle metanol (26,5%). Não se observou diferença significativa na porcentagem de residência entre a fração hexânica do extrato e o controle hexano, embora as fêmeas de *E. heros* tenham apresentado maior porcentagem de primeira escolha para a fração de hexano.

As fêmeas não apresentaram preferência significativa quando foram comparadas as duas frações do extrato de vagens de soja (metanólica e hexânica), embora numericamente, a fração metanólica do extrato tenha apresentado maior porcentagem de primeira escolha e de residência (56,3 e 44,4%) do que a fração hexânica (43,8 e 35,3%) (Tabela 5.3).

Os voláteis extraídos de vagens de soja apresentaram atratividade aos insetos, observando-se porcentagem de primeira escolha e de residência de 60 e 40% respectivamente, para o tratamento e de 40 e 28% para o controle (diclorometano). Ao avaliar separadamente, as misturas de padrões de

voláteis alcanos e aldeídos observou-se porcentagem de primeira escolha maior para os voláteis do que para seus respectivos controles (Tabela 5.3).

Tabela 5.3. Comparação das porcentagens de primeira escolha e de residência de fêmeas de *Euschistus heros* em olfatômetro em “Y”, em resposta aos diferentes voláteis testados.

Tratamentos	Número médio ($\pm$ EP) ¹	
	Primeira Escolha (%) ²	Residência (%) ²
Extrato bruto de soja vs. Metanol	69,8 $\pm$ 7,1 a 30,2 $\pm$ 7,1 b	52,6 $\pm$ 5,3 a 29,2 $\pm$ 5,0 b
Fração de hexano vs. Hexano	52,6 $\pm$ 11,8 a 47,4 $\pm$ 11,8 b	43,9 $\pm$ 8,6 a 37,3 $\pm$ 7,9 ab
Fração de metanol vs. Metanol	59,1 $\pm$ 10,7 a 40,9 $\pm$ 10,7 b	54,7 $\pm$ 7,8 a 26,5 $\pm$ 6,8 b
Fração metanol vs. Fração de hexano	56,3 $\pm$ 12,8 a 43,8 $\pm$ 12,8 ab	44,4 $\pm$ 9,4 a 35,3 $\pm$ 7,4 a
Voláteis de vagens de soja (200 μ L) vs. Diclorometano	60,0 $\pm$ 13,1 a 40,0 $\pm$ 13,1 b	40,0 $\pm$ 9,1 a 28,0 $\pm$ 9,4 b
Misturas de voláteis (alcanos) vs. Hexano	60,0 $\pm$ 11,2 a 40,0 $\pm$ 11,2 b	33,9 $\pm$ 7,4 a 28,0 $\pm$ 6,8 a
Mistura de voláteis (aldeídos) vs. Diclorometano	60,0 $\pm$ 13,1 a 40,0 $\pm$ 13,1 b	25,0 $\pm$ 5,9 a 23,0 $\pm$ 8,6 a

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste t de Student ($P < 0,05$). ² Dados transformados em arco seno $\sqrt{(x + 1)}$ para análise de comparação.

Foram identificados vários compostos voláteis presentes nesta cultivar em estágio R6 (item 4.3.2), sendo que compostos como o (*E*)-2-hexenal, decanal, nonanal e (*Z*)-3-hexenol têm sido relatados como importantes no processo de busca da planta hospedeira pelos insetos (Visser 1983).

Estudos com o percevejo *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Heteroptera: Miridae) demonstram que fêmeas e machos respondem ao (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenol e nonanal, sendo que esses aldeídos e álcoois estão presentes na planta hospedeira e nos insetos adultos (Chinta *et al.* 1994). Além disso, o (*E*)-2-hexenal é um dos compostos que ocorre com maior frequência na composição de compostos defensivos de muitas espécies de pentatomídeos (Aldrich 1988). Para *E. heros* observou-se que o (*E*)-2-hexenal e o decanal são utilizados como feromônios de alarme ou de defesa (Moraes *et al.* 2008).

Portanto, o fato dos insetos responderem positivamente a compostos constitutivos de ambos, plantas e insetos, indica que tais compostos podem estar envolvidos em comportamentos distintos, como a busca por plantas hospedeiras e a atração por feromônios. Por esta razão, a ação biológica destes voláteis sobre o comportamento de oviposição de *E. heros* deve ser avaliada isoladamente, pois através dos resultados obtidos apenas com os ensaios em olfatômetro, não é possível afirmar que os voláteis de soja atrativos às fêmeas, atuem como mediadores do comportamento de oviposição.

5.3.2. Oviposição de *Euschistus heros* em substrato artificial tratado com compostos químicos extraídos de vagens de soja

Na avaliação do número de posturas e de ovos depositados em substrato artificial tratado com diferentes compostos químicos presentes em vagens de soja ('BRS 267'), observou-se que todos os compostos avaliados influenciaram a oviposição de *E. heros*, como veremos a seguir.

5.3.2.1. Oviposição em substrato artificial tratado com extrato bruto de soja e frações do extrato

Fêmeas de *E. heros* ovipositaram significativamente mais em algodão hidrófilo tratado com extrato metanólico de vagens de soja (10 mg/mL) do que em algodão tratado com metanol puro (Fig. 5.2). A porcentagem de posturas foi de 63,7% para o tratamento contra 36,3% para o controle.

Ao comparar a oviposição em substratos tratados com a fração hexânica do extrato de soja e o hexano puro, observou-se porcentagem de posturas significativamente maior para a fração (60,4%) do que para o controle (39,6%). Resultado semelhante foi observado quando se comparou a fração metanólica do extrato com metanol puro, obtendo-se 73,4% das posturas no tratamento e apenas 26,6% no controle. A porcentagem de ovos também foi maior nos tratamentos com as frações hexânica e metanólica do que nos seus respectivos controles (Fig. 5.3).

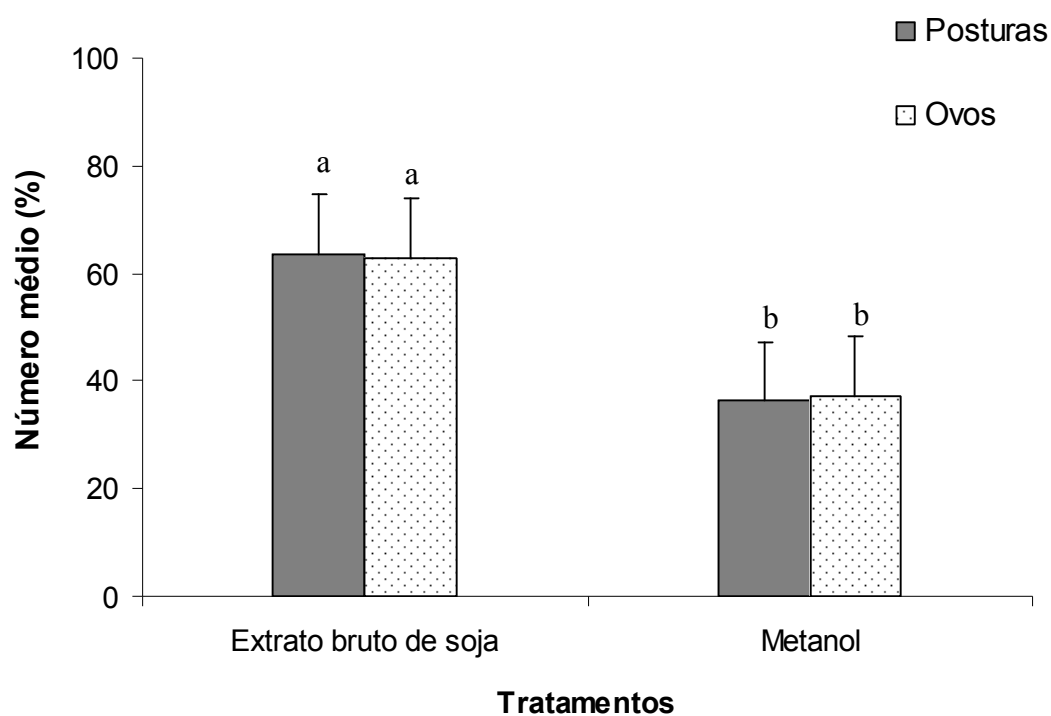


Figura 5.2. Porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por *Euschistus heros* em substrato artificial tratado com extrato bruto de soja ou metanol puro (controle). Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

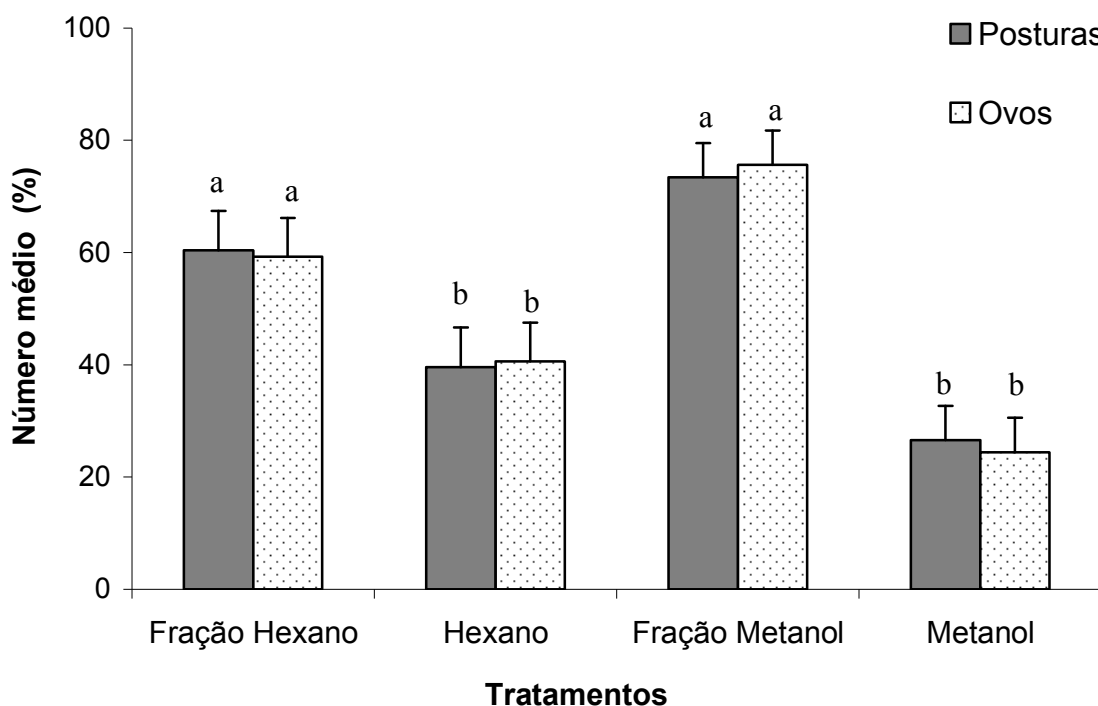


Figura 5.3. Porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por *Euschistus heros* em substrato artificial tratado com frações metanólica ou hexânica do extrato bruto de soja ou com hexano e metanol (controles). Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

Os resultados demonstram que a oviposição de *E. heros* é mediada por compostos químicos presentes no extrato de vagens de soja.

Embora seja um inseto polífago, *E. heros* apresenta preferência significativa em ovipositar em folhas de soja (Villas Bôas & Panizzi 1980), indicando que as fêmeas respondem a compostos químicos presente nesta leguminosa.

Quando o extrato de vagens foi separado em duas frações químicas (hexânica e metanólica) ainda foi observada preferência das fêmeas pelas áreas tratadas com as frações do extrato. Portanto, esses resultados sugerem que o comportamento de escolha de locais de oviposição pelos percevejos fitófagos é mediado por múltiplos componentes, com naturezas químicas diferentes, como observado para insetos de outras ordens, como Lepidoptera (Nishida 1995, Honda *et al.* 1997) e Diptera (De Jong & Städler 1999).

Em estudo com Heteroptera, Panizzi *et al.* (2004) observaram que fêmeas de *N. viridula* respondem a diferentes extratos obtidos de folhas e vagens de soja e, que as frações dos extratos também atuam como condicionantes de oviposição. Os autores sugerem que quimiorreceptores localizados nas antenas das fêmeas de *N. viridula* são responsáveis pelo reconhecimento dos compostos atrativos. Em estudo recente, observou-se que fêmeas de *E. heros* apresentam grande quantidade de sensilas localizadas nas antenas e nas placas genitais (F.A.C Silva & A.R. Panizzi não-publicado), porém não se sabe ao certo qual o papel que essas estruturas desempenham no processo de reconhecimento de compostos químicos estimulantes e/ou condicionantes de oviposição.

Portanto, estudos adicionais utilizando outras ferramentas de avaliação, como registros eletrofisiológicos das sensilas, poderão indicar a presença de quimiorreceptores específicos para compostos identificados em vagens de soja. Adicionalmente, a identificação e síntese de estimulantes de oviposição poderão ter implicações práticas no controle de percevejos-praga da soja.

5.3.2.2. Oviposição em substrato artificial tratado com soluções de açúcares

As misturas de açúcares testadas não atuaram como estimulantes de oviposição para *Euschistus heros*. O número de posturas, de ovos e de ovos/postura depositados em substrato artificial tratado com a solução contendo apenas monossacarídeos (solução 1) não diferiu da área tratada com água destilada (Tabela 5.4). Entretanto, quando foi adicionada à solução 1 outros açúcares (silo-inositol, mio-inositol, glucopirranose e galactitol), observou-se redução significativa na porcentagem de posturas (34,3%) e ovos (31,0%) depositados nas áreas tratadas com a solução 2, comparadas com as áreas tratadas com água (65,7% de posturas e 69% de ovos). O número médio de ovos/posturas foi significativamente maior no tratamento controle (18,9) do que no tratamento com a solução 2 de açúcares (7,1) (Tabela 5.4).

Observou-se que a mistura com os açúcares anteriormente identificados em vagens de soja 'BRS 267' (ver item 4.3.3), não apresenta efeito condicionante de oviposição para *E. heros*. O número médio de posturas foi de 2,2 para o tratamento com a mistura de açúcares (solução 3) contra 3,9 para o controle. O número médio de ovos também foi maior no controle (32,3) do que no tratamento (15,8). Apenas o tamanho das posturas não foi significativamente diferente entre tratamento e controle (Tabela 5.4).

Tabela 5.4. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por *Euschistus heros* em substrato artificial tratado com diferentes soluções de açúcares (concentração de 0,1 mg/mL).

Tratamentos ¹	Número médio ($\pm$ EP) ²				Média ($\pm$ EP) de ovos/postura
	Posturas	Posturas (%) ³	Ovos	Ovos (%) ³	
Solução 1	12,6 $\pm$ 1,6 a	57,2 $\pm$ 6,6 a	114,8 $\pm$ 17,2 a	58,8 $\pm$ 6,5 a	9,1 $\pm$ 0,7 a [126] ⁴
vs. Água	9,7 $\pm$ 1,6 a	42,8 $\pm$ 6,6 a	78,2 $\pm$ 12,7 a	41,2 $\pm$ 6,5 a	8,3 $\pm$ 0,5 a [97]
Solução 2	3,1 $\pm$ 0,8 a	34,3 $\pm$ 7,6 b	22,9 $\pm$ 5,3 a	31,0 $\pm$ 7,1 b	7,1 $\pm$ 0,9 b [31]
vs. Água	5,4 $\pm$ 1,1 a	65,7 $\pm$ 7,6 a	54,8 $\pm$ 15,7 a	69,0 $\pm$ 7,1 a	18,9 $\pm$ 9,1 a [54]
Solução 3	2,2 $\pm$ 0,5 b	35,2 $\pm$ 6,5 b	15,8 $\pm$ 3,6 b	35,4 $\pm$ 7,4 b	5,1 $\pm$ 0,9 a [33]
vs. Água	3,9 $\pm$ 0,6 a	64,8 $\pm$ 6,5 a	32,3 $\pm$ 6,3 a	65,0 $\pm$ 7,4 a	6,9 $\pm$ 0,9 a [59]

¹ Solução 1: sacarose, frutose, glicose, maltose, galactose e sorbitol. Solução 2: sacarose, frutose, glicose, maltose, galactose, sorbitol, sillo-inositol, mio-inositol, glucopiranose e galactitol. Solução 3: sillo-inositol, mio-inositol, glucopiranose e galactitol.

² Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

³ Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x + 1}$ para análise de comparação.

⁴ Número de posturas colocado em cada tratamento, entre colchetes.

Alguns açúcares como sacarose e frutose desempenham papel importante no comportamento dos insetos, atuando como fagoestimulantes (Bernays & Chapman 1994, Swoboda *et al.* 2004) e estimulantes de oviposição (Eisemann & Rice 1985, Derridj *et al.* 1996, Lombarkia & Derridj 2002, Hilker & Meiners 2002). Porém, a resposta dos insetos a esses compostos é dose-dependente, ou seja, açúcares que são estimulantes em concentrações baixas podem atuar como deterrentes em concentrações altas (Konstantopoulou *et al.* 2004). Além disso, alguns açúcares podem perder seu efeito estimulante quando combinados entre si ou com outros compostos químicos (Blom 1978, Endo *et al.* 2004, Bernklau & Bjostad 2008). Esse efeito também foi observado em compostos glicosídicos mediadores de oviposição da borboleta monarca, *Danaus plexippus* (Bernays & Chapman 1994). Nesse estudo, observou-se que quando foram adicionados alguns açúcares anteriormente identificados em vagens de soja (silo-inositol, mio-inositol, glucopirranose e galactitol) à solução 1 (sacarose, frutose, glicose, maltose, galactose e sorbitol), esses mesmos açúcares testados juntos (solução 3) produziram as menores taxas de oviposição.

Para insetos que podem explorar o mesmo alimento nos estágios imaturo e adulto, como a maioria dos percevejos fitófagos, acredita-se que os comportamentos alimentar e de oviposição estejam muito relacionados e que sejam mediados por compostos químicos semelhantes. Em estudos com o percevejo *Neomegalotomus parvus* (Westwood) (Heteroptera: Alydidae), observou-se que a seleção do local para oviposição ocorre por meio de seqüências comportamentais semelhantes às aquelas realizadas para escolha do alimento, quando as fêmeas tateiam e movimentam as antenas próximas às vagens de feijão-guandu, possivelmente para reconhecer os compostos químicos liberados pela planta (Ventura & Panizzi 2000).

As fêmeas do percevejo *Lygus rugulipennis* (Poppius) (Heteroptera: Miridae) exploram o substrato com as partes bucais para selecionar o local para ovipositar. Análises de microscopia

eletrônica revelaram que os estiletes apresentam quimiorreceptores associados a neurônios sensíveis aos compostos químicos presentes na superfície da planta hospedeira, demonstrando que as estruturas bucais estão diretamente envolvidas com a seleção do local de alimentação e de oviposição (Romani *et al.* 2005).

5.3.2.3. Oviposição em substrato artificial tratado com soluções de isoflavonas

Algumas das isoflavonas testadas apresentaram efeito deterrente de oviposição para *E. heros*. Observou-se que o número de posturas, de ovos e de ovos/postura depositados nas áreas tratadas com daidzina e com água (controle) não foi significativamente diferente, embora numericamente, o controle tenha recebido mais posturas e ovos do que o tratamento (Tabela 5.5). Ao comparar a oviposição de *E. heros* em substrato artificial tratado com solução de genistina e água, observou-se que esta isoflavona apresentou efeito deterrente de oviposição. A porcentagem de posturas foi de 37,6% no tratamento contra 62,4% no controle. A porcentagem de ovos também foi menor no tratamento (33,3%) do que no controle (66,7%). Apenas o número de médio de ovos/postura não diferiu significativamente entre tratamento e controle (Tabela 5.5).

Resultado semelhante foi observado ao avaliar a solução de glicitina, pois a porcentagem de posturas foi maior no controle (65,4%) do que no tratamento (34,6%). A porcentagem de ovos também foi maior na área tratada com água (63,4%) do que na área com glicitina (36,6%) (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Número médio ($\pm$ EP) e porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas e ovos depositados por *Euschistus heros* em substrato artificial tratado com diferentes soluções de isoflavonas (concentração de 0,01 mg/mL).

Tratamentos	Número médio ($\pm$ EP) ¹				Média ($\pm$ EP) de ovos/postura
	Posturas	Posturas (%) ²	Ovos	Ovos (%) ²	
Daidzina	3,6 $\pm$ 0,9 a	40,3 $\pm$ 8,4 a	24,5 $\pm$ 7,6 a	40,5 $\pm$ 9,4 a	5,4 $\pm$ 1,1 a
vs.					[36] ³
Água	4,5 $\pm$ 0,5 a	59,7 $\pm$ 8,4 a	37,9 $\pm$ 8,7 a	59,5 $\pm$ 9,4 a	7,5 $\pm$ 0,9 a
					[45]
Genistina	3,9 $\pm$ 0,6 b	37,6 $\pm$ 5,7 b	26,8 $\pm$ 4,1 b	33,3 $\pm$ 5,3 b	7,5 $\pm$ 0,8 a
vs.					[39]
Água	6,8 $\pm$ 0,8 a	62,4 $\pm$ 5,7 a	59,5 $\pm$ 7,9 a	66,7 $\pm$ 5,3 a	8,7 $\pm$ 0,7 a
					[68]
Glicitina	3,0 $\pm$ 0,7 a	34,6 $\pm$ 7,6 b	23,6 $\pm$ 5,6 a	36,6 $\pm$ 7,9 b	6,6 $\pm$ 1,3 a
vs.					[30]
Água	4,4 $\pm$ 1,1 a	65,4 $\pm$ 7,6 a	28,5 $\pm$ 5,6 a	63,4 $\pm$ 7,9 a	6,8 $\pm$ 0,9 a
					[44]

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

² Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{(x + 1)}$ para análise de comparação.

³ Número de posturas em cada tratamento, entre colchetes.

Os resultados indicaram que na concentração testada (0,01 mg/mL) as isoflavonas não apresentaram efeito condicionante de oviposição para *E. heros*.

As isoflavonas têm papel fundamental na resistência de plantas de soja contra insetos (Sutherland *et al.* 1980, Rao *et al.* 1990, Piubelli *et al.* 2005). Ao testar diferentes soluções de isoflavonas (genistina e daidzina) Toledo *et al.* (2006) observaram efeito deterrente de alimentação do percevejo-verde, *Nezara viridula*.

As vagens de soja ('BRS 267') apresentam baixa concentração de isoflavonóides (ver item 4.3.4). Das isoflavonas glicosídicas presentes nesta cultivar de soja, a genistina ocorre em maior concentração (10,94 mg/100g) (M.C. Carrão-Panizzi não-publicado). Segundo Kudou *et al.* (1991) o acúmulo de genistina nas sementes de soja ocorre durante os períodos finais de enchimento dos grãos (estágio R6), coincidindo com o período em que as fêmeas de *N. viridula* apresentam as menores porcentagens de oviposição (Panizzi & Alves 1993).

Entretanto, a concentração de isoflavonas em vagens de soja pode sofrer variações de acordo com as condições ambientais, o tipo de solo, o genótipo, etc. (Carrão-Panizzi & Kitamura 1995, Carrão-Panizzi *et al.* 1999, Park *et al.* 2001, Ribeiro *et al.* 2007) sugerindo, que a resposta dos insetos a esses compostos também pode variar. Os resultados do presente estudo sugerem que as isoflavonas têm influência sobre o comportamento de oviposição de *E. heros*.

No Capítulo 6 foram realizados estudos para avaliar os comportamentos alimentar e de oviposição de *E. heros* sobre diferentes cultivares de soja, que apresentam variação na concentração de isoflavonas.

5.3.3. Efeito dos voláteis extraídos de vagens de soja sobre a oviposição de *Euschistus heros*

As fêmeas de *E. heros* que foram aeradas com diferentes compostos voláteis tiveram a oviposição estimulada. Observou-se que 24 horas após o contato com voláteis extraídos de vagens de soja (200 µL) o número total de ovos foi de 71, porém após 48 horas esse valor reduziu para 43 ovos (Fig. 5.4). Efeito semelhante foi observado no tratamento com a mistura de padrões de compostos alcanos e aldeídos, onde 81 e 74 ovos foram depositados respectivamente, 24 após a aeração das fêmeas, observando-se redução acentuada (19 e 23 ovos) 48 horas após a aeração. A aeração com hexano P.A. fez com que as fêmeas depositassem mais ovos (45) do que na aeração com água (28 ovos), 24 horas após o contato. Porém, 48 horas após observou-se redução no número de ovos depositados pelas fêmeas aeradas com hexano (18), enquanto que as fêmeas aeradas com água mantiveram o número de ovos (28) (Fig. 5.4).

Na concentração testada (0,1 mg/mL) observou-se que os padrões de voláteis alcanos e aldeídos apresentam efeito estimulante de oviposição para *E. heros*, porém este efeito se reduz drasticamente 48 horas após o contato dos insetos com os compostos químicos. Os voláteis extraídos de vagens de soja (200 µL) apresentam o mesmo efeito estimulante de oviposição, porém com período de ação maior, que pode estar relacionado com a menor volatilidade dos compostos. A mistura de voláteis de plantas mostrou-se mais estimulante do que os voláteis alcanos e aldeídos isolados, sugerindo que os compostos atuam em sinergia. Portanto, a mistura de voláteis extraídos das vagens de soja 'BRS 267' apresenta potencial maior para uso como condicionante de oviposição de *E. heros* em substratos artificiais.

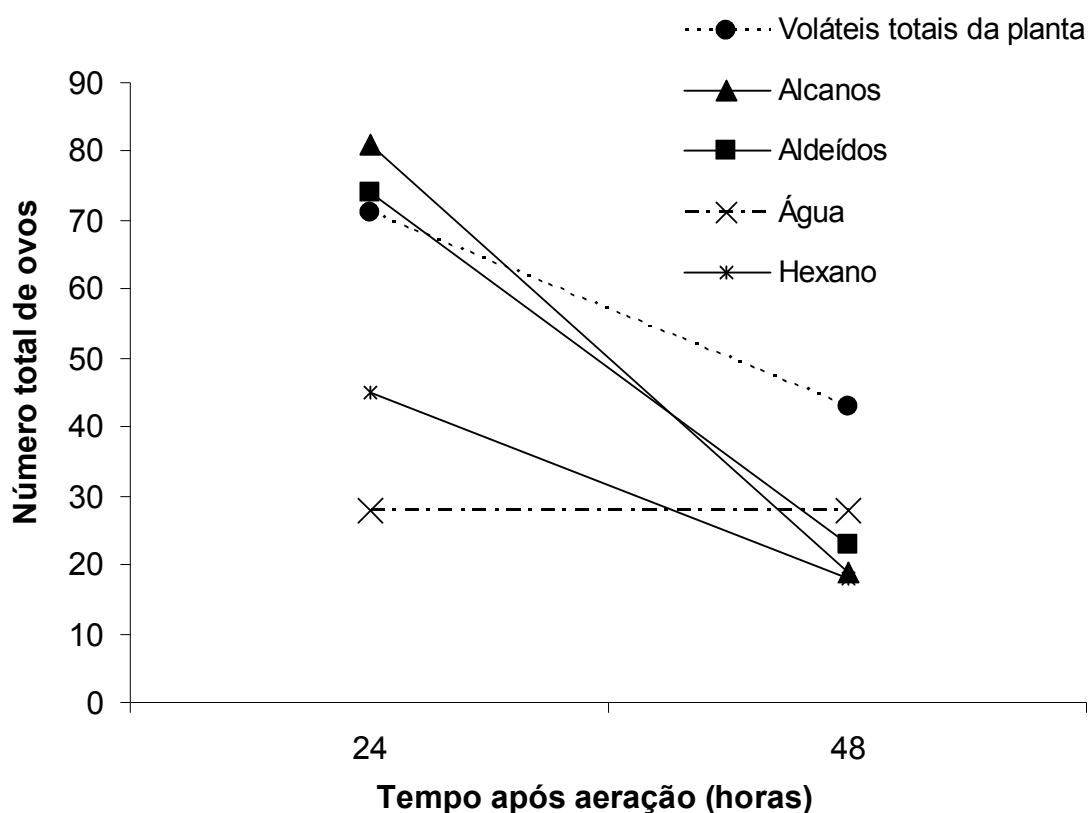


Figura 5.4. Número total de ovos depositados por *Euschistus heros* 24 e 48 horas após o contato com diferentes compostos voláteis, hexano e água, em olfatômetro.

Compostos voláteis e não-voláteis (açúcares e isoflavonas) presentes em vagens de soja influenciam positiva ou negativamente a oviposição de *Euschistus heros*. Estudos complementares que ajudem a elucidar os mecanismos envolvidos no reconhecimento dos compostos químicos de soja pelos pentatomídeos fitófagos poderão viabilizar estudos de seleção de genótipos de soja resistentes e de ferramentas de manejo e controle comportamental de percevejos-praga com uso de fitoquímicos.

5.4. Literatura citada

Aldrich, J.R. 1988. Chemical ecology of the Heteroptera. *Annu. Rev. Entomol.* 33: 211-238.

Bernays, E.A. & R.F. Chapman. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, London, UK, 312 p.

Bernklau, E.J. & L.B. Bjostad. 2008. Identification of feeding stimulants in corn roots for western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae. *J. Econ. Entomol.* 101: 341-351.

Borges, M., K. Mori, M.L.M. Costa & E.R. Sujii. 1998. Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a sex pheromone of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *J. Appl. Entomol.* 122: 335-338.

Borges, M., P.H.G. Zarbin, J.T.B. Ferreira & M.L.M. da Costa. 1999. Pheromone sharing: blends based on the same compounds for *Euschistus heros* and *Piezodorus guildinii*. *J. Chem. Ecol.* 25: 629-634.

Blom, F. 1978. Sensory activity and food intake: a study of input-output relationships in two phytophagous insects. *J. Zool.* 28: 277-340.

- Bundy, C.S. & R.M. McPherson. 2000.** Morphological examination of stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) eggs on cotton and soybeans, with a key to genera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 616-624.
- Carrão-Panizzi, M.C. & K. Kitamura. 1995.** Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. *Breeding Sci.* 45: 295-300.
- Carrão-Panizzi, M.C., A.D.P. Beléia, K. Kitamura & M.C.N. Oliveira. 1999.** Effects of genetics and environment of isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. *Pesq. Agrop.Brasil.* 34: 1787–1795.
- Chinta, S., J.C. Dickens & J.R. Aldrich. 1994.** Olfactory reception of potential pheromone and plant odors by tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J. Chem. Ecol.* 20: 3251-3267.
- Corrêa-Ferreira, B.S. 2002.** *Trissolcus basal* para o controle de percevejos da soja. In Parra, J.R.P.; P.S.M. Botelho; B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento. (eds.). *Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores*. Manole, São Paulo, Brasil, 609 p.
- De Jong, R. & E. Städler. 1999.** The influence of odour on the oviposition behaviour of the cabbage root fly. *Chemoecology.* 9: 151-154.

- Derridj, S., B.R. Wu, L. Stammitti, J.P. Garrec & A. Derrien. 1996.** Chemicals on the leaf surface, information about the plant available to insects. *Entomol. Exp. Appl.* 80: 197-201, 1996.
- Eisemann, C.H. & M.J. Rice. 1985.** Oviposition behaviour of *Dacus tryoni*: effects of some sugars and salts. *Entomol. Exp. Appl.* 39: 61-71.
- Endo, N., M. Abe & K. Matsuda. 2004.** Feeding stimulants of Solanaceae-feeding lady beetle, *Epilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera: Coccinellidae) from potato leaves. *Appl. Entomol. Zool.* 39: 411-416.
- Hilker, M. & T. Meiners. 2002.** Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Blackwell Publishers, Berlin, Alemanha, 390 p.
- Honda, K., W. Nishii & N. Hayashi. 1997.** Oviposition stimulants for sulfur butterfly, *Colias erate poliographys*: cyanoglucosides as synergists involved in host preference. *J. Chem. Ecol.* 23: 323-331.
- Jorge, L.A.C., R.A. Laumann, M. Borges, M.C.B. Moraes, R.A. Cruz, B.N. Milare, & L. Palhares. 2005.** Software para avaliação do comportamento de insetos. Circular Técnica 30, Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP. 1-7.

- Kudou, S., Y. Fleury, D. Welti, D. Magnolato, T. Uchida, K. Kitamura & K. Okubo. 1991.** Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill). Agr. Biol. Chem. 55: 2227-2233.
- Konstantopoulou, M.A., F.D. Krokos & B.E. Mazomenos. 2004.** Chemical composition of corn leaf essential oils and their role in the oviposition behavior of *Sesamia nonagrioides* females. J. Chem. Ecol. 30: 2243-2256.
- Laumann, R.A., M. Borges, M.C.B. Moraes, C.S.S. Pires, E.R. Sujii, B.S. Corrêa-Ferreira & C.J. Ávila. 2007.** Formulação do feromônio sexual do percevejo-marrom *Euschistus heros*: eficiência de atração, vida útil e raio de ação. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 198, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. 17 p.
- Link, D. 1979.** Percevejos do gênero *Euschistus* sobre soja no Rio Grande do Sul (Hemiptera: Pentatomidae). Rev. Cent. Cien. Rur. 9: 361-364.
- Link, D. & J. Grazia. 1987.** Pentatomídeos da região central do Rio Grande do Sul. An. Soc. Entomol. Brasil. 16: 116-129.
- Lombarkia, N. & S. Derridj. 2002.** Incidence of apple fruit and leaf surface metabolites on *Cydia pomonella* oviposition. Entomol. Exp. Appl. 104: 79-87.

- Malaguido, A.B. & A.R. Panizzi. 1998.** Danos de *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae) em aquênios de girassol. An. Soc. Entomol. Brasil. 27: 535-542.
- Moraes, M.C.B., M. Pareja, R.A. Laumann & M. Borges. 2008.** The chemical volatiles (semiochemicals) produced by Neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). Neotrop. Entomol. 37: 489-505.
- Nishida, R. 1995.** Oviposition stimulants of swallowtail butterflies. In Scriber, J.M., Y. Tsubaki & R.C. Lederhouse (eds). Swallowtail butterflies their ecology and evolutionary biology. Scientific Publishers, Gainesville, Flórida, USA. 154 p.
- Panizzi, A.R. & R. M. Alves. 1993.** Performance of nymphs and adults of the southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) exposed to soybean pods at different phenological stages of development. J. Econ. Entomol. 86: 1088-1093.
- Panizzi, A.R. & E.D.M. Oliveira. 1998.** Performance and seasonal abundance of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* nymphs and adults on a novel food plant (pigeonpea) and soybean. Entomol. Exp. Appl. 88: 169-175.
- Panizzi, A.R., J.E. McPherson, D.G. James, M. Javahery & R.M. McPherson. 2000a.** Stink bugs (Pentatomidae). In Schaefer, C.W. & A.R. Panizzi (eds.). Heteroptera of economic importance. CRC Press, Boca Raton, Flórida, USA. 474 p.

- Panizzi, A.R., J.R.P. Parra, C.H. Santos & D.R. Carvalho. 2000b.** Rearing the southern green stink bug using an artificial dry diet and an artificial plant. *Pesq. Agropec. Brasil.* 35: 709-1715.
- Panizzi, A.R., M. Berhow & R.J. Bartelt. 2004.** Artificial substrate bioassay for testing oviposition of southern green stink bug conditioned by soybean plant chemical extracts. *Environ. Entomol.* 33: 1217-1222.
- Park, Y.K., C.L. Aguiar, S.M. Alencar, H.A.A. Mascarenhas & A.R.P. Scamparini. 2001.** Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. *Ciênc. Tec. Alim.* 3: 156–160.
- Piubelli, G.C., C.B. Hoffmann-Campo, F. Moscardi, S.H. Miakubo & M.C.N. Oliveira. 2005.** Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? *J. Chem. Ecol.* 31: 1509-1525.
- Rao, K.V., S.K. Chattopadhyay & G.C. Reddy. 1990.** Flavonoids with mosquito larval toxicity. *J. Agr. Food Chem.* 38: 1427-1430.
- Ribeiro, M.L.L., J.M.G. Mandarino, M.C. Carrão-Panizzi, M.C.N. Oliveira, C.B.H. Campo, A.L. Nepomuceno & E.I. Ida. 2007.** Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *J. Food. Compos. Anal.* 20: 19-24.
- Romani, R., G. Salermo, F. Frati, E. Conti, N. Isidoro & F. Bin. 2005.** Oviposition behaviour in *Lygus rugulipennis*: a morpho-functional study. *Entomol. Exp. Appl.* 115: 17-25.

- SAS Institute. 1981.** SAS for linear models. A guide to the ANOVA and GLM procedures. SAS Institute, Cary, N.C.
- Shearer, P.W. & V.P. Jones. 1996.** Suitability of macadamia nut as a host plant of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). J. Econ. Entomol. 89: 996-1003.
- Silva, F.A.C. & A.R. Panizzi. 2007.** Cotton balls as an oviposition substrate for laboratory rearing of phytophagous stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 100: 745-748.
- Silva, F.A.C. & A.R. Panizzi. 2008.** The adequacy of artificial oviposition substrates for laboratory rearing of *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Heteroptera, Pentatomidae). Rev. Bras. Entomol. 52: 131-134.
- Sosa-Gomez, D.R., I.C. Corso & L. Morales. 2001.** Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and metamidophos in the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). Neotrop. Entomol. 36: 317-320.
- Sutherland, O.R.W., G.B. Russell, D.R. Biggs & G.A. Lane. 1980.** Insect feeding deterrent activity of phytoalexin isoflavonoids. Biochem. Syst. Ecol. 8: 73-75.

- Swoboda, L.E., D.M. Miller, R.J. Fell & D.E. Mullins. 2007.** The effect of nutrient compounds (sugars and amino-acids) on bait consumption by *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiol.* 44: 547-563.
- Toledo, A.M., C.B. Hoffmann-Campo, A.L. Boiça-Júnior, M.C. Salvador, S.H. Myakubo, S.H. Silva & A.C.F. Mendes. 2006.** Efeito de isoflavonóides no comportamento alimentar de *Nezara viridula* (L.). P. 83. In Resumos do IV Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, PR.
- Ventura, M.U. & A.R. Panizzi. 2000.** Oviposition behavior of *Neomegalotomus parvus* (West.) (Hemiptera: Alydidae): daily rhythm and site choice. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 29: 391-400.
- Villas Bôas, G. L. & A.R. Panizzi. 1980.** Biologia de *Euschistus heros* (Fabricius, 1789) em soja (*Glycine max* L. Merrill). *An. Soc. Entomol. Brasil* 9: 105-113.
- Zar, J.H. 1984.** Biostatistical analysis, 2nd ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.

CAPÍTULO 6

Comparação do perfil químico e análise de preferência alimentar e de oviposição de *Euschistus heros* em vagens de soja de diferentes cultivares

6.1. Introdução

Os compostos fitoquímicos são conhecidos por influenciar o comportamento alimentar dos insetos herbívoros, entretanto, há inúmeras evidências de que eles podem mediar também o comportamento de oviposição (Bernays & Chapman 1994, Hilker & Meiners 2002).

A identificação de compostos químicos extraídos de plantas hospedeiras, que atuam como estimulantes de oviposição para insetos-praga tem ganho importância, devido ao potencial de uso na manipulação do comportamento dos insetos no campo. Muitos estudos conduzidos nesta área demonstram que as fêmeas de insetos especialistas (mono e oligófagos) aparentemente, selecionam a planta hospedeira com base na presença de fitoquímicos que são característicos da família das plantas utilizadas preferencialmente, pelos insetos imaturos (Städler 1992). Porém, para insetos generalistas (polífagos), como a maioria dos pentatomídeos fitófagos, as bases químicas que determinam a seleção do hospedeiro são pouco conhecidas.

O percevejo-marrom, *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) é considerado uma das principais pragas da soja, *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae) (Panizzi *et al.* 2000) e, embora seja polífago, apresenta preferência por esta leguminosa (Panizzi & Oliveira 1998), indicando que a soja apresenta além de características nutricionais favoráveis ao desenvolvimento, fitoquímicos que são atrativos a este percevejo. Evidentemente, a resposta dos insetos pode variar de acordo com o

genótipo de soja, e por esta razão, foram conduzidos estudos com *E. heros* comparando o comportamento alimentar e de oviposição desses insetos em diferentes cultivares de soja: BRS 213, BRS 267, BR 16 e IAC-100. Essas cultivares foram selecionadas por apresentarem características bem distintas, como ausência das enzimas lipoxigenases, responsáveis pela formação de alguns compostos voláteis (BRS 213), menor concentração de isoflavonas (BRS 267), sementes menores e maior suscetibilidade ao ataque de insetos (BR 16) e resistência ao ataque de insetos, inclusive percevejos (IAC-100). Buscou-se analisar as respostas dos insetos com base no perfil químico e nas características físicas, como pilosidade das vagens, das cultivares estudadas.

Dentre os fitoquímicos de soja estudados destacam-se as isoflavonas, que compreendem os compostos glicosídeos genistina, daidzina e glicitina, bem como suas formas agliconas correspondentes, genisteína, daidzeína e gliciteína (MacLeod & Ames 1988) e as formas acetil e malonil (Kudou *et al.* 1991). Esses compostos têm sido relatados como deterrente alimentar para percevejos (Toledo *et al.* 2006) e estão associados com os mecanismos de resistência em algumas cultivares de soja (Rossetto *et al.* 1995, Rao *et al.* 1990).

Os compostos voláteis presentes nas diferentes cultivares de soja também foram comparados, pois estudos anteriores demonstraram que fêmeas de *E. heros* respondem positivamente aos voláteis presentes em extrato de vagens de soja, além de efetuarem significativamente mais posturas em áreas tratadas com os extratos em comparação com áreas não tratadas (Silva *et al.* 2007).

Portanto, visando utilizar os extratos de soja na manipulação do comportamento de oviposição dos percevejos em laboratório, conduziu-se esse estudo. O objetivo principal foi identificar os compostos fitoquímicos de diferentes cultivares de soja, que influenciam no

comportamento de oviposição de *E. heros*, selecionando a cultivar mais atrativa aos percevejos, para fins de aprimoramento de sua criação em laboratório.

6.2. Material e métodos

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Bioecologia de Percevejos, no Laboratório de Melhoramento Genético da Embrapa Soja, Londrina, PR e no Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Cenargen, Brasília, DF, de janeiro a julho de 2008.

6.2.1. Cultivo das plantas de soja

Sementes de soja das cultivares BRS 213; BRS 267; BR 16 e IAC-100 foram semeadas em vasos de plástico (5,0 L) contendo solo esterilizado. Os vasos foram colocados em casa de vegetação em condições controladas de temperatura (27 °C), umidade relativa ($70 \pm 10\%$), luminosidade (25000 Lux) e fotoperíodo (L14:E10). Para todos os ensaios foram utilizadas plantas no estágio reprodutivo (R6) (Fehr *et al.* 1971).

6.2.2. Extração, identificação e quantificação de compostos voláteis, açúcares e isoflavonas de vagens de soja de diferentes cultivares

Para extração dos compostos voláteis das vagens de soja adaptou-se a metodologia de Moraes *et al.* (2005). A análise de Somogy (1945) e Nelson (1944) foi realizada para a determinação do teor de açúcares redutores nas vagens e, para na análise de isoflavonas utilizou-se metodologia adaptada de Kudou *et al.* (1991).

Os procedimentos de extração, identificação e quantificação dos diferentes compostos (voláteis, açúcares e isoflavonas) estão relatados detalhadamente no Capítulo 4.

6.2.5. Preferência alimentar de *Euschistus heros* por vagens de diferentes cultivares de soja

Fêmeas de *E. heros*, provenientes da criação em laboratório foram deixadas em jejum durante 20 horas, com água *ad libitum*.

Para condução de teste sem chance de escolha as fêmeas jejuadas (n= 40) foram colocadas individualmente, em placas de Petri (6,0 cm de diâmetro) contendo uma vagem (R6) de uma das cultivares de soja testadas. No teste com chance de escolha, as fêmeas (n= 20) foram mantidas em caixas gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) contendo uma vagem de cada cultivar de soja.

As análises foram conduzidas em sala com temperatura controlada (25 ± 1 °C) e os insetos foram observados durante três horas. Avaliou-se o tempo de alimentação (minutos) em cada cultivar soja.

6.2.6. Oviposição de *Euschistus heros* sobre vagens de diferentes cultivares de soja

Em teste com chance de escolha quinze casais de *E. heros* com dez dias de idade, provenientes de criação em laboratório, foram colocados individualmente, em caixas gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) contendo uma vagem (R6) de cada cultivar de soja testada (BRS 213, BRS 267, BR 16 e IAC-100).

Os insetos foram mantidos em condições controladas (25 ± 1 °C, $70 \pm 5\%$ UR, fotofase 14h) e observados diariamente durante quatro dias. Avaliou-se o número médio de posturas e a porcentagem de posturas foi calculada.

6.2.7. Análise dos dados

A concentração média de voláteis, açúcares e de isoflavonas, bem como o tempo médio de alimentação em cada cultivar de soja foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As porcentagens de posturas foram transformadas em arcoseno $\sqrt{x + 1}$ para comparação pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa estatístico SAS 8.2. (SAS Institute 1981, Zar 1984).

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Análise do perfil químico de vagens das cultivares de soja

O perfil químico das cultivares de soja (BRS 213, BRS 267, BR 16 e IAC-100) apresentou variações qualitativas e quantitativas, como veremos a seguir.

6.3.1.1. Identificação e quantificação de compostos voláteis presentes em vagens de diferentes cultivares de soja

A análise do perfil químico das vagens das diferentes cultivares demonstrou composição semelhante de voláteis, porém com variação nas concentrações. De modo geral, as cultivares BRS 213 e BRS 267 apresentaram concentração maior de voláteis do que as cultivares BR 16 e IAC-100 (Fig. 6.1). Compostos como o 1-octen-3-ol, 3-octanona e (*E*)-2-hexenal ocorreram em concentrações maiores na 'BRS 213' e 'BRS 267'. Alguns compostos não foram detectados em todas as cultivares como o hexanol, geranyl acetona e α -pineno na 'BR 16' e o canfeno na 'BRS 213' (Tabela 6.1). O alceno mirceno que foi observado anteriormente na cultivar BRS 267 (ver Capítulo 4), não foi detectado nesta cultivar e nas demais cultivares analisadas.

Ao comparar os voláteis de cultivares de soja suscetível (Davis) e resistente (PI 227687) a insetos mastigadores, Liu *et al.* (1989) observaram a presença de 2-hexenal, 4-hexen-1-ol-acetato e 2,2-dimetilhexanal nas duas cultivares, porém em concentrações muito diferentes. Por exemplo, o composto 4-hexen-1-ol-acetato, considerado atrativo aos insetos, foi observado em concentração maior na cultivar suscetível (68%) do que na cultivar resistente (29%). Compostos como o 3-

tetradecano e 1-dodecano foram encontrados apenas na cultivar resistente, bem como alguns hidrocarbonetos insaturados e terpenóides, sugerindo que esses compostos estão associados com o efeito repelente que esta cultivar apresenta.

Das cultivares analisadas neste estudo, apenas a IAC-100 é considerada resistente a insetos. Esta cultivar apresentou a mesma composição de voláteis das outras cultivares estudadas, porém em concentrações menores, sugerindo que o teor de voláteis presentes nas vagens pode estar envolvido nos mecanismos de resistência da soja 'IAC-100'.

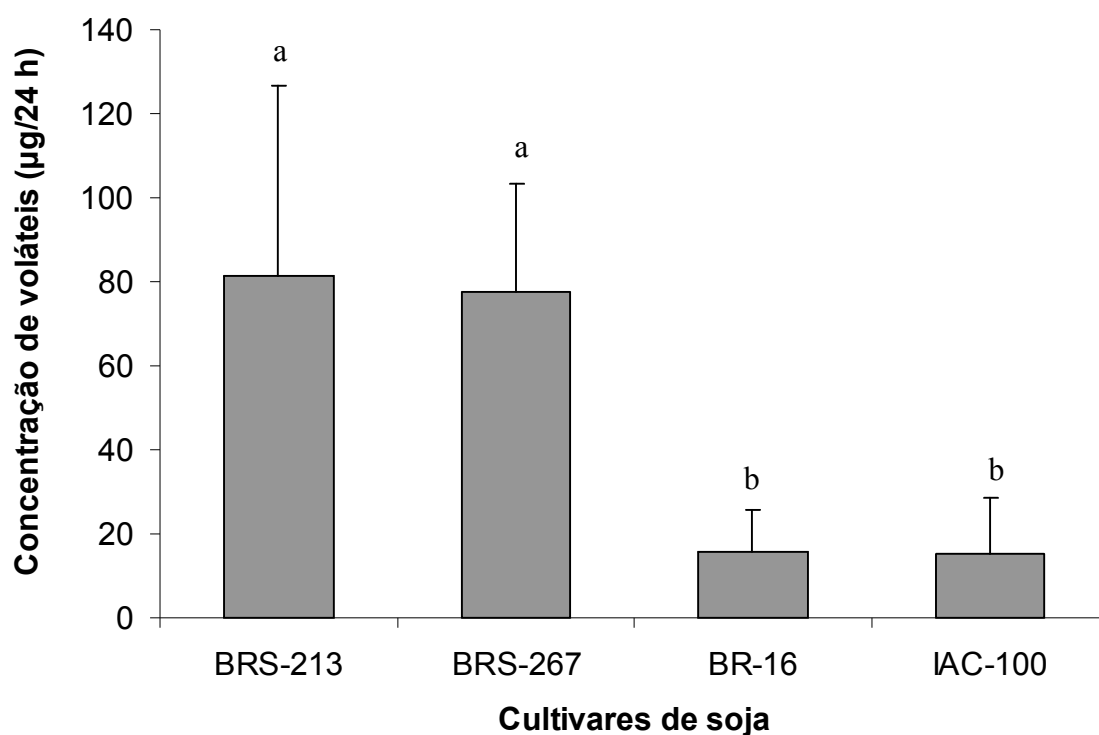


Figura 6.1. Concentração média ($\pm$ EP) de voláteis liberados por vagens de cultivares de soja. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 6.1. Concentração média ($\mu\text{g}/24\text{ h}$) ($\pm$ EP) de compostos voláteis extraídos por aeração forçada de vagens das cultivares de soja BRS 213, BRS 267, BR 16 e IAC-100, em estágio R6.

Compostos	Concentração média ($\pm$ EP)			
	BRS 213	BRS 267	BR 16	IAC-100
<i>Alcoois</i>				
(Z)-3-hexen-1-ol	$9,034 \pm 2,072$	$2,945 \pm 1,798$	$4,777 \pm 4,369$	$0,457 \pm 0,385$
Hexanol	$0,058 \pm 0,017$	$0,518 \pm 0,303$	Nd*	$0,383 \pm 0,456$
Nonanol	$0,106 \pm 0,130$	$0,185 \pm 0,227$	$0,042 \pm 0,019$	$0,571 \pm 0,358$
1-Octen-3-ol	$51,360 \pm 46,184$	$37,001 \pm 29,752$	$4,224 \pm 2,952$	$0,742 \pm 0,392$
(E)-2-Nonen-1-ol	$0,258 \pm 0,026$	$0,328 \pm 0,161$	$0,804 \pm 0,884$	$0,795 \pm 0,702$
2,6 nonadiol	$0,065 \pm 0,012$	$0,260 \pm 0,182$	$0,045 \pm 0,013$	$0,667 \pm 0,747$
<i>Aldeídos</i>				
(E)-2-hexenal	$3,305 \pm 1,320$	$2,933 \pm 0,386$	$0,704 \pm 0,333$	$0,362 \pm 0,425$
Nonanal	$0,351 \pm 0,053$	$2,063 \pm 1,070$	$0,258 \pm 0,174$	$0,660 \pm 0,680$
Decanal	$0,373 \pm 0,030$	$1,873 \pm 1,064$	$0,196 \pm 0,082$	$0,686 \pm 0,834$
<i>Cetonas</i>				
3-Octanona	$9,560 \pm 2,739$	$7,622 \pm 2,062$	$2,369 \pm 1,355$	$0,509 \pm 0,548$
<i>Alcanos</i>				
Geranil acetona	$0,147 \pm 0,083$	$0,703 \pm 0,319$	Nd	$1,036 \pm 1,006$
(Z)-3-hexenil acetato	$1,009 \pm 0,467$	$4,046 \pm 2,532$	$0,615 \pm 0,173$	$0,504 \pm 0,599$
α -pineno	$0,012 \pm 0,015$	$0,152 \pm 0,085$	Nd	$0,516 \pm 0,462$
Canfeno	Nd	$1,955 \pm 0,468$	$0,253 \pm 0,068$	$0,525 \pm 0,489$
Undecano	$0,114 \pm 0,006$	$0,700 \pm 0,303$	$0,074 \pm 0,025$	$1,098 \pm 0,393$
Dodecano	$0,063 \pm 0,009$	$0,292 \pm 0,140$	$0,027 \pm 0,013$	$1,121 \pm 0,540$
Tridecano	$0,267 \pm 0,114$	$1,453 \pm 0,749$	$0,140 \pm 0,097$	$0,865 \pm 0,874$
Pentadecano	$0,390 \pm 0,242$	$3,392 \pm 0,483$	$0,381 \pm 0,246$	$1,069 \pm 1,040$
Hexadecano	$0,461 \pm 0,149$	$2,302 \pm 1,137$	$0,172 \pm 0,109$	$1,264 \pm 1,062$

*Nd = não detectado.

6.3.1.2. Quantificação de açúcares redutores presentes em vagens de diferentes cultivares de soja

Não foi observada diferença significativa na concentração de açúcares redutores presentes em vagens de diferentes cultivares de soja. Através da análise de Somogy & Nelson verificou-se que a porcentagem média de açúcares redutores nas vagens integrais foi de 9,9% para a cultivar BRS 267, 7,9% para a 'BR 16'; 7,6% para a 'BRS 213' e 7,2% para a cultivar IAC-100 (Tabela 6.2). Em todas as cultivares as maiores porcentagens de açúcares foram observadas nas sementes desengorduradas, pois, com a retirada dos lipídios os açúcares ficam mais concentrados nas amostras.

Embora não tenham ocorrido diferenças significativas, houve tendência da cultivar BRS 267 em apresentar teor mais elevado de açúcares, nas vagens e nas sementes integrais. Essa cultivar é recomendada para fins alimentares justamente, por possuir características químicas desejáveis para o consumo como soja verde ou hortalica (Carrão-Panizzi *et al.* 2006, Castiglioni 2006). O teor de açúcares nas sementes é um fator comercialmente importante, pois pode influenciar no valor nutricional, na digestibilidade e na qualidade dos produtos derivados de soja. Os principais açúcares presentes em sementes de soja são glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose (Eldridge *et al.* 1979), sendo que os três primeiros açúcares apresentam características positivas ao paladar e a digestibilidade humana, enquanto que a rafinose e a estaquiose são menos favoráveis (Hymowitz *et al.* 1972). A concentração desses compostos pode variar amplamente entre os genótipo de soja, como observado por Hymowitz & Collins (1974).

Análises comparativas de sementes de soja de diferentes genótipos realizadas por Hou *et al.* (2008) indicaram variação de 37,2 a 148,7 (mg/g) na concentração de açúcares totais. Essas

variações são determinadas geneticamente e também por alterações ambientais (Stombaugh *et al.* 2000), sendo essas últimas responsáveis também por variações na composição geral das sementes de soja. Wilcox e Shibles (2001) observaram que existe relação entre o teor de proteínas e de carboidratos nas sementes de soja, indicando que os níveis de sacarose decrescem quando aumenta a concentração de proteínas na semente, dependendo do genótipo e do ambiente de cultivo.

Nesse estudo, a diferença na concentração de açúcares totais observada entre as cultivares, pode estar realacionada às características genéticas, pois todas as plantas foram cultivadas em condições ambientais idênticas.

Tabela 6.2. Porcentagem média (mg/100 g) ($\pm$ EP) de açúcares redutores totais presentes em vagens verdes desengorduradas, sementes verdes integrais e desengorduradas de soja, de quatro cultivares.

Cultivares de soja	Porcentagem média ($\pm$ EP) ¹ de açúcares redutores totais		
	Vagem desengordurada	Semente integral	Semente desengordurada
BRS 213	7,6 $\pm$ 0,4	5,5 $\pm$ 0,1	9,0 $\pm$ 0,4
BRS 267	9,9 $\pm$ 0,2	8,3 $\pm$ 0,4	9,9 $\pm$ 0,6
BR 16	7,9 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 0,3	10,3 $\pm$ 0,1
IAC-100	7,2 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,3	9,0 $\pm$ 0,8

6.3.1.3. Quantificação de isoflavonas presentes em vagens de diferentes cultivares de soja

A concentração de isoflavonas foi variável entre as cultivares analisadas. As cultivares IAC-100 e BR 16 apresentaram os maiores níveis de isoflavonas totais 49,4 e 37,0 (mg/100g) respectivamente, enquanto que a cultivar BRS 213 apresentou a menor concentração (11,5 mg/100g). Nenhuma das 12 formas de isoflavonas foi detectada nas amostras da cultivar BRS 267 (Fig. 6.2).

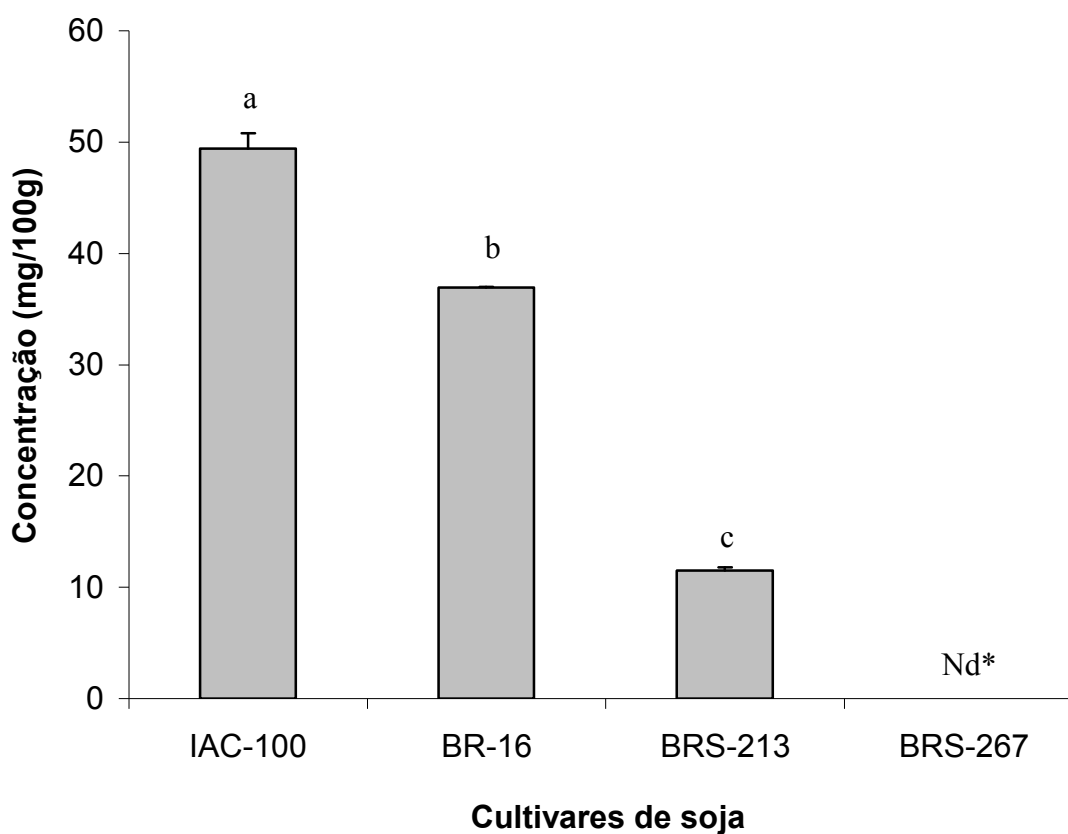


Figura 6.2. Concentração média ($\pm$ EP) de isoflavonas presentes em vagens de soja de diferentes cultivares. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). * Nd = não detectado.

Em estudo comparando o teor de isoflavonas em plantas de soja maduras cultivadas em regiões geográficas diferentes, Carrão-Panizzi *et al.* (1998) observaram que na cultivar IAC-100 a concentração de isoflavonas em sementes maduras pode variar de 116,4 a 177,3 mg/100 g e na cultivar BR 16 esses valores variam de 107,1 a 126,5 mg/100 g.

Neste estudo observou-se concentração baixa de isoflavonas em todas as cultivares avaliadas. As isoflavonas daidzina e glicitina foram detectadas apenas na cultivar IAC-100, nas concentrações de 4,13 e 1,13 (mg/100 g), respectivamente (Tabela 6.3). Carrão-Panizzi & Kitamura (1995) também detectaram a presença de daidzina na cultivar IAC-100, porém em concentração maior 60,3 mg/100 g.

Observaram-se concentrações semelhantes de daidzeína (8,2 e 8,6 mg/100 g) nas cultivares BR 16 e IAC-100, respectivamente, e níveis elevados de genisteína (16,2 e 15,4 mg/100g) também foram observados nessas duas cultivares. Na cultivar BRS 213 observou-se concentração de daidzeína de 3,7 mg/100 g, valor muito acima do que foi observado por Ribeiro *et al.* (2007). Porém, esta cultivar apresentou nível significativamente menor de isoflavonas totais, comparado com as cultivares BR 16 e IAC-100.

Em todas as cultivares analisadas não foram detectadas as isoflavonas na forma acetil, tampouco a malonil daidzina e a gliciteína (Tabela 6.3). De modo geral, todas as cultivares estudadas apresentaram teor de isoflavonas muito abaixo do observado por Carrão-Panizzi (1996) em diferentes cultivares de soja madura. A temperatura (27 °C) na casa de vegetação durante o período de cultivo pode ter sido responsável pela redução na concentração de isoflavonas nas sementes analisadas, já que este fator é considerado determinante na formação de isoflavonas, durante o período de enchimento das vagens de soja (Kitamura *et al.* 1991, Tsukamoto *et al.* 1995, Carrão-Panizzi *et al.* 1999).

A cultivar IAC-100 apresenta resistência a insetos (Rossetto *et al.* 1995, Piubelli *et al.* 2005) provocada por muitos mecanismos, como menor período de enchimento de vagens, rejeição de sementes novas danificadas, etc. Possivelmente, o teor elevado de isoflavonas seja outro fator envolvido nos mecanismos de resistência desta cultivar, pois alguns estudos demonstram que as isoflavonas têm papel fundamental na resistência de plantas contra insetos (Sutherland *et al.* 1980, Rao *et al.* 1990, Piubelli *et al.* 2005). Resultados anteriores (ver Capítulo 5) indicaram que as isoflavonas influenciam negativamente na oviposição de *E. heros*, reforçando a importância desses compostos como mediadores do comportamento dos pentatomídeos.

Entretanto, a maioria dos estudos sobre o perfil químico da soja apresenta uma abordagem fitoquímica, buscando avaliar as características favoráveis à comercialização da soja e seus derivados. Em pesquisas com cultivares de soja resistentes a insetos, poucos autores relacionaram os mecanismos de resistência com a composição química das sementes (Tester 1977, Grunwald & Kogan 1981, Liu *et al.* 1989), a maioria considera apenas as características morfológicas e/ou genéticas da planta (Jones & Sullivan 1978, Gilman *et al.* 1982, Ihsan-ul-Had *et al.* 2003).

As cultivares de soja estudadas (BRS 267, BRS 213, BR 16 e IAC-100) são comerciais e foram desenvolvidas através de técnicas tradicionais de melhoramento genético e, o fato delas apresentarem compostos atrativos e/ou repelentes aos insetos, aparentemente, não é um resultado intencional. Tendo em vista que os fatores químicos que determinam a resistência a insetos nessas diferentes cultivares de soja não foram elucidados, é possível utilizar os resultados do perfil químico dos voláteis, açúcares e isoflavonóides obtidos nesse estudo, como base para novas pesquisas sobre resistência de soja a insetos.

Tabela 6.3. Concentração média (mg/100 g) ($\pm$ EP) de isoflavonas presentes em vagens de soja das cultivares BRS 213, BR 16 e IAC-100, em estágio R6.

Isoflavonas ²	Concentração média ($\pm$ EP) ¹		
	BRS 213	BR 16	IAC-100
Daidzina	0,00 $\pm$ 0,00 Bd	0,00 $\pm$ 0,00 Bd	4,13 $\pm$ 0,10 Ad
Glicitina	0,00 $\pm$ 0,00 Bd	0,00 $\pm$ 0,00 Bd	1,13 $\pm$ 0,03 Ae
Genistina	1,54 $\pm$ 0,04 Bc	4,47 $\pm$ 0,03 Ac	5,98 $\pm$ 0,23 Ac
Malonil Daidzina	0,00 $\pm$ 0,00 Ad	0,00 $\pm$ 0,00 Ad	0,00 $\pm$ 0,00 Af
Malonil Glicitina	2,57 $\pm$ 0,42 Bb	4,07 $\pm$ 0,03 Ac	5,12 $\pm$ 0,19 Ac
Malonil Genistina	0,00 $\pm$ 0,00 Cd	3,82 $\pm$ 0,12 Bc	8,96 $\pm$ 0,33 Ab
Acetil Daidzina	0,00 $\pm$ 0,00 Ad	0,00 $\pm$ 0,00 Ad	0,00 $\pm$ 0,00 Af
Acetil Glicitina	0,00 $\pm$ 0,00 Ad	0,00 $\pm$ 0,00 Ad	0,00 $\pm$ 0,00 Af
Acetil Genistina	0,00 $\pm$ 0,00 Ad	0,00 $\pm$ 0,00 Ad	0,00 $\pm$ 0,00 Af
Daidzeína	3,71 $\pm$ 0,18 Ba	8,28 $\pm$ 0,04 Ab	8,63 $\pm$ 0,20 Ab
Gliciteína	0,00 $\pm$ 0,00 Ad	0,00 $\pm$ 0,00 Ad	0,00 $\pm$ 0,00 Af
Genisteína	3,66 $\pm$ 0,10 Ba	16,28 $\pm$ 0,06 Aa	15,45 $\pm$ 0,39 Aa
Isoflavona total	11,48 B	36,92 A	49,4 A

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

² Não foram detectadas isoflavonas na cultivar BRS 267.

A detecção de daidzeína e genisteína nas diferentes cultivares pode ter ocorrido devido à ação da enzima beta-glicosidase, que hidrolisa as isoflavonas glicosídicas (daidzina e genistina),

transformando-as em suas formas agliconas (Matsuura *et al.* 1995). A ativação dessa enzima pode ter sido causada pelo dano mecânico durante a retirada das vagens das plantas, ou mesmo, durante a extração das isoflavonas, quando as sementes foram moídas para o preparo da farinha desengordurada.

6.3.2. Preferência alimentar de *Euschistus heros* por vagens de diferentes cultivares de soja

Em teste com chance de escolha as fêmeas de *E. heros* apresentaram preferência alimentar por vagens de soja (R6) da cultivar BRS 267, com tempo de alimentação significativamente maior que nas demais (50,4 minutos), na cultivar IAC-100 o tempo foi de 33,3 minutos, superior à BRS 213 e BR 16 (Fig. 6.3). No teste sem chance de escolha não foi observada diferença significativa no tempo de alimentação entre as cultivares BRS 267, BRS 213 e BR 16; já na cultivar IAC-100 os percevejos apresentaram o menor tempo de alimentação (96,9 min.) (Fig. 6.3).

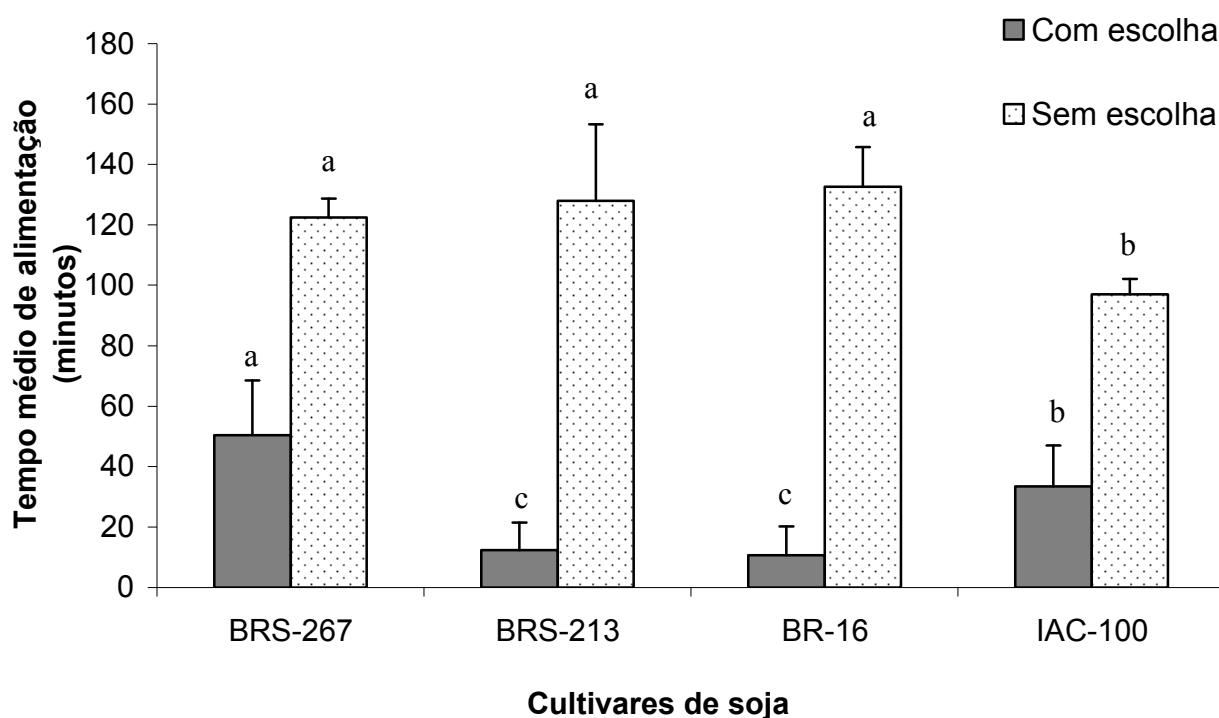


Figura 6.3. Tempo médio ($\pm$ EP) de alimentação de fêmeas de *Euschistus heros* em vagens de diferentes cultivares de soja, em testes com e sem chance de escolha. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

No teste com chance de escolha, a preferência alimentar de *E. heros* por vagens de soja 'BRS 267' pode estar relacionado ao fato de esta cultivar apresentar níveis maiores de açúcares que as demais cultivares testadas. Carrão-Panizzi *et al.* (2006) relata que esta cultivar apresenta concentração maior de sacarose, o que lhe confere sabor adocicado característico. Esta característica pode ter um efeito fagoestimulante para os insetos (Tester 1977). Adicionalmente, observou-se através da análise do perfil químico das vagens, que a cultivar 'BRS 267' apresenta concentrações maiores de voláteis do que as outras cultivares analisadas; a mistura desses voláteis também foi

atrativa aos insetos (ver Capítulo 5). Portanto, esses fatores associados podem ter contribuído para a maior preferência alimentar de fêmeas de *E. heros* nesta cultivar de soja.

Embora a cultivar IAC-100 seja relatada como resistente a percevejos (Rossetto *et al.* 1995), no presente estudo observou-se tempo de alimentação maior nesta cultivar do que nas cultivares BRS 213 e BR 16, em teste com chance de escolha, indicando que outros fatores podem estar envolvidos no processo de seleção de alimento pelos percevejos.

Entretanto, no teste sem chance de escolha o tempo de alimentação de *E. heros* na cultivar IAC-100 foi significativamente menor do que nas demais cultivares avaliadas. Como observado anteriormente, esta cultivar de soja apresenta concentrações maiores de isoflavonas, sugerindo que esses compostos podem ter causado a menor preferência alimentar de *E. heros*. Efeito deterrente de alimentação causado pelas isoflavonas (genistina e daidzina) foi observado em *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) (Toledo *et al.* 2006) e acredita-se que a concentração alta de daidzina nas sementes de soja pode ser um dos fatores de resistência a insetos (Carrão-Panizzi & Kitamura 1995). No presente estudo, a cultivar IAC-100 apresentou concentração maior de daidzina do que as demais cultivares analisadas.

Adicionalmente, as características físicas da cultivar IAC-100 também podem ter influenciado na resposta alimentar dos percevejos, pois as vagens apresentam densidade maior de tricomas e, isto tem sido relatado como um fator que dificulta a alimentação dos percevejos (Panizzi 1991). Não foi observada preferência alimentar significativa dos percevejos pela cultivar BR 16, embora esta cultivar seja considerada suscetível aos insetos (Piubelli *et al.* 2003).

6.3.3. Oviposição de *Euschistus heros* sobre vagens de diferentes cultivares de soja

A oviposição de *E. heros* em diferentes cultivares de soja foi variável. As fêmeas depositaram 60% das posturas nas vagens de soja 'BRS 267' demonstrando preferência significativa por esta cultivar, seguida das cultivares BRS 213 (27,3%), BR 16 (8,85) e IAC-100 (3,9) (Fig. 6.4).

Quando foram oferecidas simultaneamente, vagens de soja com características físicas e químicas diferentes, os insetos preferiram ovipositar na cultivar de soja BRS 267. Características físicas das vagens como tamanho e densidade de tricomas, podem ter influenciado na resposta dos percevejos, ao contrário da cultivar menos aceita ('IAC-100'), que possui vagens menores e com densidade maior de tricomas, sendo esses mais ríspidos, o que pode dificultar na fixação dos ovos pelos percevejos. Ihsan-ul-Had *et al.* (2003) demonstraram que características morfológicas, como área foliar e densidade de tricomas influenciam no comportamento de infestação de diferentes espécies de insetos-praga da soja, determinando o nível de resistência ou suscetibilidade da planta ao ataque pelos insetos.

Os resultados indicam que vagens de soja da cultivar BRS 267 foram preferidas pelas fêmeas de *E. heros*. Resultados anteriores (ver Capítulo 5) demonstraram que extratos químicos obtidos das vagens desta cultivar apresentam efeito condicionante de oviposição para *E. heros*, o que reforça o potencial de uso desta cultivar de soja na manipulação do comportamento de oviposição de percevejos fitófagos em laboratório, facilitando a manutenção de colônias de percevejos e, possivelmente no campo como planta armadilha.

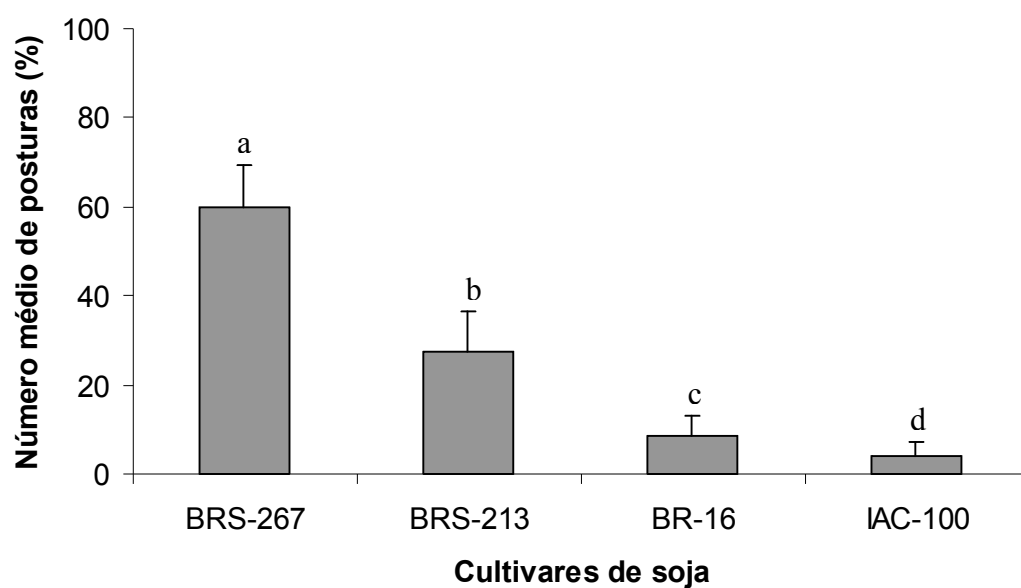


Figura 6.4. Porcentagem média ($\pm$ EP) de posturas de *Euschistus heros* depositadas em vagens de diferentes cultivares de soja. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

6.4. Literatura citada

- Bernays, E.A. & R.F. Chapman. 1994.** Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, London, UK, 312 p.
- Boué, S.M., B.Y. Shih, C.H. Carter-Wientjes & T.E. Cleveland. 2003.** Identification of volatile compounds in soybean at various developmental stages using solid phase microextraction. J. Agr. Food Chem. 51: 4873-4876.
- Carrão-Panizzi, M.C. & K. Kitamura. 1995.** Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. Breeding Sci. 45: 295-300.
- Carrão-Panizzi, M.C. 1996.** Avaliação de cultivares de soja quanto aos teores de isoflavonas. Pesq. Agrop. Brasil 31: 691-698.
- Carrão-Panizzi, M.C., K. Kitamura, A.D.P. Beléia & M.C.N. Oliveira. 1998.** Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybean cultivars. Breeding Sci, 48: 409-413.
- Carrão-Panizzi, M.C., A.D.P. Beléia, K. Kitamura & M.C.N. Oliveira. 1999.** Effects of genetics and environment of isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. Pesq. Agrop.Brasil. 34: 1787-1795.

- Carrão-Panizzi, M.C., A.E. Pípolo, L.A. Almeida, J.M.G. Mandarino, M. Kaster, C.A.A. Arias, G.E.S. Carneiro, J.F.F. Toledo, L.C. Miranda, J.T. Yorinori, W.P. Dias, A.M.R. Almeida, L.A. Domit, V.T. Benassi, N.E. Arantes, A.C.B. Oliveira, R.L. Brogin, E.S. Lambert, P.F. Bertagnolli, M.A.S. Rangel & P.I.M. Souza. 2006.** BRS 267: cultivar de soja para alimentação humana. In Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil, 28, Uberaba. MG., p. 315-317.
- Castiglioni, V. 2006.** Nova soja de sabor suave. *A Lavoura*, 109: 12-13.
- Eldridge, A.C., L.T. Black & W.J. Wolf. 1979.** Carbohydrate composition of soybean flours, protein concentrates, and isolates. *J. Agr. Food Chem.* 27: 799-802.
- Fan, J.T. & J.H. Sun. 2006.** Influences of host volatiles on feeding behaviour of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*. *J. Appl. Entomol.* 130: 238-244.
- Gilman, D.F., R.M. McPherson, L.D. Newsom, D.C. Herzog & C. Williams. 1982.** Resistance in soybeans to the southern green stink bug. *Crop Sci.* 22: 573-576.
- Grunwald, C. & M. Kogan. 1981.** Sterols of soybeans differing in insect resistance and maturity group. *Phytochemistry* 20: 765-768.
- Hilker, M. & T. Meiners. 2002.** Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Blackwell Publishers, Berlin, Germany, 390 p.

- Hou, A., P. Chen, A. Shi, B. Zhang & Y.J. Wang. 2008.** Sugar variation in soybean seed assessed with a rapid extraction and quantification method. *Inter. J. Agron.* 2009: 1-8.
- Hymowitz, T. & F.I. Collins. 1974.** Variability of sugar content in seed of *Glycine max* (L.) Merril and *G. soja* Sieb and Zucc. *Agron. J.* 66: 239-240, 1974.
- Hymowitz, T., F.I. Collins, J. Panczner & W.M. Walker. 1972.** Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. *Agron. J.* 64: 613-616.
- Ihsan-ul-Had, M.A., S.A. Kakakhel & M.A. Khokhar. 2003.** Morphological and physiological parameters of soybean resistance to insect pests. *Asian J. Plant Sci.* 2: 202-204.
- Ikeda T., N. Enda, A. Yamane, K. Oda & T. Toyoda. 1980.** Attractants for the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 15: 358-361.
- Jones, W.A. & M.J. Sullivan. 1978.** Susceptibility of certain soybean cultivars to damage by stink bugs. *J. Econ. Entomol.* 71: 534-536.
- Kudou, S., Y. Fleury, D. Welti, D. Magnolato, T. Uchida, K. Kitamura & K. Okubo. 1991.** Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill). *Agr. Biol. Chem.* 55: 2227-2233.

- Liu, S.H., D.M. Norris & P. Lyne. 1989.** Volatiles from the foliage of soybean, *Glycine max*, and lima bean, *Phaseolus lunatus*: their behavioral effects on the insects *Trichoplusia ni* and *Epilachna varivestis*. J. Agr. Food Chem. 37: 496-501.
- MacLeod, G. & J. Ames. 1988.** Soy flavor and its improvement. CRC Critical Reviews in Food Sci. Nutr. 27: 219-243.
- Matsuura, A., J. Sasaki & S. Murao. 1995.** Studies on β -glucosidases from soybeans that hydrolyse daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. Biosc. Biotech. Biochem. 59: 1623-1627, 1995.
- Moraes, M.C. B., R. Laumann, E.R. Sujii, C. Pires & M. Borges. 2005.** Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. Entomol. Exp. Appl. 155: 227-237.
- Nelson, N.A. 1944.** Photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380.
- Panizzi, A.R. 1991.** Ecologia nutricional de insetos sugadores de sementes. In Panizzi, A.R. & J.R.P. Parra (eds.). Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. Manole, São Paulo, Brasil, 359 p.

- Panizzi, A.R. & E.D.M. Oliveira. 1998.** Performance and seasonal abundance of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* nymphs and adults on a novel food plant (pigeonpea) and soybean. Entomol. Exp. Appl. 88: 169-175.
- Panizzi, A.R., J.E. McPherson, D.G. James, M. Javahery & R.M. McPherson. 2000.** Stink bugs (Pentatomidae). In Schaefer, C.W. & A.R. Panizzi (eds.). Heteroptera of economic importance. CRC Press, Boca Raton, Flórida, USA. 474 p.
- Piubelli, G.C., C.B. Hoffmann-Campo, F. Moscardi, S.H. Miakubo & M.C.N. Oliveira. 2005.** Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? J. Chem. Ecol. 31: 1509-1525.
- Rao, K.V., S.K. Chattopadhyay & G.C. Reddy. 1990.** Flavonoids with mosquito larval toxicity. J. Agr. Food Chem. 38: 1427-1430.
- Ribeiro, M.L.L., J.M.G. Mandarino, M.C. Carrão-Panizzi, M.C.N. Oliveira, C.B.H. Campo, A.L. Nepomuceno & E.I. Ida. 2007.** Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. J. Food. Compos. Anal. 20: 19-24.
- Rossetto, C.J., P.B. Gallo, L.F. Razera, N. Bertoletto, T. Igue, P.F. Medina, O. Tisselli Filho, V. Aguilera, R.F.A.Veiga & J.B. Pinheiro. 1995.** Mechanisms of resistance to stink bug complex in the soybean cultivar 'IAC-100'. An. Soc. Entomol. Brasil 24: 517-522.

SAS Institute. 1981. SAS for linear models. A guide to the ANOVA and GLM procedures. SAS Institute, Cary, N.C.

Silva, F.A.C., A.R. Panizzi, R.A. Laumann, M.C.B. Moraes & M. Borges. 2007. Oviposição de *Euschistus heros* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) em substrato artificial tratado com extrato químico de soja. P. 115. In Resumos do V Encontro Brasileiro de Ecologia Química. Londrina, PR.

Somogy, M. 1945. Determination of blood sugar. J. Biol. Chem. 160: 69-73.

Städler, E. 1992. Behavioral responses of insect to plant secondary compounds. In: Rosenthal, G.A. & M.R. Berenbaum (eds.). Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, vol. II. Academy Press, San Diego, USA, 256 p.

Stombaugh S.K., H.G. Jung, J. H. Orf & D.A. Somers. 2000. Genotypic and environmental variation in soybean seed cell wall polysaccharides. Crop Sci. 40: 408-412.

Sutherland, O.R.W., G.B. Russell, D.R. Biggs & G.A. Lane. 1980. Insect feeding deterrent activity of phytoalexin isoflavonoids. Biochem. Syst. Ecol. 8: 73-75.

Tester, C. 1977. Constituents of soybean cultivars differing in insect resistance. Phytochemistry 16: 1899-1901.

- Toledo, A.M., C.B. Hoffmann-Campo, A.L. Boiça-Júnior, M.C. Salvador, S.H. Myakubo, S.H. Silva & A.C.F. Mendes. 2006.** Efeito de isoflavonóides no comportamento alimentar de *Nezara viridula* (L.). P. 83. In Resumos do IV Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, PR.
- Tsukamoto, C. S., S. Shimada, K. Igita, S. Kudou, M. Kokubun, K. Okubo & K. Kitamura. 1995.** Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavonas, saponins, and composition on fatty acids at different temperatures during seed development. J. Agr. Food Chem. 43: 1184-1192.
- Wilcox, J.R. & R.M. Shibles. 2001.** Interrelationships among seed quality attributes in soybean. Crop sci. 41: 11-14.
- Zar, J.H. 1984.** Biostatistical analysis, 2nd ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para estabelecer uma criação de percevejos fitófagos em laboratório muitos fatores devem ser avaliados, como recipientes de criação, dietas nutricionalmente balanceadas, substratos para oviposição e condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos insetos imaturos e adultos. Esses fatores associados podem garantir o sucesso de uma criação e, por esta razão, busca-se a padronização de metodologias, que sejam eficazes e reduzam a mão-de-obra na manutenção de colônias de percevejos em laboratório.

O uso do algodão hidrófilo para acomodar as posturas de diferentes pentatomídeos, facilita a rotina de manutenção das colônias e favorece a obtenção de gerações sucessivas de insetos sadios e de qualidade. Os mecanismos fisiológicos e comportamentais envolvidos na escolha do algodão pelos percevejos não foram totalmente esclarecidos, mas há evidências de que mecanorreceptores presentes na genitália participem deste processo. As fibras do algodão podem estimular estes mecanorreceptores, desencadeando uma seqüência de comportamentos que termina com a oviposição sobre o algodão. Estudos eletrofisiológicos e análises da seqüência comportamental de fêmeas ovipositantes poderão esclarecer como os mecanorreceptores, presentes nas diferentes espécies de pentatomídeos fitófagos, atuam sobre a oviposição.

O padrão de distribuição dos ovos na postura parece influenciar na escolha do local de oviposição. *Piezodorus guildinii*, por exemplo, prefere substratos de forma alongada que acomodam bem os ovos dispostos em duas linhas paralelas. *Nezara viridula* e *Edessa meditabunda* preferem superfícies maiores e planas. Devido à grande variação no padrão de postura observada entre as espécies de pentatomídeos, torna-se difícil selecionar um único substrato de oviposição, se forem

consideradas apenas a textura e a forma do substrato. Por isso, outras características atrativas devem ser associadas para aumentar a aceitação do substrato pelos percevejos.

Extrato de vagens de soja da cultivar BRS 267 pode ser utilizado em associação com o algodão, pois apresenta efeito condicionante de oviposição para *Euschistus heros*. Os voláteis liberados pelas vagens de soja desta cultivar também atraem as fêmeas de *E. heros*. Surge, assim, a perspectiva de outras aplicações práticas para os compostos voláteis desta cultivar, como o uso dos compostos em iscas atrativas, para monitorar as fêmeas de percevejos no campo.

As fêmeas de *E. heros* apresentam preferência alimentar e de oviposição por vagens de soja da cultivar BRS 267. Esses resultados indicam que as características químicas que são desejáveis nas plantas de soja (sabor mais adocicado e menor teor de isoflavonas), visando sua comercialização, podem interferir nos mecanismos de resistência da planta aos percevejos e por isso, devem ser melhor investigadas. As diferenças observadas na composição química e na resposta alimentar e de oviposição de *E. heros* nas diferentes cultivares de soja, abrem discussão sobre o papel que os compostos voláteis, açúcares e isoflavonas desempenham nos mecanismos de resistência da soja a esses insetos.

Por fim, o conjunto de resultados aqui apresentados sugere a potencialidade da manipulação de substratos artificiais de oviposição para percevejos, associados com extratos químicos de sua planta hospedeira principal, melhorando o processo de manutenção de colônias de percevejos em laboratório, sem a necessidade de utilizar plantas *in natura* como locais para oviposição.