



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NORBERTO APARECIDO DA CRUZ

Estudo Morfológico e Histoquímico do Intestino Médio de
Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera:
Noctuidae) Suscetíveis e Resistentes ao AgMNPV Alimentadas
com Genótipos de Plantas Resistentes a Insetos

LONDRINA
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

NORBERTO APARECIDO DA CRUZ

Estudo Morfológico e Histoquímico do Intestino Médio de
Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera:
Noctuidae) Suscetíveis e Resistentes ao AgMNPV Alimentadas
com Genótipos de Plantas Resistentes a Insetos

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

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

Co- Orientador(a): Prof. Dr. Sheila Michele
Levy

LONDRINA
2010

NORBERTO APARECIDO DA CRUZ

Estudo Morfológico e Histoquímico do Intestino Médio de
Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera:
Noctuidae) Suscetíveis e Resistentes ao AgMNPV Alimentadas
com Genótipos de Plantas Resistentes a Insetos

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

Aprovada em: 25/02/2010

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Júlio de Melo Neto	UEL
Prof. Dr. Luiz Carlos Bruschi	UENP
Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos	UNESP
Profa. Dra. Eliane Victoriano	UEL



Profa. Dra. Ângela Maria Ferreira Falleiros
Orientadora
Universidade Estadual de Londrina

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C957e Cruz, Norberto Aparecido da.
Estudo morfológico e histoquímico do intestino médio de larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera : noctuidae) suscetíveis e resistentes ao AgMNPV alimentadas com genótipos de plantas resistentes a insetos / Norberto Aparecido da Cruz. – Londrina, 2010.
162 f. : il.

Orientador: Ângela Maria Ferreira Falleiros.
Co-orientador: Sheila Michele Levy.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. *Anticarsia gemmatalis* – Intestino médio – Morfologia – Teses. 2. Lagarta da soja – Plantas resistentes – Teses. I. Falleiros, Ângela Maria Ferreira. II. Levy, Sheila Michele. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Galdino Fernandes e Josefa Pereira pelos ensinamentos, carinho e dedicação.

Aos meus irmãos Márcia, Márcio e Vanilda pelo grande companherismo.

À orientadora Ângela Falleiros amiga e segunda mãe.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua bondade, grandiosidade infinita, pela sua proteção, auxílio e conforto nos momentos mais difíceis dessa jornada.

À minha orientadora Ângela Maria Ferreira Falleiros pela orientação, confiança, paciência, amizade e ensinamentos oferecidos tanto na parte acadêmica como de vida.

Aos amigos de turma de mestrado da Universidade Estadual de Londrina, que proporcionaram durante esses anos grandes momentos de alegria.

Aos grandes amigos de turma de graduação André Scarpim, Evandro Prado, Érica Rodrigues, Flávia Mariano, Franciele Carvalho, Graziane Presotto, Luciano Chinen, Tiago Mendes, Rafael Spechotto, Willian Sakomura, Willian Takao, que mesmo longe sempre me incentivaram a alcançar os meus objetivos.

Aos amigos de Botucatu e Ilha Solteira de que forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UEL pelos ensinamentos transmitidos.

As técnicas do Laboratório de Histologia Renata e Andréia que contribuíram na realização desse trabalho.

A professora Sheila Michele Levy pela contribuição bibliográfica, ajuda e conselhos que foram úteis durante esses anos.

Aos ex-companheiros de república em Londrina (Mário Hirano e Ricardo Okumura) e os atuais companheiros (Tiago Baggio e Cláudio Sumida) que foram e são a minha família aqui em Londrina.

Aos novos amigos conquistados em Londrina Everton Hiraoka, Edson Okumura, Ricardo Okumura, Mário Hirano, Tiago Baggio, Jovenil, Gustavo, Cláudio Sumida, Sara Rovaris, Daniela Kelsener, Ernesto Lema, entre outros que fizeram da vida em Londrina um divertido aprendizado.

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

A Embrapa Soja Londrina pelo fornecimento de material para realização do experimento.

Aos demais professores e funcionários do departamento de Histologia.

A secretária da seção de pós graduação Weda Westin pela atenção e amizade durante esses anos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 4.1**– Fotomicrografias do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)..... 71
- Figura 4.2** – Fotomicrografias do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE).....73
- Figura 4.1** - Elétron-Micrografias do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV tratadas com o genótipo BRS 257 (testemunha).....97
- Figura 4.2** Elétron-Micrografias do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV tratadas com o genótipo Dowling.....99
- Figura 4.3** - Elétron-Micrografias do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV tratadas com o genótipo PI 227687.....101
- Figura 4.1** Fotomicrografias do intestino médio de larvas *A. gemmatalis* suscetíveis ao AgMNPV tratadas com os genótipos: BRS 257 (A); BR16 (B); Dowling (C), PI 229358 (D), IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica para polissacarídeos neutros (PAS).....135
- Figura 4.2** Fotomicrografias do intestino médio de larvas *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos: BRS 257 (A); BR16 (B); Dowling (C), PI 229358 (D), IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica para polissacarídeos neutros (PAS).....137
- Figura 4.3** Fotomicrografias do intestino médio de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A e G); BR16 (B); Dowling (C), PI 229358 (D), IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica proteínas totais Fast Green 0,1%.....139

Figura 4.4 Fotomicrografias do intestino médio de larvas *A. gemmatalis* suscetíveis ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A); BR16 (B); Dowling (C), PI 229358 (D), IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica de proteínas totais com azul de bromofenol mercúrio segundo Pearse (1972).....141

Figura 4.5 Fotomicrografias do intestino médio de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A), IAC 100 (B) e PI 227687 (C). Histoquímica para detecção de proteínas totais com azul de bromofenol mercúrio segundo Pearse (1972).....143

Figura 4.6 Fotomicrografias do intestino médio de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A e G), BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); IAC 100 (E e H) e PI 227687 (F e I). Histoquímica para detecção de proteínas totais com azul de bromofenol segundo Coello (1989).....145

Figura 4.7 Fotomicrografias do intestino médio de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos PI 229358 (A); IAC 100 (B) e PI 227687 (C). Histoquímica detecção de lipídeos segundo Hernández-Blazquez et al (1989).....147

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1** Genealogia dos genótipos de soja utilizados e as concentrações de flavonóides rutina e genistina em mg/g x 10⁻².....60
- Tabela 3.1** Avaliação das alterações causadas pela rutina e genistina no intestino médio de larvas suscetíveis (LS) ao nucleopoliedrovírus (AgMNPV) e as concentrações dos flavonóides em mg/g X 10⁻².....65
- Tabela 3.2** Avaliação das alterações causadas pela rutina e genistina no intestino médio de larvas resistentes (LR) ao nucleopoliedrovírus (AgMNPV) e as concentrações dos flavonóides em mg/g x 10⁻².....68
- Tabela 3.1** - Resultados da reação do PAS, para detecção de polissacarídeos neutros, no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis (LS) e resistentes (LR) ao AgMNPV.....120
- Tabela 3.2** - Resultados histoquímicos para detecção de glicogênio. Reação do PAS precedido pela amilase salivar, no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis (LS) e resistentes (LR) ao AgMNPV.....123
- Tabela 3.3** - Resultados histoquímicos para detecção de proteínas totais no intestino médio de larvas de *A.gemmatalis* suscetíveis (LS) e resistentes (LR) ao AgMNPV pelo método de Fast Green 0,1%.....125
- Tabela 3.4** - Resultados histoquímicos para detecção de proteína totais no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis (LS) ao AgMNPV - Método de azul de bromofenol mercúrio segundo Pearse (1972).....127
- Tabela 3.5** - Resultados histoquímicos para detecção de proteína totais no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* resistentes (LR) ao AgMNPV - Método de azul de bromofenol mercúrio segundo Pearse (1972).....130

Tabela 3.6 - Resultados histoquímicos para detecção de proteína totais no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis (LS) ao AgMNPV - Método de azul de bromofenol segundo Coello (1989).....131

Tabela 3.7 - Resultados histoquímicos para detecção de proteína totais no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* resistentes (LR) ao AgMNPV - Método de azul de bromofenol segundo Coello (1989).....132

CRUZ, N.A. **Estudo Morfológico e Histoquímico do Intestino Médio de Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) Suscetíveis e Resistentes ao AgMNPV Alimentadas com Genótipos de Plantas Resistentes a Insetos.** 2008/2009. 162 fls. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga da cultura da soja. Para controlar este inseto, têm sido empregadas técnicas como o controle biológico pelo nucleopoliedrovírus (AgMNPV) e a resistência de plantas com cultivares que apresentam um complexo de substâncias químicas (flavonóides), que podem torná-las tóxicas para os insetos. O intestino médio é considerado o local de entrada do vírus e de atuação das substâncias de defesa presentes nos genótipos resistentes. Os flavonóides como a rutina e genistina podem agir na formação de ácidos graxos pela hidrólise de fosfolipídios das membranas, alterando as barreiras e a permeabilidade das membranas celulares. Aparentemente a rutina e genistina provoca inibição da digestão em insetos e em larvas de *A. gemmatalis* apresenta efeito de antibiose e redução da sobrevivência. Além disso, estudos têm demonstrado que a rutina e genistina em larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao vírus AgMNPV, tem aumentado mortalidade em comparação às larvas suscetíveis. Este estudo descreve a morfologia do intestino médio das larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura além da composição química das células após tratamento com diferentes genótipos de soja contendo rutina e genistina em diferentes concentrações. O intestino médio em ambas populações larvais é composto de membrana peritrofica, camada epitelial com três tipos celulares (colunares, caliciformes e regenerativas) e camada muscular. A camada epitelial apresenta alterações morfológicas principalmente nas células colunares, com intensa vacuolização citoplasmática, presença de vazios citoplasmáticos e aumento das protusões liberadas para o lúmen. Em larvas suscetíveis essas alterações são evidentes no genótipo PI 227687 composto por R= $36,82 \times 10^{-2}$ mg/g e G= $1,22 \times 10^{-2}$ mg/g. Em larvas resistentes as alterações são evidentes nos genótipos IAC 100 composto por R= $9,72 \times 10^{-2}$ mg/g e G= $1,42 \times 10^{-2}$ mg/g e PI 227687 composto por R= $36,82 \times 10^{-2}$ mg/g e G= $1,22 \times 10^{-2}$ mg/g. Após as análises em microscopia de varredura o intestino médio é composto por três regiões distintas região anterior, média e posterior, sendo diferenciadas pela intensidade de projeções citoplasmáticas. Essas projeções aumentaram em concentração em ambas populações larvais após tratamento com genótipos Dowling composto por R= $4,29 \times 10^{-2}$ mg/g e PI 227687 composto por R= $36,82 \times 10^{-2}$ mg/g e G= $1,22 \times 10^{-2}$ mg/g. Após as técnicas histoquímicas ficou evidenciado que as células são compostas por polissacarídeos, glicogênio, proteínas e lipídeos. As maiores concentrações desses compostos foram evidenciados no intestino médio de larvas suscetíveis e resistentes após o tratamento com genótipo PI 229358, IAC 100 e PI 227687. Dessa forma os genótipos IAC 100 e PI 227687 são recomendados para plantio por apresentarem resistência às larvas e também por promover a quebra da resistência em larvas resistentes de *A. gemmatalis*.

Palavras-chave: lagarta da soja, flavonóides, rutina, genistina, plantas resistentes

CRUZ, N.A. **Morphological and Histochemical Study of the Midgut of Larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) Susceptible and Resistant to AgMNPV Fed Genotypes of Plants Resistant to Insects.** 2008/2009. 162 fls. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

The velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) is a pest of soybean. To control this insect have been employed as technical biological control by nucleopolyedrovirus (AgMNPV) and the resistance of plants with cultivars that have a complex of chemicals (flavonoids), wich can make them toxic to insects. The midgut is considered the virus entry and perfomance of defense substances present in the genotypes resistant. Flavonoids such as rutin and genistein can act in the formation of fatty acids by the hydrolysis phospholipid membranes, altering the barriers and permeability of cell membranes. Apparently rutin and genistein causes causes of inhibition in insects and larvae of *A. gemmatalis* has effect antibiosis and decreased survival. Furthermore, studies have demonstrated that rutin and genitin in larvae of *A. gemmatalis* resistant virus AgMNPV has increased mortality compared to larvae susceptible. This study describes the morphology of the midgut of larvae *A. gemmatalis* susceptible and resistant AgMNPV by light microscopy and scanning electron microscopy after treatment with different soybean genotypes with rutin and genistin in different concentrations. The midgut in both larval population is composed of peritrophic membrane, epithelial cells with three types cell (columnar, globet and regenerative) and muscle layer. The epithelial layer showed changes morphological mainly in columnar cells, with intense vacuolation presence empty and increased cytoplasmic protusions released to the lumen. Larvae are susceptible to these changes evident in the genotype PI 227687 consisting of R= 36.82×10^{-2} mg/g and G= 1.22×10^{-2} mg/g. In the resistant larvae changes are evident in IAC 100 compound by R= 9.72×10^{-2} mg/g and G= 1.42×10^{-2} mg/g and PI 227687 consisting of R= 36.82×10^{-2} mg/g and G= 1.22×10^{-2} mg/g. The analysis in scanning electron microscopy the midgut is composed of three distinct regions, anterior, medial and posterior, and differentiated by intensity of cytoplasmic projections. These projections increased in concentration in both larval populations after treatment with genotypes composed Dowling R= 4.29×10^{-2} mg/g and PI227687 consisting of R= 36.82×10^{-2} mg/g and G= 1.22×10^{-2} mg/g. After the technical histochemical became evident that the cells are composed of polysaccharides, glycogen, proteins and lipids. The highest concentrations of these compounds were evidenced in the midgut of susceptible larvae and resistant after treatment with genoptype PI 229358, IAC 100 and PI 227687. Thus the genotypes IAC 100 and PI 227687 are recommended for planting because they had resistance to the larvae and also promote the breakdown of reistance in resistant larvae of *A. gemmatalis*.

Key-words: velvetbean caterpillar, flavonoids, rutin, genistin, resistant plants

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 SOJA.....	17
2.2 LAGARTA DA SOJA.....	19
2.2.1 Descrição e Biologia	19
2.2.2 Danos.....	22
2.2.3 Manejo e Controle.....	23
2.3 CONTROLE BIOLÓGICO	25
2.3.1 <i>Baculovirus anticarsia</i> ou <i>Anticarsia gemmatalis</i> Múltiplo Poliedrovirus.....	27
2.4 RESISTÊNCIA DE PLANTAS A INSETOS	29
2.4.1 Flavonóides	33
2.5 TUBO DIGESTIVO DE <i>Anticarsia gemmatalis</i>	36
2.6 RESISTÊNCIA DA LAGARTA DA SOJA AO AgMNPV.....	40
2.7 REFERÊNCIAS.....	43
3 ARTIGO 1: EFEITOS PÓS INGESTIVOS DOS FLAVONÓIDES RUTINA E GENISTINA NO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE <i>A. gemmatalis</i> SUSCETIVEIS E RESISTENTES AO NUCLEOPOLIEDROVIRUS AgMNPV	
RESUMO	54
ABSTRACT.....	55
1 INTRODUÇÃO.....	56
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
3 RESULTADOS.....	63
3.1 Larvas Suscetíveis ao AgMNPV.....	64
3.2 Larvas Resistentes ao AgMNPV.....	67
4. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	70
5 DISCUSSÃO.....	74
6 CONCLUSÕES.....	81
7. REFERÊNCIAS.....	83

4 ARTIGO 2: EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO COM GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES A INSETOS NA SUPERFÍCIE EPITELIAL DO INTESTINO MÉDIO DE LAGARTAS DA SOJA *Anticarsia gemmatalis* SUSCETÍVEL E RESISTENTE AO VÍRUS DA POLIEDROSE NUCLEAR *AgMNPV* ESTUDO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

RESUMO	88
ABSTRACT.....	89
1.INTRODUÇÃO.....	90
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	92
3 RESULTADOS.....	93
4. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	96
5. DISCUSSÃO.....	102
6 CONCLUSÕES.....	105
7. REFERÊNCIAS.....	106

5 ARTIGO 3 ESTUDO HISTOQUÍMICO DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *Anticarsia gemmatalis* SUSCETÍVEIS E RESISTENTES AO VÍRUS *AgMNPV* ALIMENTADAS COM GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTE A INSETOS

RESUMO	110
ABSTRACT.....	111
1 INTRODUÇÃO.....	112
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	116
2.1 Detecção de Polissacarídeos Neutros.....	117
2.2 Detecção de Glicogênio.....	117
2.3 Detecção de Polissacarídeos Ácidos.....	118
2.4 Detecção de Proteínas Totais.....	118
2.4.1 Método do Fast Green 0,1% segundo protocolo de Mello e Vidal (1980).....	118
2.4.2 Método do Azul de Bromofenol Mercúrio segundo Pearse (1972).....	118
2.4.3 Método Azul de Bromofenol segundo protocolo de Coello (1989).....	118
2.5 Detecção de Lípidos.....	119
3 RESULTADOS.....	119
3.1 Polissacarídeos Neutros.....	119

3.1.1 Larvas Suscetíveis ao AgMNPV.....	121
3.1.2 Larvas Resistentes ao AgMNPV.....	121
3.2 Glicogênio.....	122
3.3 Polissacarídeos Ácidos.....	124
3.4 Proteínas Totais.....	124
3.4.1 Fast Green 0,1%.....	124
3.4.1.1 Larvas Suscetíveis ao AgMNPV.....	125
3.4.1.2 Larvas Resistentes ao AgMNPV.....	126
3.4.2 Azul de Bromofenol Mercúrio.....	126
3.4.2.1 Larvas Suscetíveis ao AgMNPV.....	128
3.4.2.2 Larvas Resistentes ao AgMNPV.....	129
3.4.3 Azul de Bromofenol.....	130
3.4.3.1 Larvas Suscetíveis ao AgMNPV.....	131
3.4.3.2 Larvas Resistentes ao AgMNPV.....	132
3.5 Lipídeos.....	133
4. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	134
5. DISCUSSÃO.....	148
6 CONCLUSÕES.....	152
7. REFERÊNCIAS.....	154
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	160

1. INTRODUÇÃO

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é uma cultura de grande importância na área econômica, gerando divisas no setor agroindustrial, tanto na comercialização de grãos como de produtos e subprodutos derivados dos grãos. A soja também é uma grande fonte de proteína na alimentação humana e animal (MISSÃO, 2006). Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de soja no mercado mundial, produzindo cerca de 57,10 milhões de toneladas de grãos na safra 2008/2009 (CONAB, 2009).

Durante o seu ciclo, a soja pode sofrer ataques de agentes que podem afetar a sua produção final, principalmente de insetos-pragas e doenças. Entre as doenças, a ferrugem da soja ou ferrugem asiática (*Phakospora pachyrhizi*) é considerada uma das mais importantes e quando não controlada pode causar grandes prejuízos a lavoura (DEGRANDE, 2006). Com relação aos insetos-pragas que atacam as folhas, a lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) considerada uma das principais e quando não controladas causa destruição total das folhas.

Buscando evitar a redução dos prejuízos causados pelas doenças e insetos, a aplicação de produtos fitossanitários é um meio bastante eficaz de controle. Entretanto o uso indiscriminado desses produtos tem gerado preocupações principalmente quanto ao desequilíbrio ecológico e a seleção de populações de pragas resistentes em campo, dessa maneira vem sendo buscado soluções mais criteriosas, sendo que o manejo integrado de pragas (MIP) vem garantindo sucesso ao seu cultivo. O MIP) consiste na união harmonica de várias técnicas de controle aplicadas em campo, que tem como principais objetivos a redução da utilização de produtos fitossanitários (principalmente os químicos), buscando o menor impacto sobre a população de inimigos naturais, a redução de contaminação do ambiente e a redução nos custos de produção (GALLO et al., 2002; DEGRANDE, 2006).

Dentre as técnicas de controle que fazem parte do MIP o controle biológico de pragas através de parasitóides, predadores e agentes entomopatogênicos e uso de plantas e/ou cultivares resistentes tem sido bastante recomendados no controle da lagarta da soja.

Geralmente, essas plantas ou cultivares resistentes apresentam em sua composição foliar substâncias químicas que as tornam tóxicas e repelentes para os insetos (LARA, 1991). Dentre os flavonóides a rutina e a genístina, tem sido estudadas e os estudos indicam que ao serem ingeridas pelos insetos, provocam inibição da digestão (HOFFMANN-CAMPO, 1995).

Em larvas de *A.gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, essas substâncias apresentaram efeitos adversos na sua fisiologia e na sua biologia, e em alguns casos, tem elevado a mortalidade de larvas resistentes ao AgMNPV (PIUBELLI, 2004).

Como o sistema digestivo é a principal via de acesso dos alimentos e dos produtos fitossanitários em geral, espera-se que a ingestão destas substâncias, promovam danos ou alterações no intestino médio das larvas de *A.gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV.

Assim este trabalho teve por objetivos:

- Verificar os efeitos dos flavonóides rutina e genistina no intestino médio de larvas de *A.gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, através de técnicas morfológicas à microscopia de luz e eletrônica de varredura.
- Identificar a natureza das substâncias químicas das células do epitélio presentes no IM destas larvas, através de métodos histoquímicos.
- Comparar os dados obtidos entre LS e LR aos já descritos na literatura, e sugerir através destes resultados, qual (is) genótipo (s) acarreta (m) maior (es) dano (s) ao inseto, ou seja, o mais resistente ao ataque da *A.gemmatalis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SOJA

A soja *Glycine max* (L.) Merrill, é uma leguminosa pertencente a família Fabaceae, amplamente cultivada em diversos países, devido a sua grande importância no mercado mundial nas últimas décadas. Os seus grãos são uma das principais fontes de proteínas utilizadas na alimentação humana e animal (EMBRAPA, 2005).

Segundo Missão (2006), desses grãos são extraídos uma diversidade de produtos e sub-produtos importantes, como o farelo de soja, utilizado como complemento alimentar na ração para gados, suínos e aves, e o óleo de soja utilizado na alimentação humana principalmente na preparação de alimentos.

Além desses produtos e sub-produtos, o uso da soja e dos seus derivados é verificado nas indústrias, na fabricação e produção de biocombustível, tintas, cosméticos, produtos farmacêuticos, entre outros.

Atualmente, a soja cultivada é muito diferente dos seus ancestrais. Barbosa e Assumpção (2001) relatam que essas plantas eram rasteiras, e sua evolução teve início com o surgimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas chineses.

Essa espécie de grande importância econômica, teve a citação no período entre 2883 a 2838 a.C., quando era considerada apenas um grão sagrado, à exemplo do arroz, trigo, cevada e milheto. Sofreu a sua domesticação por volta do século XI a.C (EMBRAPA, 2006).

De acordo com Costa e Manica (1996) essa cultura teve relatada como principal centro de origem o continente asiático, na região da antiga Manchúria na China, considerada uma das culturas mais antigas. Segundo Missão (2006), a sua expansão pelo mundo teve início por viajantes ingleses e por imigrantes chineses e japoneses, desde então.

No Brasil, a soja teve como primeiro registro histórico em 1882, na

Bahia, onde Gustavo Dutra cultivou os primeiros germoplasma dessa cultura trazidos dos Estados Unidos, na Escola de Agronomia da Bahia. Entretanto, outros registros históricos indicam que a soja “amarela” foi inicialmente cultivada na Estação Agronômica de Campinas, em 1891, para teste como planta forrageira (COSTA; MANICA, 2006).

Nos anos de 1900 e 1901 o Instituto do Estado de São Paulo promoveu a primeira distribuição de sementes para produtores paulistas, e neste mesmo período surgiram os primeiros registros da cultura no Rio Grande do Sul e em 1914 foram encontrados registros do plantio de soja para a produção de sementes e não mais como planta forrageira (COSTA; ALMEIDA, 2007).

No Estado do Paraná a soja teve seus primeiros cultivos registrados em meados de 1950, onde sua produção era irrisória até então. A partir de 1953 após a grande geada que destruiu os cafezais da região norte, noroeste, oeste e sudoeste, a cultura foi implantada para produção comercial, e desde então o estado se tornou o segundo maior produtor do Brasil (EMBRAPA, 2006).

Atualmente, a soja tem grande importância econômica no cenário mundial, onde a sua produção alcança números aproximadamente na ordem de 220 milhões de toneladas, e uma área plantada de 96,3 milhões de hectares distribuídos em todo o planeta. O complexo agroindustrial da soja movimenta cerca de US\$ 215 bilhões/ano, destacando como os maiores produtores mundiais seguindo a ordem Estados Unidos com produção estimada em 88 milhões de toneladas, Brasil com 62 milhões de toneladas, Argentina com 52 milhões de toneladas e China com 16 milhões de toneladas (CONAB, 2009).

A América do Sul conta com uma área cultivada de aproximadamente 41,5 milhões de hectares e uma produção estimada de 95,3 milhões de toneladas, na qual, o Brasil participa com uma área cultivada de 21,70 milhões de hectares, e uma produção estimada para a safra 2008/2009 de 57,1 milhões de toneladas. Destacam-se como maiores produtores nacionais, os estados do Mato Grosso, com uma área cultivada de 5,8 milhões de hectares e produção de 17,963 milhões de toneladas e o Paraná com área cultivada de 4,1 milhões de hectares e uma produção de 9,510 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2006; CONAB, 2009).

A soja tem o seu total desenvolvimento entre 100 a 160 dias desde a emergência até a maturação, sendo dividido em duas fases: uma vegetativa e outra

reprodutiva. Durante essas fases até o desenvolvimento total da cultura, ela pode sofrer diversas injúrias que podem prejudicar a sua produção, onde vale ressaltar principalmente os problemas com insetos-praga e doenças (VERNETTI, 1983; GALLO et al.,2002).

As doenças de interesse econômico que afetam a soja estão as que atacam as partes aéreas principalmente o oídio, míldio e um maior destaque para a ferrugem asiática, onde essa doença pode causar perda total da lavoura, se não controlada adequadamente (DEGRANDE, 2006).

No complexo de insetos-praga que atacam a soja, podemos citar os que atacam as folhas como a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*), falsa-medideira (*Pseudoplusia includens*), lagarta enroladeira (*Omiodes indicatus*), vaquinha (*Diabrotica speciosa*), mosca Branca (*Bemisia argentifoli*). Além destas pragas temos as que atacam as vagens como o percevejo marrom (*Euschistus heros*), percevejo barriga verde (*Dichelops melacantus*), percevejo verde-pequeno (*Piezodorus guildinii*), percevejo verde (*Nezara viridula*), percevejo edessa (*Edessa meditabunda*), percevejo acrosterno (*Chinavia* spp.) e percevejo pardo (*Thyanta perditor*), entre outras (GALLO et al., 2002; SOSA-GÓMEZ et al., 2006).

2.2 A LAGARTA DA SOJA

2.2.1 Descrição e Biologia

Anticarsia gemmatalis (Hübner: 1818) é uma praga pertencente a Ordem Lepidoptera e Família Noctuidae, de ciclo completo ou holometabolo passando por diferentes estágios até o seu completo desenvolvimento, que dura geralmente 47 dias (ovo: 3 dias; larva: 15 dias; pupa: 9 dias e adulto 20 dias). É um inseto de ocorrência natural das áreas tropicais e subtropicais, distribuído nas Américas desde o Canadá, Estados Unidos, Brasil e Argentina (FORD et al.,1975; GALLO et al., 2002). No Brasil esta praga tem sua ocorrência e causa danos severos, desde o Sul de Goiás até o Rio Grande do Sul (PANIZZI et al., 1977; GAZZONI et al., 1988; PANIZZI, 1990).

Os seus ataques podem ocorrer em épocas diferentes de acordo com cada região do país. Na região norte do Paraná esse ataque inicia-se em novembro, enquanto que nos demais estados da região sul o ataque tem seu início em dezembro (HOFFMANN-CAMPO, 2000).

Esse inseto mesmo sendo considerado uma praga-chave da cultura da soja, também promove danos em outras culturas, como no algodoeiro (DOUGLAS, 1930; HINDS; OSTERBERGER, 1931), alfafa (ELLISOR; GRAHAN, 1937), pastagens (WILLE, 1943), arroz (TARRAGÓ et al., 1977) e trigo (MOSCARDI, 1979).

Os ovos de *A. gemmatalis*, são encontrados depositados individualmente na face inferior das folhas, e as vezes nos caules e ramos, apresentando um formato oval ou esférico, com superfície inferior achatada e tamanho variando entre 0,5 até 2 mm de diâmetro. A coloração inicialmente é verde claro, escurecendo gradualmente até próximo a eclosão quando apresentam a coloração rosada (WATSON, 1916) até atingir a coloração marrom-avermelhada perto da eclosão (ELLISOR, 1942).

As lagartas recém eclodidas apresentam o hábito mastigador onde primeiramente se alimentam da casca dos ovos e posteriormente de folhas jovens. As larvas pequenas (até 10 mm de comprimento) geralmente apresentam coloração verde e possui quatro pares de falsas pernas, sendo dois pares vestigiais e um terminal. Com isso elas se locomovem medindo palmo e muitas vezes são confundidas com lagarta falsa medideira *P. includens* (GALLO et al., 2002; SOSA-GÓMEZ et al., 2006; DEGRANDE; VIVAN, 2009).

Quando são mais desenvolvidas (maiores que 15 mm de comprimento) perdem a característica mede-palmo, ficam mais ativas e a sua coloração pode variar entre verde, pardo-avermelhada ou preta, (sendo essa última característica, evidenciada apenas sob condições de altas populações), além de apresentarem cinco linhas longitudinais brancas no dorso (HOFFMAN-CAMPO et al, 2000; SOSA-GÓMEZ et al., 2006; DEGRANDE; VIVAN, 2009).

De modo geral, a *A. gemmatalis*, passa por cinco estágios larvais, com duração aproximada de 15 dias, podendo atingir até 40 mm de comprimento (SOSA-GÓMEZ, 2006). Reid (1975) relatou que em populações de larvas de *A. gemmatalis* submetidas a temperaturas acima de 18,3°C tiveram 5 a 6 ínstaes, enquanto que em temperaturas inferiores a 18,3°C esses ínstaes foram de 6 a 7.

Em estudos semelhantes Silva (1981), observou que em temperaturas variando entre 20° e 35°C o período larval teve duração respectivamente entre 34 e 13 dias.

Quando aproximam-se do estágio de pré-pupa, as larvas apresentam tamanho de cerca de 25 mm de comprimento e coloração marrom com poucas linhas longitudinais. Este estágio tem duração de um dia aproximadamente (WATSON, 1916; GUYTON, 1940). A pupa recém formada apresenta coloração verde-clara, tornando-se posteriormente marrom escura e brilhante. Geralmente as larvas empupam no solo, numa profundidade de até 2 cm (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

O estágio de pupa pode durar entre 7 a 10 dias dependendo das condições climáticas (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006; DEGRANDE; VIVAN, 2009). Silva (1981) e Magrini (1996) estudando a variação de temperatura notaram que quanto maior a temperatura, menor a duração da fase de pupa. Já para Silva e Parra (1986) estudando a relação entre o fotoperíodo e o estágio pupa concluíram que quanto maior o fotoperíodo, maior a fase de pupa .

O adulto da *A. gemmatalis* é uma mariposa de coloração variando entre cinza, marrom-escuro, bege, amarelo ou azul-claro com cerca de 30 a 40 mm de envergadura. Em repouso as asas anteriores cobrem o corpo, notando-se uma linha transversal sempre presente unindo as pontas do primeiro par de asas (WATSON, 1915; HOFFMANN-CAMPO et al, 2000; GALLO et al., 2002; SOSA-GÓMEZ, 2006; DEGRANDE; VIVAN, 2009).

Para diferenciação entre machos e fêmeas no estágio adulto, Greene (1974) descreveu algumas características para auxiliar na identificação, no qual os machos apresentam escamas alongadas, localizadas no fêmur das pernas protorácicas e na tíbia das pernas metatorácicas, enquanto que as fêmeas apresentam essas escamas curtas e escassas.

Durante o dia, as mariposas são encontradas em locais sombreados na base das plantas, enquanto que o processo reprodutivo ocorre durante no período noturno (GALLO et al., 2002). Greene et al., (1973) observaram que o pico de acasalamento entre machos e fêmeas ocorrem cerca de 2 horas após o por do sol, diminuindo gradativamente dentro das 12 horas seguintes. A postura dos ovos são realizados no período noturno com aproximadamente 3 dias após a cópula (LEPPLA, 1976).

Cada fêmea pode ovipositar em média cerca de 1000 ovos

(DEGRANDE; VIVIAN, 2008), no entanto essa média pode variar de acordo com fatores ecológicos como temperatura, tipo de alimentação (natural ou artificial) e estágio fenológico da planta. SILVA (1981) observou que a temperatura de 25°C é a ideal para a oviposição, onde a média foi de 346,53 ovos/fêmeas, enquanto que em temperaturas variando entre 30° e 35°C, a média ficou entre 26,6 e 35,1 ovos/fêmeas. O mesmo autor estudando a influência da dieta ou alimentação observou em insetos alimentados com dieta artificial que as médias eram de 82,6 a 123,7 ovos/fêmeas, enquanto que em dieta natural com folhas de soja, a média era de 345,56 ovos/fêmeas.

2.2.2 Danos

As larvas de *A. gemmatalis* até chegarem a sua forma adulta, passam por cinco instares larvais. Nos dois primeiros instares conhecidos como mede palmo, as larvas inicialmente raspam o parênquima foliar ocasionando pequenas manchas claras nas folhas (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; GALLO et al., 2002).

A partir do terceiro instar as larvas consomem o limbo foliar, deixando pequenos buracos nas folhas, provocando dessa maneira a redução da área foliar e da taxa fotossintética (DEGRANDE; VIVAN; 2009).

Esse consumo foliar nos três primeiros instares é considerado pequeno, entretanto a partir do quarto até o quinto instar essas larvas ficam mais vorazes e consomem completamente as folhas, podendo danificar até as hastes mais finas, onde uma larva pode consumir de 100 a 150 cm² de área foliar, no qual 95% desse consumo ocorre exatamente do quarto ao sexto instar larval. Dessa forma em altas populações e se não controladas, essas lagartas podem provocar desfolhas elevadas, causando perdas de produtividade, com danos que podem chegar a 100% (HOFFMAN-CAMPO et al., 2000; GALLO et al., 2002; SOSA-GÓMEZ et al., 2006).

Em função da época do ataque, do nível da infestação e das condições ambientais, essa redução foliar pode ocasionar perdas na produção (DEGRANDE; VIVAN, 2008).

Os maiores danos podem ocorrer principalmente nos períodos de escassez de chuva (estiagem), onde as lagartas alimentam-se tanto de folhas novas como adultas, dessa maneira caracterizando o chamado ataque tardio que é considerado o mais danoso, por ocorrer depois da floração, onde esse período é essencial e determinante para o enchimento das vagens (GAZZONI; YORINIORI, 1995).

Lourenção et al. (2000) em ensaios realizados com soja precoce e semi-precoce, em condições de campo no estágio R5 (enchimento de grãos), avaliaram a porcentagem de área foliar cortada (PAFC) por *A. gemmatilis*, e observaram que houve uma redução de área foliar nos genótipos precoce IAC '5 e IAC 90-3395 reduzindo em 27,5 e 28,3%, e nos genótipos semi-precoce IAC 15, IAC 18 e IAC 93-2277 houve redução de 31,7 e 28,3%, onde esses valores podem levar a uma menor produtividade.

2.2.3 Manejo e Controle

A cultura da soja está sujeita em todo o seu ciclo ao ataque de diferentes espécies de pragas. Mesmo a presença de inimigos naturais como predadores, parasitas e parasitóides, que reduzem em parte a população dessas pragas, não basta para que o controle seja total e para evitar danos nessa cultura. Dessa forma, a utilização de produtos fitossanitários na cultura da soja, acaba sendo a forma mais utilizada, de forma inadequada muitas vezes, para o controle dessas pragas (PRAÇA; SILVA NETO; MONNERAT, 2006).

No caso de pragas não é recomendado uma aplicação preventiva de produtos fitossanitários, pois, além de interferirem de forma negativa na população de inimigos naturais, causando o desequilíbrio populacional desses insetos, podem ainda elevar o custos de produção, o que acaba sendo desfavorável para o produtor agrícola.

Atualmente o combate de pragas em geral tende a reduzir gradualmente a utilização dos agrotóxicos em decorrência de seus efeitos colaterais, sendo substituídos e/ou associados aos métodos alternativos de controle que consideram os aspectos econômicos e ecológicos, para a solução a médio e longo

prazo. A estratégia é uma proposta de convivência com as pragas, dando oportunidade ao controle biológico e recomendando o controle químico quando a população da praga atinge níveis que causam prejuízos maiores do que os custos de controle. Esta proposta está alicerçada em conhecimentos ecológicos, econômicos e sociais, visando interferir o mínimo possível no agroecossistema e é conhecida como Manejo Integrado de Pragas (MIP), e pode ser caracterizado pela consonância dos métodos de controle com princípios ecológicos, econômicos e sociais, visando interferir o mínimo possível no agroecossistema.

O controle de pragas deve ser baseado nos princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP) que consiste no uso de técnicas, que são empregadas harmonicamente visando solucionar um problema específico, ou seja, seu principal objetivo é a redução de perdas causadas por pragas, de modo efetivo, economicamente viável e ecologicamente compatível com o meio ambiente (HOFFMANN CAMPO et al., 2006; DEGRANDE; VIVAN, 2009).

O MIP na cultura da soja, visa a integração das formas de controle tradicionais às formas alternativas, ao invés de se basear apenas no controle pelo uso exclusivo de produtos fitossantiários (KOGAN ; HERZOG, 1980)

Segundo Costa e Almeida (2007) são gastos em média 24% dos custos de produção em compra e aplicação de inseticidas e acaricidas, desta maneira, o MIP visa a redução do número de aplicações como também redução dos custos finais, através da associação de técnicas simples como: o uso de plantas resistentes, o preparo do solo, rotação/successão de culturas, medidas sanitárias (vazio sanitário), controle biológico e a utilização de produtos fitossanitários seletivos a inimigos naturais (DEGRANDE; VIVAN, 2006).

Kogan e Herzog (1980) relataram que uma das principais ferramentas que auxiliam para o sucesso do MIP é o monitoramento das diferentes populações de insetos-praga nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta, pois é através dele, que podemos determinar o momento que deve-se iniciar a aplicação dos métodos de controle.

Esse monitoramento deve ser realizado através de amostragens semanais feitas de acordo com cada espécie de inseto praga. No caso de percevejos e da lagarta da soja é recomendado o método do pano de batida, de cor branca, preso em duas varas, com 1m de comprimento, e que deve ser usado em duas fileiras de soja para as lagartas ou uma fileira de soja para percevejos. Esse

procedimento deve ser repetido em vários pontos da lavoura considerando-se, como resultado, a média de todos os pontos amostrados (PRAÇA; SILVA NETO; MONNERAT, 2006, DEGRANDE; VIVAN, 2006).

No caso do ataque de lagartas desfolhadoras, como a *A.gemmatalis*, segundo Praça;Silva Neto e Monnerat, (2006), a recomendação para início de controle no estágio vegetativo é de 30% de desfolha ou 40 lagartas grandes (maiores que 1,5 cm) em 2 metros ou 2 fileiras de soja batidas sobre o pano, e no estágio reprodutivo essa recomendação é de 15% de desfolha ou 40 lagartas grandes/ em 2 metros ou 2 fileiras de soja batida sobre o pano

Dessa forma, a associação de todos esses mecanismos dentro do MIP, pode levar a um controle eficaz dos insetos-pragas e assim fornecer informações da melhor alternativa de controle para o agricultor que poderá ser tomada para o problema em questão (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006).

2.3 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico na cultura da soja, consiste na regulação das populações de insetos existentes nesse ecossistema, cujo principal objetivo é mante-los dentro do limite máximo e mínimo, sem causar alterações, ou seja, no limite do nível de dano econômico (STERN et al., 1965), o qual é definido como a menor população de praga que causa prejuízo, enquanto que uma população de insetos relativamente menor é definida como limiar de dano econômico, os quais são regulados pelos seus inimigos naturais como predadores, insetos parasitas, parasitóides, e agentes entomopatogênicos (GULLAN; CRANSTON, 2007).

Na cultura da soja, a população de inimigos naturais responsáveis pela manutenção de espécies de insetos-pragas, temos os que pertencem as ordens Hemiptera e Coleoptera (maioria dos predadores), Diptera e Hymenoptera (parasitóides) e os agentes entomopatogênicos vírus, fungos e bactérias (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

No grupo de inimigos naturais responsáveis pelo controle da *A.gemmatalis*, temos os parasitas *Tricogramma* spp. que age principalmente em ovos, *Microcharops* um parasitóide de larvas pequenas e *Patelloa similis* um

parasitóide responsável pelo controle das larvas grandes (DEGRANDE; VIVAN, 2009).

Os predadores *Calosoma granulatum* (Coleoptero) e *Podisus* sp. (Hemiptero); os agentes entomopatogênicos *Baculovirus anticarsia* (vírus), *Nomuraea rileyi* (fungo), e *Bacillus thuringiensis* (bactéria) são responsáveis principalmente no controle das lagartas (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; GALLO et al., 2002;).

Dentre os agentes entomopatogênicos o *Bacillus thuringiensis*. (*Bt*) é um dos principais em relação a pesquisa e produção sendo responsável por 90% dos produtos biológicos comercializados mundialmente, e utilizados há mais de três décadas como agente de controle de pragas (VALADARES-INGLIS et al., 1998)

O *Bt* é uma bactéria aeróbica facultativa e gram positiva que produz cristais tóxicos para larvas de lepidopteros, dipteros e coleopteros. A efetividade desse agente levou a industria de biotecnologia a introduzir os genes produtores em plantas de soja gerando as chamadas plantas *Bt*, que visam o controle principalmente de lagartas (DEAN, 1984).

De forma geral os cristais produzidos ao serem ingeridos pelas larvas sofrem ação do pH intestinal e de proteases, que solubilizam os cristais e ativam essa toxinas, que se ligam aos receptores localizados no tecido epitelial do intestino médio da larva, ocasionando a quebra do equilibrio osmótico da célula (PRAÇA, 2004).

As células epiteliais intumescem e se rompem, propiciando o extravasamento do conteúdo intestinal para hemocele do inseto, e como consequência a larva pára de se alimentar, entra em paralisia geral e morre por inanição ou septicemia (MONERRAT; BRAVO, 2000).

Além da pesquisa e tecnologia desenvolvida com o *B. thuringiensis*, outros inimigos naturais são reproduzidos e fornecidos aos produtores, para auxiliar no controle da lagarta da soja, como o *Trichogramma* spp. e o *Baculovirus anticarsia* (EMBRAPA, 2005).

2.3.1 *Baculovirus anticarsia* ou *Anticarsa gemmatalis* Múltiplo Nucleopoliedrovirus (AgMNPV)

Atualmente, um vírus amplamente utilizado como bioinseticida no Brasil é o *Anticarsia gemmatalis nucleopoliedrovirus* (AgMNPV), pertencente ao gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV), família *Baculoviridae*, específico da lagarta-da-soja. A patologia desse baculovirus atinge principalmente os estágios larvais do inseto e sua principal rota de infecção é pela ingestão de poliedros, que atravessam o epitélio intestinal e se multiplicam nas células progredindo por todo o corpo do inseto resultando numa infecção sistêmica. Também em sistemas *in vitro*, células de *A. gemmatalis* e de *Trichoplusia ni*, esse vírus replica gerando uma infecção altamente virulenta (CASTRO et al., 2001).

O AgMNPV é um vírus presente naturalmente no ambiente que compreende o maior grupo de vírus de artrópodos podendo infectar cerca de 700 espécies de artrópodes (TANADA; KAYA, 1993). A maioria foi isolada da Ordem *Lepidoptera*, entretanto, pode ser detectado em outras ordens como: *Hymenoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Orthoptera*, *Neuroptera*, *Trichoptera* (BILIMORIA, 1991; O'REILLY et al., 1992). Apresenta potencial como agente de controle biológico desses insetos-praga tanto na agricultura como em áreas florestais (MARTIGNONI, 1984; MOSCARDI; SOSÁ-GOMEZ, 1992).

O *Baculovirus* é composto por um DNA circular de fita dupla e envolto por um capsídeo proteico, que constitui a unidade infectiva desse vírus (CASTRO et al., 1999). A família *Baculoviridae*, compreende 2 gêneros: *Nucleopoliedrovirus* (vírus de poliedrose nuclear – VPN), responsável pela transmissão de célula para célula em um mesmo indivíduo ou infecção sistêmica e de inseto para inseto, e os *Granulovirus* (vírus de granulose – VG) responsáveis pela transmissão de inseto para inseto (GRANADOS; FEDERICI, 1986).

Esses 2 gêneros apresentam como principal característica corpos proteicos de oclusão (CPI), que envolvem as partículas virais, denominadas de poliedros para o vírus de poliedrose nuclear e grânulos para os vírus de granulose. Estes cristais proteicos permitem a formulação de bioinseticidas de fácil aplicação, representando economia e segurança em relação aos produtos químicos tradicionais (MOSCARDI; SOUZA, 2002).

O *B. anticarsia* foi diagnosticado pela primeira vez em 1962, no Peru, na cultura da alfafa, onde desde essa época vem sendo alvo de estudos. No Brasil, seu primeiro relato foi descrito em 1972 em lavouras de soja, em Campinas, no Estado de São Paulo e posteriormente em outras regiões (SOSA-GÓMEZ, 1995).

A partir de 1979 a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), desenvolveu o programa de pesquisa para o uso do AgMNPV, isolando de lagartas mortas de *A. gemmatalis* na região norte do Paraná, mas foi durante as safras de 1980/81 e 1981/82, que esse produtos foram testado em várias propriedades do Paraná e Rio Grande do Sul. mostrando dessa maneira ser eficiente para redução de pragas (CASTRO et al., 1999)

Dessa forma nas safras seguintes, o aumento no uso do vírus foi crescente chegando em 1,4 milhões de hectares de soja controladas com o vírus, onde 40% dessa área tratada ficava no estado do Paraná (MOSCARDI; SOUZA, 2002). Entretanto, alguns fatores adversos limitaram a expansão do uso do vírus e contribuíram para que houvesse um desinteresse por parte de empresas particulares em produzir e comercializar esse bioinseticida. A alta especificidade do *Baculovirus* (geralmente uma espécie de praga e uma determinada cultura), alta sensibilidade dos poliedros virais à radiação solar que desativa o vírus aplicado em 2 a 5 dias, o que necessitaria da adição de protetores solares às formulações onerando o custo na fabricação e a não aceitação por parte dos produtores agrícolas devido a ação relativamente lenta desse agente na mortalidade e redução dos danos na lavoura (MOSCARDI; SOUZA, 2002; DEGRANDE; VIVAN; 2009).

Essa ação relativamente lenta pode ser atribuída diretamente ao fato do ciclo de infecção do vírus no inseto, que inicia-se quando as larvas se alimentam de planta hospedeira contaminadas com (CPIs) e propiciam a penetração desses corpos no sistema digestivo do inseto. Os CPIs quando atingem o lúmen do intestino médio são submetidos ao pH alcalino, que dissolve a poliedrina, liberando os vírions (nucleocapsideo + envelope) para o lúmen intestinal (GRANADOS; LAWLER, 1981;CASTRO et al., 1999). Dessa maneira o epitélio do intestino médio é apontado como o primeiro tecido a ser infectado por vírus durante o processo de infecção (KAWANISHI et al., 1972).

Os vírions atravessam a membrana peritrófica, considerada a primeira barreira de proteção contra ação de patógenos, se fundem às membranas das células epiteliais do intestino médio, replicando nas células colunares e

transmitindo a infecção para outros tecidos (FLIPSEN et al., 1995; VOLKMAN, 1997; CASTRO et al., 1999; MOSCARDI; SOUZA, 2002).

Geralmente em um período de quatro dias após a ingestão e infecção pelos poliedros, as larvas cessam a sua alimentação e reduzem a movimentação e em torno de sete ou dez dias elas morrem e apresentam corpo com coloração amarelado esbranquiçado. Com o passar dos dias, elas escurecem e se rompem liberando o vírus no ambiente que servirá de inóculo para novas gerações (GAZZONI et al., 1981; GAZZONI; YORINIORI, 1995; CASTRO et al., 1999).

Alguns estudos com larvas de lepidopteros infectados com o nucleopoliedrovirus indicaram que o processo infectivo tem início algumas horas após a ingestão desses poliedros pelas larvas, e acarretaram uma série dessas mudanças comportamentais e morfológicas nestas larvas que logo culminam na morte . No período entre 48 e 78 horas tem início alterações onde ocorre uma redução na alimentação e posterior retardamento do crescimento do inseto, que muitas vezes não realiza a mudança de ínstar, em 80 a 100 horas ocorre a descoloração do tegumento do inseto, após alguns dias após a morte ocorre o rompimento e liberação do vírus no ambiente (GRANADOS; WILLIANS, 1986; VOLKMAN; KEDDIE, 1990).

2.4 RESISTÊNCIA DE PLANTAS A INSETOS

A resistência de plantas a pragas é mais uma ferramenta que auxilia no controle efetivo dos insetos-praga e apresenta como característica principal, a compatibilidade com os demais métodos de controle aplicáveis (químico, biológico e cultural), resultando dessa forma em efeitos sinérgicos favoráveis (KOGAN, 1986).

A resistência de plantas além do efeito sinérgico apresenta outras vantagens em relação a sua utilização em campo, como: baixo custo pois esse carácter de resistência não agrega valores financeiro à sementes; baixo impacto ambiental, não causando efeitos adversos, sendo considerada uma tecnologia branda em relação ao meio ambiente; facilidade na utilização, no qual não é necessário conhecimento adicional sobre a praga ou planta; persistência onde atua permanentemente contra baixas populações de pragas e redução da infestação em

cultivares suscetíveis (GALLO et al., 2002).

Dessa forma esse termo resistência de plantas está atribuído de forma direta a qualidades genéticas herdadas que resultam em uma planta que será menos danificada do que outra (suscetível), onde ambas estão sujeitas as mesmas condições ambientais, mas que não possuem as mesmas características de resistência (PAINTER, 1951; GULLAN; CRANSTON, 2007).

As características, por sua vez, podem sofrer influência por parte da planta (idade, condição fisiológica, parte atacada), dos insetos (espécie, biótopo, fase de desenvolvimento), ambiente (temperatura, umidade, nutrientes etc), determinando a manifestação de forma positiva ou negativa da resistência (LARA, 1991).

Segundo Gullan e Cranston, (2007), geralmente esses mecanismos de resistência são obtidos através de cruzamentos seletivos para as características desejáveis. Painter (1951) propôs uma divisão empírica, no qual os mecanismos são divididos em três categorias ou níveis: não preferência, antibiose e tolerância.

A não-preferência é quando o cultivar é menos utilizado pela praga tanto na alimentação, oviposição ou abrigo em comparação com outros cultivares sob as mesmas condições. Entretanto Kogan e Ortman (1978), atribuíram o termo antixenose que consiste em parte ao mecanismo de não-preferência citado por Painter, mas considerando como fatores adicionais ou complementares a influência dos metabólitos secundários das plantas e as defesas morfológicas, os quais em conjunto provocam uma resposta negativa no inseto durante o processo de seleção do hospedeiro.

A não-preferência ou antixenose, apresentam fatores repelentes e restritivos químicos vegetais, pubescência (cobertura de tricomas simples ou glandulares), ceras superficiais e espessura ou dureza das folhas, onde a combinação de todos esses fatores impedem a colonização dos insetos (GULLAN; CRANSTON, 2007).

Entretanto a combinação dos fatores que conferem a resistência da planta nem sempre são favoráveis para diferentes tipos de insetos-pragas, onde em bioensaios realizados por Rossetto et al (1981), no qual os autores estudaram a preferência de alimentação de adultos de *Diabrotica speciosa* oferecendo diferentes cultivares de soja que apresentavam características de resistência e suscetibilidade a insetos pragas, observaram que os genótipos PI 227687, PI 229358 e PI 171451

foram menos danificados por adultos de *D. speciosa* caracterizando não-preferência.

Em estudos posteriores realizados por Valle e Lourenção (2002) analisando a preferência a oviposição de *Bemisia tabaci* Biótipo B, com os mesmos genótipos, observaram que os genótipos PI 227687 e PI 171451 foram os mais preferidos para oviposição de *B. tabaci*, enquanto o genótipo PI 229358 teve a menor preferência. Tal resultado pode ser atribuído ao fato que o genótipo PI 227687, possui uma característica morfológica favorável para a *B. tabaci*: a densidade de tricomas presentes nas folhas, que criam um micro-clima nas folhas favorecendo as ninfas até o seu total desenvolvimento.

O segundo nível de resistência esta ligada a antibiose, no qual o inseto se alimenta normalmente do cultivar, mas este exerce um efeito adverso sobre a sua biologia, causando mortalidade na fase imatura (frequentemente no primeiro ínstar), prolongamento do período de desenvolvimento, redução de tamanho e peso, redução de fecundidade, fertilidade e período de oviposição (GALLO et al., 2002).

Esse tipo de resistência é causada por fatores como: presença de substâncias químicas, antimetabólitos, enzimas, toxinas, inibidores de crescimento, níveis reduzidos de nutrientes, exsudatos viscosos de tricomas (pelos) glandulares e altas concentrações de componentes vegetais indigeríveis, como a sílica (LARA, 1991; GALLO et al., 2002).

Fugi et al (2005) observaram que o genótipo PI 229358 provocou alta mortalidade de larvas de *A. gemmatilis*, prolongamento do estágio larval, menor pesos de pupas, devido a menor alimentação durante o período larval, oviposição e viabilidade reduzida e um maior período de incubação de ovos.

A tolerância é o terceiro nível de resistência, onde está envolvida apenas características da planta e não da interação inseto-planta, no qual o cultivar é pouco danificado em comparação aos demais, sem alterar o comportamento e a biologia do inseto, sendo que estes cultivares apresentam a capacidade de tolerar o ataque da praga. Dessa forma a planta apresenta a capacidade de tolerar o ataque e superar em crescimento ou se recuperar do desfolhamento ou outro dano provocado pela alimentação do inseto, levando a uma redução na quantidade/qualidade da sua produção (PAINTER, 1951; GULLAN; CRANSTON, 2007).

Geralmente as características de resistências apresentados nos três

níveis estão relacionadas com causas físicas, químicas e morfológicas, no qual, as causas químicas são as mais importante, pois desempenham funções na escolha do hospedeiro, como também na quantidade de alimento que esses insetos irão ingerir (SRIVASTAVA et al., 1999).

Essas substâncias responsáveis pelas interações químicas dos organismos são denominadas de aleloquímicos que são definidos como metabólitos secundários que afetam a sobrevivência, crescimento, comportamento, fecundidade ou fertilidade, que estão presentes nas plantas na forma de alcalóides, flavonóides, terpenóides, esteróides (KUBO; HANKE, 1986). São classificados em dois tipos: os alomônios que favorece o emissor (planta hospedeira funcionando como substância de defesa) e os cairomônios que favorece o receptor (no caso inseto fitófago) (GALLO et al., 2002).

De acordo com Hoffmann-Campo (1995) na soja os compostos fenólicos presentes nas plantas em forma de flavonóides, são geralmente encontrados em maior abundância em genótipos resistentes à pragas, onde muitas vezes dependendo de sua concentração podem ser atraentes, deterrentes, repelentes ou tóxicos às pragas (PIUBELII, 2004).

Esses flavonóides por sua vez constituem um grupo de substâncias que apresentam atividades biológicas variadas. Nos Estados Unidos foram descobertas três introduções de soja (PI 229358, PI 171451 e PI 227687) que ofereciam resistência a múltipla espécies de pragas da soja, mas sem relacionar a causa dessa resistência (CLARK et al., 1972; HATCHETT et al., 1977). Em estudos posteriores, foi identificado em folhas de soja selvagem PI 227687 o composto fenólico ou flavonóide rutina, reconhecido por promover a defesa de plantas a lepidópteros (HOFFMANN-CAMPO, 1995).

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos por CLARK et al., (1972) com plantas de carácter resistente, foram realizados estudos avaliando a resistência das plantas F2 descendentes do cruzamento entre variedades comerciais e PI 229358, PI 171451 e PI 227687. Os autores evidenciaram que as progênies eram menos danificadas por lagartas e coleopteros e concluíram que essas plantas transferem o carácter de resistência para as suas progênies (REZENDE et al., 1980).

2.4.1 Flavonóides

Os mecanismos de defesas das plantas englobam uma série de características físicas, morfológicas e um complexo de substâncias químicas (compostos fenólicos) que podem torná-las inadequadas para o consumo dos insetos-pragas (PIUBELLI, 2004).

Na soja esses compostos fenólicos ou flavonóides são metabólitos secundários encontrados em vários materiais vegetais (HARBORNE, 1991).

Estudos com relação aos efeitos farmacológicos dessas substâncias em humanos vem sendo realizados, nos quais foram evidenciados a ação estrogenea no sistema nervoso central, aumento de cálcio ósseo, estímulo da mineralização e tratamentos de tumores entre outros (SHILS et al., 2003); Também são relatados os efeitos estéticos, como nos tratamentos da flacidez (BARNES et al., 2000). Entretanto, poucos estudos foram realizados quanto a sua participação no controle de insetos praga. Estes compostos presentes em plantas tem diferentes efeitos sobre os herbívoros, sendo que a sua ativação ocorre por oxidação, levando em consequencia, a precipitação de proteínas. Dessa maneira, essa ativação pode levar a uma inibição de digestão devido a formação de pontes de hidrogênio, ou pela formação de ligações covalente, com proteínas e enzimas digestivas (APPEL, 1993).

Appel (1993) relatou que os radicais de hidroxila formados durante a oxidação dos compostos fenólicos possuem ação tóxica e são responsáveis pela ruptura da integridade da membrana e por distúrbios de metabolismo no epitélio intestinal. Em larvas de Lepidoptera a ligação covalente do ácido clorogênico com proteínas monoméricas inibi a absorção de aminoácidos (FELTON et al., 1989; FELTON; DUFFEY, 1991).

O modo de ação dos flavonóides está relacionada à formação de ácidos graxos pela ação de fosfolipase A2, responsável pela hidrólise de fosfolípideos presentes nas membranas celulares, com a liberação do ácido araquidônico (KUBO; HANKE, 1986; LARA, 1991; SILVA et al., 2002; OMYLAGHA; GROTEWORLD, 2004; LOPES et al., 2005).

Dessa forma os flavonóides podem interagir e penetrar nas bicamadas lípidicas das membranas, alterando as barreiras e a permeabilidade das membranas celulares (LIMA et al., 1999; SILVA et al., 2001). Outras funções seriam

relacionadas à atuação na expressão de receptores de membrana, como agentes antibacterianos, antivirais e inibidores de enzimas proteolíticas (TOLEDO et al., 2003).

Para melhor entendimento dos efeitos dos flavonóides Hoffmann-Campo et al (1994), realizaram testes de preferência alimentar em larvas de *A. gemmatalis* com vários genótipos de soja BR 82-12547, IAC 74-2832, PI 227687, PI 229358 e PI 274454, e observaram que estes genótipos foram os mais rejeitados pelas larvas de *A. gemmatalis*. Estudos e resultados semelhantes foram realizados e obtidos por Rossetto et al (1981), em *D. speciosa*, no qual os genótipos PI 227687, PI 171451 e PI 229358 também foram rejeitados pelo inseto.

Estudos posteriores utilizando esses genótipos, identificaram a presença de sete flavonóides na PI 227687, uma das mais utilizadas no programa de resistência de plantas a insetos, indicando maior toxicidade desta cultivar ao inseto. Dentre todos os flavonóides identificados a rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo) e o isoflavonóide genistina (genisteína 7-O-β-D-glicosídeo) são reconhecidas por desempenhar efeitos adversos em larvas de lepidopteros. Esses compostos também foram identificados em extratos de folhas de PI 274454 e outros genótipos resistentes (HOFFMANN-CAMPO, 1995, HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; PIUBELLI et al., 2005).

A rutina é um composto não volátil que exerce efeito negativo no comportamento e na fisiologia de algumas espécies. Alguns resultados indicam a quebra da resistência da lagarta da soja ao baculovírus. Segundo Piubelli et al., (2005) esse flavonóide ocasiona uma inibição da digestão em insetos herbívoros, devido à ruptura da membrana celular e por distúrbios de metabolismo no epitélio intestinal.

Já para Stamp e Skrobola (1993) essa substância mostrou efeito antibiótico e/ou não consumível em larvas de lepidoptera como *Manduca sexta*, *Heliothis virescens* (F.) (HOFFMANN-CAMPO, 1995) e *Trichoplusia ni* (Hübner) (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001). Em *A. gemmatalis*, a rutina apresentou efeitos característicos de antibiose, alongando o ciclo larval e reduzindo a sobrevivência (GAZZONI et al., 1997).

Os isoflavonóides por sua vez, são compostos químicos fenólicos amplamente distribuídos em plantas, no qual podemos encontrar as suas maiores concentrações em leguminosas, particularmente em soja, tanto nas folhas como em

vagens (SETCVHELL, 1998).

A genistina, apesar de pertencer a uma classe distinta dos flavonóides demonstra uma grande extensão de propriedades biológica, no qual a sua combinação com o flavonóide rutina ocasiona alterações na biologia de *A. gemmatalis*, prolongando do estágio larval (GAZZONI; TUTIDA, 1996; FUGI et al., 2005).

Os efeitos causados por estas substâncias geralmente ocorrem no canal alimentar dos insetos. Em larvas de *A. gemmatalis* a maioria das alterações ocorreram principalmente no intestino médio, onde se observou alterações na morfologia desse canal alimentar e também modificações a nível celular.

Salvador, (2008) estudou os efeitos de compostos fenólicos incorporados em dietas artificiais com a presença de caseína, que podem influenciar a atividade dos aleloquímicos e adicionalmente avaliou-se os efeitos de dietas artificiais, contendo diferentes concentrações de rutina e genistina também com genótipos de soja *in natura* nos aspectos biológicos, assim como o modo de ação desses alimentos no intestino médio (IM) de *A. gemmatalis*.

O efeito de rutina foi potencializado apenas quando as lagartas se alimentaram com dietas com 7g de caseína, ou seja, a metade da necessária para o desenvolvimento adequado do inseto. Dietas com as maiores concentrações de rutina (R₂) e a mistura R₁+G₁ e folhas de PI 227687 e 'IAC-100' foram responsáveis pela maior mortalidade, redução dos pesos iniciais e de pupa, menor ganho de peso e crescimento.

Estes tratamentos, principalmente R₁+G₁ e 'IAC-100' ainda provocaram maiores alterações morfológicas no IM da lagarta. Dietas e genótipos contendo apenas genistina não apresentaram acentuado efeito antinutricional no inseto e nem alterações morfológicas importantes. Este autor concluiu que a interação das substâncias R e G observadas em folhas de soja, como a 'IAC-100' e PI 227687, atua na proteção da planta ao ataque de *A. gemmatalis*, possivelmente por alterar as células colunares do IM e sugeriu estudos mais completos.

2.5 TUBO DIGESTIVO de *Anticarsia gemmatalis*

No ambiente há uma grande diversidade de substratos naturais que servem de alimento para os insetos, como a seiva do xilema (ninfas de cercopídeos e cigarras), sangue de vertebrados (percevejos e fêmeas de mosquitos), madeira seca (cupins), bactérias e algas (larvas de borrachudos e tricópteros), folhas (larvas de lepidopteros) entre outros (GULLAN; CRANSTON, 2007).

Para cada tipo diferente de dieta os insetos apresentam peças bucais de acordo com cada tipo e textura do alimento, onde além desse aparato bucal diferenciado, apresentam o trato digestivo com estrutura e funções diferentes (GALLO et al., 2002).

Em insetos onde a alimentação é basicamente líquida, o trato digestivo de um modo geral, é longo, estreito e enrolado, pois o mesmo deve permitir o máximo contato com o alimento líquido. Esse canal alimentar apresenta um mecanismo especial conhecido como câmara filtro, que retira todo o excesso de água e tem a função de concentrar nutrientes e substâncias antes da digestão (GALLO et al., 2002)

Por outro lado os insetos que se alimentam basicamente de sólidos apresentam um canal digestivo como um tubo reto, longo ou curto, com musculatura desenvolvida e proteção contra abrasão ou ferimentos mecânicos. Este é o caso da maioria das larvas de lepidopteros, gafanhotos e baratas (GULLAN; CRANSTON, 2007).

O canal alimentar dos insetos é dividido em três regiões, no qual cada uma exerce uma função diferente. Essas regiões são devidamente separadas por válvulas, que delimitam os limites de cada região: a válvula cardíaca (estomodeu e mesêntero) e válvula pilórica (mesêntero e proctodeu) (CHAPMAN, 1998; GALLO et al., 2002).

A região anterior ou estomodeu, está relacionada com a ingestão, armazenamento, trituração e o transporte do alimento para próxima região, a mediana ou mesêntero, na qual é produzida enzimas digestivas, onde ocorre a absorção de alimentos e é considerada a principal via de acesso dos inseticidas químicos e biológicos, e por fim, o material remanescente no lúmen do trato digestivo, juntamente com a urina formada nos túbulos de Malpighi, chega a região

posterior ou proctodeu, onde ocorre a absorção de água, sais minerais e de outras moléculas importantes antes da completa eliminação das fezes (CHAPMAN, 1998; LEVY et al., 2004).

A análise histológica dessas três regiões mostrou algumas diferenças entre elas: a região anterior e posterior são praticamente idênticas, é composta da luz para a periferia por uma camada interna chamada íntima que apresenta uma estrutura cuticular; em seguida uma camada epitelial secretora que envolve a íntima e circundando toda essa estrutura aparece uma camada muscular constituída de músculos longitudinais e circulares, a qual é envolvida pela camada peritoneal ou basal. Na região posterior, além de apresentar essas duas camadas de músculos (longitudinal e circular) ela é formada e revestida por uma terceira camada de músculo longitudinal, essas três camadas de músculos tem a função de favorecer a evacuação (GALLO et al., 2002; GULLAN; LEVY et al., 2004; CRANSTON, 2007)

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

A membrana peritrófica é uma camada acelular, que consiste de uma rede de fibrilas de quitina dispostas em uma matriz proteica-glicoproteica (peritrofina) e de um polímero linear N-acetyl-D-glucosamina, tem a função de proteger o epitélio contra abrasão do conteúdo intestinal, atuando como barreira permeável às enzimas digestivas e produtos da digestão (EISEMANN; BINNINGTON, 1994), além de formar uma barreira que impede a entrada de microrganismos na cavidade do corpo e na hemocele (TERRA, 2001; WANG; GRANADOS, 2001).

Essa membrana em larvas de lepidopteros é secretada pelas células colunares ao longo do intestino médio e divide o lúmen intestinal em dois compartimentos, o espaço ectoperitrófico localizado entre a membrana e o epitélio celular no qual é encontrado enzimas digestivas produzidas pelo epitélio e substâncias que estão sendo assimiladas, e o espaço endoperitrófico, contendo o bolo alimentar no qual ocorre a digestão dos alimentos (HARPER; HOPKINS, 1997; HARPER; GRANADOS 1999; GALLO et al., 2002).

A membrana peritrófica geralmente não é encontrada em insetos que se alimentam basicamente de líquidos, como em Hemiptera e Thysanoptera,

assim também não ocorre nos insetos adultos de várias ordens inclusive em lepidopteros (GULLAN; CRANSTON, 2007), onde em alguns casos ocorre somente a presença de um gel peritrófico que possui as mesmas funções da membrana peritrófica, entretanto não possui quitina em sua composição (TERRA, 2001).

O epitélio do intestino médio pode ser classificado como simples ou múltiplo. Em larvas de lepidopteros esse epitélio é pseudoestratificado colunar, formado por quatro tipos celulares distintos: as células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (CHIANG et al., 1986, BINDER; BOWERS, 1994; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996, LEVY et al., 2004). Essas células estão envolvidas ativamente na produção e secreção de enzimas e absorção de nutrientes (CHAPMAN, 1998).

Os diferentes tipos celulares que compõem o epitélio possuem características morfológicas e funcionais diferentes. As células colunares apresentam a superfície apical com microvilosidades, projeções citoplasmáticas e núcleo alongado. São abundantes no epitélio do intestino médio e possui várias funções como secreção de enzimas digestivas, da membrana peritrófica e absorção de produtos assimilados da digestão (RICHARDS; DAVIES, 1994, LEHANE; BILLINGSLEY, 1996).

As células caliciformes, possuem invaginações da membrana plasmática apical, formando uma cavidade semelhante a um cálice, no qual o seu interior é margeado por projeções citoplasmáticas aparentemente iguais a microvilosidades contendo mitocôndrias e núcleo basal. Estas células auxiliam as células colunares na homeostasia iônica e na absorção de metabólitos (MOFFET et al., 1995; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998).

O terceiro tipo celular são as células regenerativas que são observadas na base do epitélio, individualmente ou em grupos. Estas células apresentam citoplasma escasso, com um núcleo central e poucas organelas presentes (DE PRIESTER, 1971; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; LEVY et al., 2004).

Segundo Terra (1996), essas células podem variar tanto em sua morfologia como também na sua quantidade, de acordo com a aproximação da muda (ecdise) e do ciclo de vida.

Essas células estão relacionadas principalmente com o processo de renovação epitelial, onde as células eliminadas são substituídas por outras

desenvolvidas a partir de “ninhos” de células regenerativas (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999).

As células endócrinas também são localizadas na base do epitélio, apresentam citoplasma claro com grande quantidade de grânulos citoplasmáticos (EDWARDS; WEAVER, 2001) e são descritas no epitélio intestinal de algumas ordens de insetos como alguns Lepidopteros (GÜL et al., 2001), Orthoptera (ENDO et al., 1982); Hymenoptera (CRUZ-LANDIM et al., 1996; NEVES et al., 2003), Odonata (ANDRIES, 1976) e Heteroptera (ANDRIES; BEAUVILLAIN, 1988). Estas células estão relacionadas com o controle hormonal, movimentos peristálticos, digestão, diurese, desenvolvimento e reprodução (BROWN et al., 1985; PRATT et al., 1989; WOODHEAD et al., 1989; SCOOFs et al., 1993, COAST; KAY, 1994; PATEL et al., 1995).

Segundo Iwanaga et al. (1981), estas células possuem semelhanças funcionais com relação as células endócrinas encontradas em vertebrados, ou seja, são células neurosecretoras que sintetizam e liberam grande quantidade de hormônios polipeptídeos (MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984).

Esses produtos de secreção estariam relacionados na diferenciação das células regenerativas e controlariam a secreção de enzimas digestivas produzidas por essas células epiteliais do intestino médio (BILLINGSLEY; DOWNE, 1986; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999).

O epitélio é sustentado por uma membrana basal contínua de origem conjuntiva e pela camada muscular, que é constituída de músculos longitudinais e circulares. A sobreposição dos músculos diferem em relação ao intestino anterior, ou seja, os músculos circulares aparecem internamente posicionados, enquanto que os músculos longitudinais estão externamente alocados (CONTE, 1985; LANE et al., 1996; GALLO et al., 2002).

Segundo Gallo et al. (2002) esses músculos tem a função de manter os alimentos em movimento no interior do ventrículo, favorecendo a digestão e promover os movimentos peristálticos, levando o bolo alimentar em direção ao proctodeu ou intestino posterior.

Considerando a arquitetura do epitélio intestinal das larvas de lepidópteros, Levy et al. (2009), em estudos morfométricos comparativos entre populações de larvas de *A. gemmatalis*, resistentes e suscetíveis ao AgMNPV observaram, que o epitélio do intestino médio apresentava diferenças entre as duas

populações larvais. Em larvas resistentes estas células epiteliais apresentavam valores morfométricos superiores em relação as larvas suscetíveis e sugeriram que este fato poderia estar relacionado com a resistência destas larvas ao *AgMNPV*.

2.6 RESISTÊNCIA DA LAGARTA DA SOJA AO *AgMNPV*

Os insetos de uma forma geral apresentam grande capacidade de se adaptarem aos diversos ambientes, mesmo que estes apresentem características totalmente adversas a sua sobrevivência. Geralmente os insetos criam mecanismos morfológicos (como um exoesqueleto mais resistente), genéticos (populações resistentes) contra essas adversidades.

Como os insetos pragas de diversas culturas são controlados basicamente através do uso de produtos fitossanitários, muitas vezes a aplicação de um produto uma única vez, não é o suficiente para reduzir a população de pragas na cultura. A aplicação do mesmo produto mais de uma vez, e com uma dose mais elevada para atingir o nível ideal de controle de pragas que não cause danos econômicos na cultura, podem acarretar o aparecimento de populações de insetos pragas resistentes a determinado produto fitossanitário (GALLO et al., 2002; GULLAN; CRANSTON, 2007). Os insetos neste caso apresentam como principais mecanismos de resistência aspectos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais (DEGRANDE; VIVAN; 2008).

O termo resistência é aplicado por Lara (1991), para caracterizar espécies de insetos anteriormente suscetíveis cuja população não pode mais ser controlada por um dado produto na dose normalmente recomendada, ou em nenhuma dose, na qual essa característica é transferida para as próximas gerações.

Os fatores que afetam a resistência dos insetos aos inseticidas estão relacionados com: (1) fatores genéticos - número de alelos resistentes, frequência e intensidade da resistência, dominância dos alelos resistentes, valor adaptativo dos indivíduos resistentes; (2) fatores bioecológicos - como número de gerações por ano, taxa de reprodução, modo de reprodução, mobilidade da espécie, hábito alimentar, presença de refúgio para a população suscetível e presença de inimigos naturais efetivos da praga, (3) fatores operacionais - característica do composto químico

(grupo, persistência, seletividade e formulação), e as características da aplicação (nível de controle, método de aplicação, estratégia para o uso de produtos químicos (GALLO et al., 2002; GULLAN; CRANSTON, 2007).

A maioria dos casos de resistência em campo estão ligados a produtos químicos, não sendo evidenciado até hoje populações resistentes a produtos biológicos.

Como exemplo de populações de insetos resistentes a pragas temos o caso da mosca-branca do tabaco *Bemisia tabaci* biotipo B, traça das crucíferas *Plutella xylostela* e o besouro da batata *Leptinotarsa decemlineata* os quais são resistentes a grande maioria dos inseticidas químicos existente no mercado (GULLAN; CRANSTON, 2007).

Na soja Sosa-Gómez (1995), estudando o princípio ativo endossulfam no controle do percevejo marrom *Euchistus heros*, encontrou populações resistentes a esse princípio ativo.

Este fato pode ser associado a dois mecanismos relacionados com a resistência: mecanismo fisiológico, onde a ação de enzimas principalmente as oxidases de funções mistas reduzem a penetração e transporte de moléculas do inseticida para o sistema nervoso central; e o segundo mecanismo relacionado ao fator comportamental, no qual, o efeito irritante e repelente do produto causam nos indivíduos alterações no seu comportamento, e esses indivíduos passam a evitar áreas tratadas (DEGRANDE; VIVAN, 2009).

Essa evolução da resistência a inseticidas está ligada a uma série de fatores como a aplicação freqüente de inseticida, aumento na dosagem do produto, uso de misturas indevidas de produtos e substituição por outro geralmente de maior toxicidade (GALLO et al., 2002).

Abot et al (1995), realizando experimentos laboratoriais envolvendo pressão de seleção em larvas de *A. gemmatalis* com o vírus AgMNPV, observaram rápida seleção para a resistência a esse entomopatógeno. O surgimento de larvas resistentes levou esses pesquisadores a questionarem os mecanismos de resistência desenvolvido pelo inseto. Alguns estudos indicam a possibilidade desta resistência estar atribuída a mecanismos de defesa diferencial no intestino médio (MOSCARDI , 1986; ABOT et al., 1996). Tal fato foi corroborado por Levy et al. (2005), em estudos comparativos entre larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV. Onde observou que a população de larvas resistentes

mostrou maior concentração de células regenerativas e as as células colunares com grande quantidade de protusões citoplasmáticas.

Por outro lado, em programas de controle de pragas para reduzir a resistência das larvas de *A. gemmatalis*, tem se utilizado substâncias químicas encontradas em extratos de folhas de soja, que promovem a mortalidade de larvas resistentes ao vírus em comparação com as larvas suscetíveis.

Como o intestino médio nos insetos é a principal via de acesso e ação destas substâncias, existe a necessidade de estudos sobre as alterações causadas por elas. Este trabalho visa correlacionar os efeitos pós ingestivos do flavonóide rutina e do isoflavonóide genistina, tanto isoladamente quanto associados, no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV e relacionar os efeitos destas substâncias presentes nos genótipos na quebra da resistência destas larvas, além de indicar qual o genótipo de soja promove as maiores alterações no intestino médio de ambas populações larvais.

2.7 REFERÊNCIAS *¹

- ABOT, A.R.; et al. Susceptibility of populations of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrovirus. **Journal of Entomological Science**, Georgia, v.30, p.62-69, 1995.
- ABOT, A.R.; et al. Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. **Biological Control**, Montreal, v.7, n. 1, p.126-130, ago. 1996.
- ANDRIES, J.C. Presence de deux types cellulaires endocrines et d' un type exocrine au sein du mesenteron de la larve d' *Aeshna cyanea* Muller (Odonata: Aeshnidae). **International Journal of Insect Morphology e Embriology**, Ouxford, v.5, n.6, p. 393-407, out. 1976.
- ANDRES, J.C.; BEAUVILLAIN, J.C. Ultrastructural study of cholecystokinlike immunoreactivity in endocrine cells of the insect midgut of *Nepa cinerea* (Insecta, Heteroptera): ultrastructure and genesis. **Biology of the Cell**, Paris, v.46, p.195-202, 1988.
- APPEL, H.M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, California, v.19, n.7, p.1521-1551, jul.1993.
- BARBOSA, M.Z.; ASSUMPÇÃO, R. Ocupação territorial da produção e da agroindústria da soja no Brasil, nas décadas de 80 e 90. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.31, n.11, p. 7-17, nov. 2001.
- BARNES, S. et al. Beyond ER α and ER β : Estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. **The Journal of Nutrition**, Birmingham, v.1, n.30, p.656S-657S, 2000.
- BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.1-72.
- BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. Non digestive cell types in the midgut epithelium of *Rhodnius prolixus* (Hempitera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**. Florida, v.23, p.212-216, 1986.
- BILLINGSLEY, P.F.; LEHANE, M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: LEHANE, M.J., BILLINGSLEY, P.F. (Eds). **Biology of the Insect Midgut**. Londres: Chapman & Hall, 1996, p.3-30.

*¹

Referências Bibliográficas de acordo com normas do programa de mestrado em agronomia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, 2008.

*

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR **6023**: referências, informação, documentação e elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BINDER, B.F.; BOWERS, W.S. Precocene II-induced changes in the anatomy of midgut goblet cells of last instar larvae of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Insect Morphology e Embriology**. Ouxford v. 23, n.2, p.127-134, abr. 1994.

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

CASTRO, M.E.B., et al. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n. 10, p. 1733-1761, out. 1999.

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

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

CHIANG, A.S.; YEN, D.F.; PENG, W.K. Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. **Journal Invertebrate Pathology**, Netherlands, v.47, n.3, p.333-339, maio 1986.

CLARK, W.J.; et al. Resistance of certain soybean cultivars to bean leaf beetle blister beetle, and bollworm. **Journal Economic Entomology**, Baltimore, v.65, p. 1669-1672, 1972.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Indicadores da Agropecuária**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/IA-agos09.pdf>. Acesso em 06 de agosto de 2009.

CONTE, H. **Morfologia do tubo digestivo de *Diatrea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidóptera, Pyralidae) durante o desenvolvimento larval, estudo anatômico e histológico**. 1985. Dissertação (Mestrado em Biologia) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

COSTA, A.J.D.; ALMEIDA, M.J.M. O complexo agroindustrial paranaense: soja transgênica versus soja convencional. In: ECOPAR, n.5, 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 2007 p.1-20.

COSTA, J. A.; MANICA, I. **Cultura da Soja**. Porto Alegre: Ceres, 1996.

CRUZ-LANDIM, C. et al. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Computational Biology**, New Rochelle, v.1, p.29-40, 1996.

DEAN, D.H. Biochemical genetics of the bacterial insect-control agent *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospect for genetic engineering. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Andover, v.2, p.341-363, 1984.

DEGRANDE, P.E.; VIVAN, L.M. Pragas da Soja. In: _____. **Boletim de Pesquisa da Soja**. Rondonópolis: Fundação MT, 2006. p.153-169.

DEGRANDE, P.E.; VIVAN, L.M. Pragas da soja. In: _____. **Tecnologia e produção**: Soja e Milho 2008/2009. Rondonópolis: Fundação MT, 2009. p.73-108.

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

DOUGLAS, N. A. The velvetbean caterpillar as a pest of soybeans in southern Louisiana and Texas. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, v. 23, n.4, p.683-690, ago. 1930.

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

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

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

ELLISOR, L. O. **Notes on the biology and control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hbn.** Luisiana: Louisiana Agricultural Experimental Station Bulletin, 1942. v.350

EMBRAPA. **Sistemas de Produção: Tecnologia e produção de soja na região central do Brasil 2006**. 1.ed. Londrina:Embrapa-CNPSo, 2006.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologia de Produção de Soja no Paraná 2004**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosojaPR/SojanoBrasil.htm>> Acesso em: 23 abr.2009.

ENDO, Y. et al. Fine structure of development endocrine cells and columnar cells in the cockroach midgut. **Biomedical Research**, Japan, v. 3, n.6. p. 637-644, 1982.

FELTON, G.W. et al. Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, California, v.15, n.12, p.2667-2694, 1989.

FELTON, G.W.; DUFFEY, S.S. Enzymatic antinutritive defenses of the tomato plant against insects.In: HEDIN, P. (Ed.) **Naturally occurring pest bioregulators**.

Washington: American Chemical Society, 1991. p.166-197.

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

FORD, B. J. et al. **The literature of arthropods associated with soybean, a bibliography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)**. Urbana: Illinois National History Survey, 1975.

FUGI, C.G.Q.; et al. Biology of *Anticarsia gemmatilis* on Soybean Genotypes With Different Degrees of Resistance to Insects. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.62, n.1, p.31-35, jan./fev. 2005.

GALLO, D.; et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v.10.

GAZZONI, D.L. et al., **Manejo de pragas da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1981.

GAZZONI, D. L.; et al. **Manejo de pragas da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1988.

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

GAZZONI, D.L.; TUTIDA, F. Efeito de genótipos resistentes e suscetíveis sobre a biologia da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília , v.31, n.10, p. 709-714, out. 1996.

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

GRANADOS, R.R.; LAWLER, K.A. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. **Virology**, New York, v.108, n.30, p.297-308, jan. 1981.

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

GRANADOS, R.R.; WILLIAMS, K.A. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986, p.89-108 v.1.

GREENE, G. L.; et al. Mating and oviposition of the velvetbean caterpillar in soybeans. **Environmental Entomology**, College Park, v. 2, n. 6, p. 1113-1115, 1973.

GREENE, G. L. Sexual dimorphism of *Anticarsia gemmatilis* leg scales. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 57, n. 3, p. 280, 1974.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. **Os insetos um resumo de entomologia**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2007.

GÜL, N. et al. A study on endocrine cells in the midgut of *Agrotis segetum* (Denn and Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Turkish of Journal Zoology**, Ankara, v. 25, p. 193-197, out. 2001.

GUYTON, F. E. An outbreak of the velvetbean caterpillar in Alabama with data on control. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, v. 33, n. 4, p. 635-639, 1940.

HARBONE, J.B. Flavonoid pigments. In: ROSENTHAL, G.A.; BEREMBAUM, M.R. (Eds.). **Herbivores and their interaction with secondary metabolites**. London: Academic Press, 1991, p.389-429.

HARPER, M.S.; HOPKINS, T.L.. Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). **Tissue and Cell**, Ouxford, v.29, n.2, p.463-475, ago. 1997.

HARPER, M.S.; GRANADOS,R.R. Peritrophic membrane structure and formation of larval *Trichoplusia ni* with na investigation on the secretion on the secretion patterns of a PM mucin. **Tissue and Cell**,Ouxford, v.31, n.2, p.202-211, maio, 1999.

HATCHETT, J.H.; BELAND, G.L.; HARTWING, E.E. Leaf feeding resistance to bollworm and tobacco budworm in three soybean plant introductions. **Crop Science**, Stanford, v.16, p. 277-280, 1977.

HINDS, W. E.; OSTERBERGER, B. A. The soybean caterpillar in Louisiana. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, v. 24, n.6, p.1168-1173, 1931.

HOFFMANN-CAMPO,C.B.; et al. Mecanismos de resistência de genótipos de soja: teste de não-preferência para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep.:Noctuidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p. 513-519, abr. 1994.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; **Role of the flavonoids in the natural resistance of soyabean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. Dissertation (Doutorado em Botânica) - 165 p. The University of Reading, Reading.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; et al. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2000.

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

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; et al. Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.10, p. 1453-1459, out. 2006.

IWANAGA, T.; et al. Immunohistochemical demonstration of PP⁻, somatostatin-enteroglucagon and VIP⁻ like immunoreactivities in the cock-roach midgut.

Biomedical Research, Japan, v.2, p.202-207, 1981.

KAWANISHI, C.Y.; et al. Entry of insect virus *in vivo* by fusion of viral envelope and microvilli membrane. **Journal of Invertebrate Pathology**, Netherlands, v.20, p.104-108, jul. 1972.

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

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

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

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

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

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

LEPPLA, N. C. Circadian rhythms of locomtion and reproductive behavior in adult velvetbean caterpillar. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 69, n. 1, p. 45-48, 1976.

LEVY, S.M. et al. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v.64, n. 3b, p.1-6, ago. 2004.

LEVY, S.M. et al. Morfologia do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*, susceptível e resistente ao vírus da poliedrose nuclear (AgMNPV), em larvas controle e infectadas pelo vírus. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., 2005, Recife. **Resumos...** Recife: FIOCRUZ, 2005. p.188.

LEVY, S.M.; et al. A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). **Journal of Invertebrate Pathology**, Netherlands, v.101, n.1, p.17-22, abr. 2009.

LIMA, L.R.P. et al. Determinação da atividade de lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina. **Revista de Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 626-631, jul./set. 1999.

LOPES, R.M. et al. Efeito de diferentes doses de rutina sobre as concentrações de albumina, creatina, uréia e ácido úrico no soro de coelhos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 86, n.1, p. 35-38, jan. 2005.

LOURENÇÃO, A.L.; et al. Avaliação de danos causados por percevejos e por lagartas em genótipos de soja de ciclo precoce e semiprecoce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.5, p. 879-886, maio 2000.

MAGRINI, E. A.; SILVEIRA NETO, S.; PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P.S.M. Biologia e exigências térmicas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 513-519, dez. 1996.

MARTIGNONI, M.E. Baculovirus: an attractive biological alternative. In: GARNER, W.Y.; HARVEY JUNIOR, J. (Eds.). **Chemical and biological controls in forestry**. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1984. p.55-67.

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

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

MOFETT, F.; KOCH, A. Electrophysiology of K⁺ transport by midgut epithelium of lepidopteran insect larvae. **The Journal of Experimental Biology**, Londres, v.198, n.10, p.2115-2125, out. 1995.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pelas bactérias *Bacillus thuringiensis* modo de ação e resistência. In: MELO, L.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed). **Controle biológico**, Jaguariúna Embrapa-CNPMA, 2000, v.3, p. 163-200.

MOSCARDI, F. **Effect of soybean crop phenology on development, leaf consumption and oviposition of *Anticarsia gemmatalis* Hübner**. 1979. Tese (Doutorado em Entomologia) – University of Florida, UF, Gainesville.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus para o controle da lagarta da soja. In: ALVES, S.B.. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p.188-202.

MOSCARDI, F.; BARFIELD, C. S.; ALLEN, G. E. Consumption and development of velvetbean caterpillar as influenced by soybean phenology. **Environmental Entomology**, College Park, v. 10, n. 6, p. 880-884, 1981.

MOSCARDI, F.; CARVALHO, R.C.Z. Consumo e utilização de soja por *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) infectada, em diferentes estádios larvais, por seu vírus de poliedrose nuclear. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.22, n.2, p.267-280, jun.1993.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R. A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. In: INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 1.,1992, Ames, Iowa. **Anais...Ames: Crop Science Society of America**, 1992. p.115-119.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. de. Baculovirus para o controle de pragas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Londrina, n.24, p. 22-29, jan./fev. 2002.

NEVES, C.A., SERRÃO, J.E., GITIRANA, L.B. Ultrastructure of midgut endocrine cells in *Meipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos,v. 63, n.4, p.683-690, nov. 2003

OMYILAGHA, J.C.; GROTEWOLD, E. The biology and structural distribution of surface flavonoids. **Recent Research developments in plant science**, Columbus Ohio, v.2, p. 53-71, 2004.

O.REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. Salt Lake City, UT: W.H. Freeman, 1992.

PAINTER, R.H. **Insect resistance in crop plants**. New York, 1951.

PANIZZI, A. R.; et al. **Insetos da soja no Brasil**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1977.

PANIZZI, A.R. Manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: CROCOMO, W.B. (Ed.). **Manejo integrado de pragas**. São Paulo: UNESP-FUNEP, 1990. p.293-321.

PATEL, N.; HAYES, T.K., COAST, G.M. Evidence for the hormonal function of a CRF-related diuretic peptide (*Locusta*-DP) in *Locusta migratoria*. **The Journal of Experimental Biology**, London, v.198, n. 3, p.793-804, mar. 1995.

PIUBELLI, G.C. **Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais**. 2004.Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Entomologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 152p.

PIUBELLI, G.C. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis* ? **Journal of Chemical Ecology**, California, v.31, n.7,p.1509-1525, jul. 2005.

PRAÇA, L.B.; SILVA NETO, S.P.; MONNERAT, R.G. ***Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818 (Lepidoptera:Noctuidae) Biologia, Amostragem e Métodos de Controle**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2006.

PRAÇA, L.B. et al. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.1, p. 11-16, jan. 2004.

PRATT, G.E. et al. Identification of allatostatin from adult *Diploptera punctata*. *Biochemical and biophysical research communications*, Estados Unidos, v.163, n.3, p. 1243-1247, set. 1989.

REID, J. C. **Larval development and consumption of soybean foliage by the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory.** 1975. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – University of Florida, UF, Gainesville.

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

RICHARDS, O.W., DAVIES, R.G. **Imms' general textbook of entomology**. 10. ed. Londres: Chapman & Hall, 1994. v.1.

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

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

SCOOF, L., VAN DEN BROECK, J., DE LOOF, A. The myotropic peptides of *Locusta migratoria*: structures, distribution, functions and receptors. **Insect biochemistry and molecular biology**. Inglaterra, v.23, n.8, p.859-81, dez. 1993.

SETCHELL, K.D.R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Cincinnati, v.68, n.1, p.1333S-1346S, jan. 1998.

SHILS, M.E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 1.ed. Tamboré: Manole Lda, 2003

SILVA, R. F. P. **Aspectos biológicos e nutrição de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera – Noctuidae) em meios natural e artificial e influência da temperatura e fotoperíodo no seu desenvolvimento.** 1981. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, Piracicaba.

SILVA, R. F. P.; PARRA, J. R. P. Efeito do fotoperíodo no desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em condições de laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 15, n. 2, p. 201-206, ago.1986.

SILVA, R.R. et al. Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.51, n.3, p. 258-264, abr. 2001.

SILVA, R.R. et al. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, Ribeirão preto, v.35, p. 127-133, abr./jun. 2002.

SRIVASTAVA, R., Y.N. SHUKLA & S. KUMAR. Recent advances in the chemistry of insect antifeedants. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, [S.l.] v. 21, p. 59-76, 1999

SOSA-GOMES, D.R. Controle biológico da lagarta-da-soja com *Baculovirus anticarsia*. In: _____ **PRÓ-GUAÍBA**: Subprograma Sistemas de Manejo e Controle da Contaminação por Agrotóxicos. Porto Alegre: **EMATER-RS**, 1995, p.27-35.

SOSA-GÓMEZ, D.R. et al. **Manual de Identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2006.

SOSA-GÓMEZ, D.R. **Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos**. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br/index>>. Acesso em: 14 outubro de 2009.

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

STERN, V.M. et al., Improvements on self-propelled equipment for collecting, separating and tagging, mass numbers of insects in the field. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, v.58 p.949-953, 1965.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect pathology**. New York: Academic, 1993.

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

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdã, v.109B, p.1-62, n.1, jan. 1996.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.47, n. 2, p.47-61, jun. 2001.

TOLEDO, T., et al., Effects of different rutin dosages on chloride, calcium and phosphorus levels serum of rabbits. **Revista Chilena de Nutrición**, Santiago, v.30, n.3, p.263-270, dez. 2003.

VALADARES-INGLIS, M.C.; SOUZA, M.T.; SHILER, W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico In: MELO, L.S.; AZEVEDO, I. L. (Ed.).

Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v.1, p.208-217.

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

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

VOLKMAN, L.E.; KEDDIE, B.A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**, v.1, p.249-256, 1990.

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

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

WATSON, J. R. **The velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*)**. Florida: Report Florida Agricultural Experimental Station ,1915.

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

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

WOODHEAD, A.T.; et al. Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Iowa City, v.86, n. 15, p.5997-6001, ago. 1989.

3 ARTIGO 1: EFEITOS PÓS INGESTIVOS DOS FLAVONÓIDES RUTINA E GENISTINA NO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *A. gemmatalis* SUSCETÍVEIS E RESISTENTES AO NUCLEOPOLIEDROVÍRUS AgMNPV

RESUMO

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae) é uma das principais pragas da cultura da soja, e quando não controladas podem causar até 100% de perdas da lavoura. O seu controle é realizado através da pulverização do bioinseticida à base do múltiplo nucleopoliedrovírus (AgMNPV) e pelo uso da resistência de plantas com cultivares que apresentam um complexo de substâncias químicas, principalmente flavonóides que tornam as plantas tóxicas para os insetos. Como o intestino médio é a principal via de inseticidas e substâncias químicas das plantas resistentes, estudo sobre o efeito dos flavonóides neste órgão é necessário. O objetivo deste trabalho foi verificar as alterações morfológicas no intestino médio das larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, após a ingestão de folhas de genótipos de soja contendo rutina (R) e genistina (G) em diferentes concentrações. Ambas populações larvais foram provenientes da Embrapa-CNPSoja/Londrina-PR e foram tratadas com genótipos de soja “in natura” resistente a insetos: BRS 257 (testemunha); BR 16, Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687. O intestino médio das larvas de 4º instar foram fixados em Karnovsky, processados e analisados ao microscópio de luz. Todos os tratamentos causaram alterações nas células epiteliais do intestino médio. As células colunares foram as mais alteradas, apresentando grande vacuolização e vazios citoplasmáticos e liberação de protusões com conteúdo celular em ambas populações larvais. As células caliciformes foram pouco alteradas enquanto que as células regenerativas das larvas suscetíveis, no tratamento Dowling, e as larvas resistentes do tratamento IAC 100 apresentaram em intensa atividade na base do epitélio. Os tratamentos Dowling, IAC 100 e PI 227687 promoveram alterações pontuais nas camadas musculares da LS, e os tratamentos PI 229358, IAC e PI 227687 na camada muscular das larvas resistentes. Dentre os tratamentos o genótipo IAC 100 promoveu maiores alterações no IM das larvas resistentes e o genótipo PI 227687 pela maiores alterações em larvas suscetíveis e resistentes.

Palavras-chave: lagarta da soja, resistência, protusões, intestino médio, genótipos

ABSTRACT

3 ARTICLE 1: AFTER EFFECTS OF INTAKE FLAVONOID RUTIN AND GENISTIN, IN THE MIDGUT OF LARVAE SUSCEPTIBLE AND RESISTANT OF *A. gemmatalis* NUCLEOPOLYEDROVIRUS THE AgMNPV

The velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) is a pest of soybean, and when not controlled can cause up to 100% loss of crops. Its biological control is achieved by spraying the bio-insecticide based on multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) and the use of plant resistance to cultivars that have complex chemical substances, mainly flavonoids that make the plants toxic to insects. The midgut is the major route of absorption and action of most chemical insecticides, biological and chemical substances, so the study on the possible changes caused by the flavonoids rutin and genistin in the midgut of larvae of the soybean, it is very necessary. The objective of this study was to assess the morphological changes in the midgut of the larvae of *A. gemmatalis* susceptible and resistant AgMNPV, after ingestion of leaves of soybean rutin (R) and genistein (G) at different concentrations. Both larval populations were provenientes of Embrapa-CNPsoja/Londrina-PR and were treated with soybean genotypes in their natural state insect resistant: BRS 257 (control), 16 BR, Dowling, PI 229358, IAC 100 and PI 227687. The midgut of the larvae of 4th instar were fixed in Karnovsky, processed and analyzed by light microscopy. All treatments caused changes in the epithelial cells of the midgut. The columnar cells were the most altered, showing large, empty cytoplasmic vacuolization and release of cellular protrusions containing both larval populations. The goblet cells were little changed while the regenerative cells of susceptible larvae, the treatment Dowling, and the larvae resistant treatment IAC 100 showed nests of regenerative cells "in large numbers at the base of the epithelium. Treatments Dowling, IAC 100 and PI 227687 promoted specific changes in the muscle layers of SL, and treatments PI 229358, PI 227687 and IAC 100, in the muscular layer of the resistant larvae. Among the treatments with IAC 100 promoted major changes in the IM and the larvae resistant genotype PI 227687 by major changes in susceptible and resistant larvae.

Key Words: velvetbean caterpillar, resistance , protrusions, midgut, genotypes

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é responsável por grande parte da produção mundial de grãos e a soja (*Glycine max*) é considerada a principal cultura de exportação brasileira (EMBRAPA, 2005; CONAB, 2009). É a espécie vegetal de maior importância econômica, colocando o país como o segundo maior produtor e exportador de farelo e grãos de soja no mundo, alcançando uma produção de 62 milhões de toneladas na última safra (CONAB, 2009).

Os insetos pragas são fatores importantes na redução da produtividade em diferentes espécies vegetais cultivadas. Na soja, as larvas da *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), conhecidas como “lagarta-da-soja”, são uma das principais pragas desfolhadoras e no Brasil, encontram-se distribuídas em praticamente todas as áreas de cultivo. Em condições normais, essa praga ocorre nas lavouras a partir de novembro, nas regiões ao Norte do Paraná, e a partir de dezembro a janeiro em todo o Sul do País, causando desfolhamento que pode chegar a 100% (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; SOSA-GÓMEZ et al., 2006; DEGRANDE; VIVAN, 2006).

As infestações de pragas nas culturas, em geral, são controladas através da utilização de agrotóxicos, contudo, seu uso indiscriminado é ecologicamente nocivo e pode desencadear a resistência dos insetos aos produtos utilizados, surtos de pragas secundárias, efeitos adversos em organismos benéficos, resíduos indesejáveis em alimentos e danos diretos aos aplicadores dos produtos (HOFFMANN-CAMPO, 1995). Na busca da redução do uso do controle químico, técnicas alternativas tem sido utilizadas no combate a essa praga, como o uso de inseticidas biológicos e o uso de plantas resistentes (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; 2001; PIUBELLI et al., 2005).

O bioinseticida a base do vírus *AgMNPV* (*Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus) específico para esta praga, tem sido empregado como controle biológico desde a década de 80 (MOSCARDI; CARVALHO, 1993; MOSCARDI, 1999; ABOT et al., 1996). A infecção pelo *AgMNPV* inicia quando as lagartas ingerem os poliedros virais juntos das folhas de soja; os vírions são liberados no lúmen alcalino do intestino médio, ultrapassam a membrana peritrófica e se fundem com a membrana das células epiteliais, após um reconhecimento de

receptores específicos, iniciando o ciclo de replicação (FLIPSEN et al., 1995; BARRET et al., 1998).

A utilização de cultivares de plantas com resistência a pragas é mais recente e é considerada como o método ideal de controle, uma vez que as populações podem ser reduzidas abaixo do nível de dano econômico, sem poluição ambiental (LARA, 1991), além disso não requer a adoção de tecnologia sofisticada por parte dos agricultores e não apresenta custos adicionais (EMBRAPA, 2005).

A resistência da soja a insetos é uma tática muito utilizada nos programas de controle de pragas. Os mecanismos de defesa da planta abrangem uma série de características morfológicas e, também, um complexo de substâncias químicas, que podem torná-la repelente, tóxica ou, de algum modo, inadequada para os insetos-praga (PIUBELLI, 2004). Na soja, as substâncias de defesa mais prováveis são os flavonóides (HOFFMANN-CAMPO, 1995), que em geral são mais abundantes nos genótipos resistentes às pragas. Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais que possuem atividades biológicas bastante diversificadas. Uma das maiores ações de flavonóides está relacionada à formação de ácidos graxos pela ação de fosfolipase A2, responsável pela hidrólise de fosfolipídeos presentes nas membranas celulares, com a liberação do ácido araquidônico (KUBO; HANKE, 1986; LARA, 1991; SILVA et al., 2002; ONYILAGHA; GROTEWOLD, 2004; LOPES et al., 2005). Assim, os flavonóides podem interagir e penetrar nas bicamadas lipídicas das membranas, alterando as barreiras e a permeabilidade das membranas celulares (LIMA et al., 1999; SILVA et al., 2001). Outras funções seriam relacionadas à atuação na expressão de receptores de membrana, como agentes antibacterianos e antivirais e inibidores de enzimas proteolíticas (TOLEDO et al., 2003).

Os compostos fenólicos presentes nas plantas possuem diferentes efeitos sobre os herbívoros. A ativação desses compostos ocorre por oxidação e pode levar a precipitação de proteínas e inibindo a digestão pode ocorrer devido à formação de pontes de hidrogênio, ou ainda pela formação de ligações covalentes, com proteínas e enzimas digestivas (APPEL, 1993). Os radicais de hidroxila formados durante a oxidação dos compostos fenólicos possuem ação tóxica e são responsáveis pela ruptura da integridade da membrana e por distúrbios de metabolismo no epitélio intestinal (APPEL, 1993). Em lagartas, a ligação covalente do ácido clorogênico com proteínas monoméricas inibe a absorção de aminoácidos

(FELTON et al., 1989; FELTON; DUFFEY, 1991).

Buscando entender os efeitos dos flavonóides nos insetos, Hoffmann-Campo et al. (1994) realizaram testes de preferência alimentar em *A. gemmatalis* e notaram que os genótipos de soja BR82-12547, IAC74-2832, PI 227687, PI 229358, PI 274454 foram os mais rejeitados pela lagarta. Estudos posteriores identificaram a presença de sete flavonóides na PI 227687, uma das mais utilizadas nos programas de resistência para insetos, o que poderia indicar uma maior toxicidade desta cultivar e explicar a rejeição do inseto. Dentre os flavonóides, a rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo) é reconhecida por desempenhar papel muito importante na defesa da planta a lepidópteros (HOFFMANN-CAMPO, 1995; HOFFMANN-CAMPO et al., 2001). Essa substância foi também identificada em extratos de folhas de PI 227687, PI 274454 (PIUBELLI et al., 2005). Estudos prévios destas substâncias em insetos desfolhadores mostraram efeitos antibiótico e/ou não consumível em larvas de Lepidoptera como *Manduca sexta* (L.) (STAMP; SKROBOLA, 1993), *Heliothis virescens* (F.) (HOFFMANN-CAMPO, 1995) e *Trichoplusia ni* (Hübner) (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001).

Para atuarem de forma efetiva e eficaz, tanto o vírus (AgMNPV) como as substâncias químicas, devem ser ingeridas pelas lagartas, e após a ingestão, o vírus e as substâncias químicas atuarão diretamente no tubo digestivo, que nos insetos é considerado uma eficiente barreira físico-química contra a ação de microrganismos que possam ser ingeridos juntos com a alimentação (TERRA; FERREIRA, 1991; CHAPMAN, 1998). Nos insetos as principais reações da digestão e absorção dos alimentos, e também dos produtos fitossanitários químicos e biológicos ocorrem na região do intestino médio (TERRA; FERREIRA, 1991; CHAPMAN, 1998).

Existem poucos estudos sobre o efeito nutricional e pós-ingestivo dos flavonóides na lagarta da soja. Segundo Gazzoni et al (1997) em *A. gemmatalis*, a rutina e genistina apresentaram efeitos característicos de antibiose, alongando o ciclo larval e reduzindo a sua sobrevivência. Já para Piubelli et al (2006) a rutina tem aumentado a mortalidade de larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao vírus AgMNPV em comparação com larvas suscetíveis. Recentemente Salvador (2008) verificou alterações morfológicas no epitélio do intestino médio (IM) em *A. gemmatalis* em decorrência da ingestão da rutina e genistina, e de folhas de genótipos de soja, com e sem característica de resistência à insetos, que

apresentam essas substâncias em sua constituição química. As substâncias foram adicionadas a dietas artificiais em diferentes concentrações, bem como foram avaliados os efeitos de genótipos de soja resistente a insetos (PI 227687, IAC-100, PI274454 e Dowling), que apresentam rutina e genistina em sua constituição, e (BR-16) considerada como suscetível, sem rutina em sua composição foi utilizado como controle. Para o autor o melhor efeito foi detetado quando a rutina e genistina atuaram em conjunto levando a desestruturação epitelial do IM. De acordo com Salvador (2008) este é o primeiro estudo que aborda o modo de ação desses compostos no IM de *A. gemmatalis*, e por isto mesmo estudos morfológicos, histoquímicos e ultraestruturais serão necessários para o melhor entendimento da atuação dos flavonóides no trato intestinal da lagarta-da-soja.

Em larvas de *A. gemmatalis* o IM é formado por um epitélio pseudoestratificado colunar, com pelo menos quatro tipos celulares distintos: células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (LEVY et al., 2004, 2005). O epitélio é revestido por uma estrutura acelular denominada de membrana peritrófica (MP) que separa o epitélio do conteúdo intestinal protegendo-o contra abrasão, atuando como barreira permeável às enzimas digestivas e produtos da digestão (EISEMANN; BINNINGTON, 1994; TERRA, 2001), além de formar uma barreira que dificulta ou impede a entrada de microrganismos na hemocele (WANG; GRANADOS, 2001). Abaixo da camada epitelial, sustentando toda essa arquitetura e separando o tubo digestivo do restante da hemocele, encontra-se uma delicada membrana basal de origem conjuntiva (visível somente ao microscópio eletrônico de transmissão) e a camada muscular, que é composta por dois tipos de músculos: os longitudinais e os circulares (LEHANE 2006; GALLO et al., 2002; LEVY et al., 2004).

Toda essa estrutura do intestino médio quando sofre o ataque de patógenos ou substâncias químicas, sofre alterações em sua morfologia; fisiologia e metabolismo, resultando em fragilidades que não propiciarão à lagarta completar o seu ciclo de desenvolvimento, e as vezes até causar a morte da mesma (FUGI et al., 2005; SALVADOR, 2008).

Embora a biologia da lagarta da soja seja bastante estudada, ainda encontramos na literatura específica, poucas informações sobre o intestino médio deste inseto, excetuando os trabalhos Levy et al. (2004) que descreveram o sistema digestivo de larvas suscetíveis e resistentes ao AgMNPV alimentadas com dietas isentas ou inoculadas com o vírus AgMNPV. Todavia inexistem trabalhos sobre as

alterações promovidas no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, concomitante à ingestão de substâncias químicas (flavonóides), encontradas em diferentes genótipos de soja com características de resistência a insetos.

Como o intestino médio nos insetos é a principal via de acesso e ação destas substâncias, existe a necessidade de estudos sobre as alterações causadas por elas. Visando correlacionar os efeitos pós ingestivos dos flavonóides rutina e do isoflavonóide genistina, tanto isoladamente quanto associados, no intestino médio de larvas *A. gemmatalis* e verificar os possíveis efeitos dessas substâncias na quebra da resistência destas larvas ao AgMNPV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os genótipos de soja: BRS 257, BR 16, Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687. A genealogia dos genótipos e as concentrações de flavonóides rutina e genistina presentes estão descritos na Tabela 2.1

Tabela 2.1 Genealogia dos genótipos de soja utilizados e as concentrações de flavonóides rutina e genistina em mg/g x 10⁻².

Tratamentos Genótipos	Genealogia	Concentração (mg/g)	
		Rutina	Genistina
1. BRS 257	BR93-32109 x BR94-23396	0,0	0,0
2. BR 16	D69-1310-M58 (D49-772 x D49-2491) x 'Davis'	0,0	0,16
3. Dowling	Semmes x PI 200492	0,0	4,29
4. PI 229358	Tóquio, Japão	2,12	1,36
5. IAC 100	'IAC 12' x IAC 78-2318	9,72	1,42
6. PI 227687	Okinawa, Japão	36,82	1,22

VALLE e LOURENÇÃO, (2002)

O genótipo testemunha (BRS 257), o genótipo (BR 16) com

características de suscetibilidade a insetos (SALVADOR, 2008) e os genótipos resistentes a insetos (Dowling, PI 229358, IAC 100 e PI 227687) foram semeados em casa de vegetação do tipo telada com incidência de luz durante o dia da Embrapa Soja Londrina-PR, em vasos contendo terra e irrigação por gotejamento com capacidade de cinco litros, na quantidade de cinco sementes por vaso, em um total de sete vasos/tratamento. Não foram realizadas adubações de cobertura e aplicações de produtos fitossanitários. As folhas foram coletadas, levadas ao laboratório e lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 5%; enxaguadas em água destilada; secas em papel filtro e colocadas em gerbox com os ovos de *A. gemmatalis*.

Os ovos de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, foram fornecidos pelo Laboratório de Entomologia da EMBRAPA Soja, Londrina/PR. Para obtenção dos ovos de *A. gemmatalis* suscetíveis ao AgMNPV, as larvas foram mantidas em dieta artificial (HOFFMANN-CAMPO et al., 1985) sob temperatura controlada (25-27°C), fotoperíodo (14h luz/10h escuro) e com 80% de umidade relativa. Após atingirem o estágio de pupas, essas foram separadas entre machos e fêmeas e colocadas em gaiolas, de 60 a 70 casais, para emergirem e se acasalarem. As gaiolas foram forradas com papel sulfite off-set linha d'água para ovoposição. Os papéis com os ovos foram imersos em água; os ovos eram descolados cuidadosamente, peneirados em peneiras de malha fina e colocados em pedaços de papel (3x4 cm), com aproximadamente 200 unidades. Os ovos de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV, foram obtidos através do mesmo processo descrito acima, modificando a dieta oferecida às larvas, que continha concentração de *Baculovirus* mantida sob pressão de seleção (Concentração Letal - CL₈₀ em cada geração), de acordo com os procedimentos de Abot et al. (1996).

Os papéis contendo os ovos eram fixados em papel toalha e colocados na tampa da caixa gerbóx, em um total de quatro gerbóx para cada tratamento (genótipo), totalizando cerca de 800 ovos/tratamento. Os gerbóx continham em sua base, papel filtro para facilitar a posterior manutenção das larvas e sua limpeza. Além disso, eram depositadas no papel filtro, 2 folhas dos respectivos genótipos. Para a manutenção da umidade das folhas e garantia de folhas tenras, foi adicionado em cada pecíolo, porções de algodão umedecido.

Após eclosão, as larvas foram monitoradas diariamente até o segundo ínstar, quando eram repicadas em seis gerbóx contendo cerca de 25 larvas

por gerbóx, para facilitar a manutenção da criação. As folhas de soja eram trocadas a cada 12 horas para não ocorrer a falta de alimento para as larvas.

Após o 4º instar (10 a 12 dias de desenvolvimento pós eclosão), as larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV foram anestesiadas e imobilizadas por resfriamento (5 minutos) e dissecadas sob estereoscópio, com solução salina para insetos (1,80 g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16 de CaCl; 0,004g de NaHCO₃ e água destilada-q.s.p 100 mL). A larvas foram presas pelas extremidades por alfinetes entomológicos, em placa de Petri preenchida com paraplast e com o auxílio de tesoura oftalmológica foi realizado uma incisão logitudinal na região ventral, do primeiro segmento torácico ao penúltimo segmento abdominal, com rebatimento lateral da cutícula. Os tubos, em número de 30 por tratamento, eram coletados, fixados em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2) por 6 horas e processados segundo o protocolo de Cerri e Cerri-Sasso (2003).

Após a fixação, o material foi lavado em solução tampão fosfato de sódio (0,1M e pH 7,2), por 5 minutos; desidratado em álcool etílico 90% (20 minutos) e em álcool etílico 100% (20 minutos); pré-infiltrado em solução de resina básica (hidroxetilmetacrilato) + álcool 100% (1:1) por 4 horas em temperatura ambiente; infiltrado em resina pura (kit de embebição Historesin® da Leica) em temperatura ambiente por 24 horas; incluído em moldes apropriados de polietileno contendo solução de resina básica (hidroxetilmetacrilato) + ativador (dibenzoilperóxido) + endurecedor (dimetilsulfóxido) e mantido em temperatura ambiente até a polimerização da resina. O material emblocado foi cortado com 4µm de espessura, com navalha de tungstênio, em micrótomo rotativo automático modelo LEICA RM 2265 e colocado em lâminas de vidro previamente limpas com álcool éter.

Os cortes foram hidratados (5 minutos) em H₂O destilada, corados pela Hematoxilina de Harris (40 minutos); lavados em água corrente (10 minutos), corados com Eosina aquosa (30 minutos), lavados em água destilada (5 minutos); desidratados em álcool 95 % e 100%; diafanizados em xilol (30 minutos); montados em bálsamo do Canadá e após secagem foram analisados no fotomicroscópio de luz (Axiophot da Zeiss) do Departamento de Histologia da UEL.

3. RESULTADOS

As larvas de *A. gemmatalis*, suscetíveis (LS) e resistentes (LR) ao nucleopoliedrovírus AgMNPV, alimentadas com as folhas dos diferentes genótipos de soja, apresentaram arquitetura similar de intestino médio (IM), porém com variações pontuais em muitos de seus componentes.

A descrição morfológica dos IM das LS e LR alimentadas com folhas do genótipo BRS 257 (R=0; G=0), foi o parâmetro de comparação para os diferentes genótipos, uma vez que o mesmo não possuía concentração de flavonóides (rutina e genistina), em sua composição química, sendo portanto a testemunha do experimento .

O IM das LS e LR tratadas com o genótipo BRS 257 era constituído, da luz para a periferia, pela membrana peritrófica, camada epitelial e camada muscular (Figs. 4.1 A e 4.2 A).

A membrana peritrófica era uma fina estrutura acelular, bastante visível e preservada em todo o intestino médio, dividindo o lúmen intestinal nos espaços endoperitrófico e ectoperitrófico. O espaço endoperitrófico apresentou grande quantidade de alimento e o espaço ectoperitrófico mostrou-se reduzido estando bem próximo do epitélio.

O epitélio do intestino médio em ambos os tipos larvais era do tipo pseudoestratificado prismático com bordadura estriada, formado por três tipos celulares distintos: as células colunares (Co); caliciformes (Ca) e as regenerativas (Cr) (Figs. 4.1 A , 4.2 A).

As células colunares eram altas, prismáticas e predominavam na extensão do intestino médio. O citoplasma era basófilo, vacuolizado com núcleo alongado, geralmente localizado no terço superior da célula, entre a região central e apical. Estas células apresentaram regiões citoplasmáticas distintas que permitiram diferencia-las em região apical, com vacuolização e expansões citoplasmáticas formando a bordadura estriada; região média com menor vacuolização que a porção apical e a região basal com aspecto mais homogêneo e com poucos vacúolos (Figs. 4.1 A e, 4.2 A).

As células caliciformes apresentaram uma grande cavidade em

forma de cálice, com pequena quantidade de citoplasma acidófilo, núcleo achatado e basal (Figs. 4.1 A e B, 4.2 A).

As células regenerativas eram encontradas isoladas ou em pequenos grupos na base do epitélio e apresentavam formato arredondado ou oval, com citoplasma basófilo e núcleo central (Figs. 4.1 A).

Abaixo da camada epitelial, observou-se a camada muscular constituída internamente por feixes de fibras musculares transversais, do músculo circular e externamente por feixes musculares disposto longitudinalmente, do músculo longitudinal (Figs 4.1 A).

3.1 Larvas Suscetíveis ao AgMNPV

O grau de alteração das estruturas do intestino médio das larvas suscetíveis e as respectivas concentrações em mg/g de flavonóides rutina e genístina presentes nos genótipos de soja estão descritos na tabela 3.2.

Tabela 3.2 Avaliação das alterações causadas pela rutina e genístina no intestino médio de larvas suscetíveis (LS) ao nucleopoliedrovírus (AgMNPV) e as concentrações dos flavonóides em mg/g X 10⁻².

Estruturas		Genótipos					
		BRS 257 R: 0 G:0	BR 16 R: 0 G:0,16	Dowling R: 0 G:4,29	PI 229358 R: 2,12 G: 1,36	IAC 100 R:9,72 G: 1,42	PI 227687 R: 36,82 G:1,22
Membrana peritrófica		-	-	-	-	+++	+++
Borda Estriada		-	-	+++	+++	+	+
Células	Porção Apical	-	+++	+++	+++	+++	++
Colunares	Porção Média	-	+++	+++	+++	+	+++
	Porção Basal	-	+	++	+	+++	+++
	Protusões	-	+++	+++	+++	+++	+++
Células Caliciformes		-	++	+++	++	++	+++
Células Regenerativas		-	++	+++	-	-	+++
Camada Muscular		-	-	+	+++	+++	-

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

O IM das LS tratadas com o genótipo BR 16 ($G = 0,16 \times 10^{-2}$ mg/g; D_{1G}, considerada a dose 1 ou inicial de genístina) em comparação ao genótipo BRS 257, mostrou, alterações fortes, na camada epitelial, notadamente nas células colunares, que apresentaram protusões citoplasmáticas sendo liberadas em grande quantidade em direção ao lúmen intestinal. Estas protusões apresentavam conteúdo citoplasmático, além de alguns núcleos celulares. Estas células apresentaram alterações nas diferentes porções citoplasmáticas, sendo que as porções apical e média mostraram intensa vacuolização, com formação de grandes vazios (Figs. 4.1B) enquanto a porção basal apresentou poucos vacúolos.

As células caliciformes aparentemente se mostraram em grande quantidade, às vezes mais altas e mais estreitas com liberação de produto para o lúmen e por vezes volumosas (Fig. 4.1 B); as células regenerativas também se mostraram bastante numerosas.

No tratamento com o genótipo Dowling ($G = 4,29 \times 10^{-2}$ mg/g; $D_{2G} =$ dose de genistina $27X D_1$) o epitélio apresentou fortes alterações nas células colunares, inclusive com comprometimento da borda estriada, dificultando o reconhecimento desta estrutura. A porção apical e média das células colunares apresentaram grande vacuolização. Em alguns pontos do epitélio, pode ser observado o desprendimento, para o lúmen, de células colunares com núcleo (Fig. 4.1C). As células caliciformes mostraram forte alteração, aparentemente mais volumosas e com liberação de conteúdo de cavidade para o lúmen intestinal (Fig. 4.1C), enquanto que as células regenerativas se apresentaram em grande quantidade formando grupos de 3 a 5 células (Fig. 4.1 C). A camada muscular mostrou pequena alteração, sendo aparentemente mais espessa com relação a camada muscular da testemunha.

A membrana peritrófica não apresentou alterações em sua morfologia. Observou-se que o espaço endoperitrófico continha grande quantidade de alimento, porém o espaço ectoperitrófico se encontrava bem afastado do epitélio.

O intestino médio das larvas tratadas com o genótipo PI 229358 ($G = 1,36 \times 10^{-2}$ mg/g; $D_{3G} =$ dose de genistina $8,5 X D_1$) e ($R = 2,12 \times 10^{-2}$ mg/g; $D_{1R} =$ dose inicial de rutina) apresentou alterações no epitélio e camada muscular (Fig. 4.1D).

Dentre os tipos celulares do epitélio, as células colunares foram as mais afetadas, com espessamento da bordadura estriada, intensa vacuolização da porção apical e média e numerosas protusões sendo liberadas para o lúmen intestinal (Figs. 4.1 D). Nessas protusões foram observados fragmentos de citoplasma, com presença ou ausência de núcleo, e em alguns casos, revestidas pela borda estriada (Fig. 4.1D).

As células caliciformes e regenerativas não apresentaram alterações morfológicas porém as células caliciformes foram, observadas em grande quantidade ao longo de todo epitélio do intestino médio (Fig. 4.1 D).

Já a camada muscular mostrou alteração, com internas fragmentação (Fig. 4.1D).

A membrana peritrófica não sofreu danos aparentes, porém o espaço endoperitrófico estava bem reduzido, com pequeno lúmen e ausência de alimento, enquanto que o espaço ectoperitrófico encontrava-se bastante amplo e afastado do epitélio (Fig. 4.1D).

No tratamento IAC 100 ($G = 1,42 \times 10^{-2}$ mg/g; D_{4G} = dose de genistina $8,8 \times D_1$) e ($R = 9,72 \times 10^{-2}$ mg/g; $D_{2R} = 4,6 \times$ dose inicial de rutina) houve alterações em todas as estruturas que constituem a parede do intestino médio.

Nas células colunares observou-se grande quantidade de vacúolos nas porções apical e basal (Figs. 4.1 E), além do descarte de células inteiras para o lúmen (Fig. 4.1 E) com grande quantidade de protusões citoplasmáticas contendo em seu interior e porções de citoplasma, núcleos celulares foram observados. As células caliciformes eram mais túrgidas e apresentavam bordadura acidófila expandida no interior do cálice celular (Fig. 4.1 E).

Não foi possível observar a presença da membrana peritrófica, bem como dos espaços por ela delimitados enquanto que a camada muscular foi evidenciada apenas por pequenos fragmentos .

O tratamento com o genótipo PI 227687 ($G = 1,22 \times 10^{-2}$ mg/g; D_{5G} = dose de genistina $7,6 \times D_1$) e ($R = 2,12 \times 10^{-2}$ mg/g; $D_{3R} = 17,4 \times$ dose inicial de rutina) foi a que promoveu as maiores alterações na camada epitelial. As células colunares apresentaram grande vacuolização em todas as suas porções citoplasmáticas e por vezes os vacúolos formavam grandes vazios celulares. Além disso, estas células apresentaram grande quantidade de protusões contendo citoplasma e núcleo celular. A bordadura estriada aparentemente era mais espessa e de fácil visualização (Fig. 4.1 F).

As células caliciformes mostraram alteração principalmente no seu citoplasma (Fig. 4.1 F) e as células regenerativas eram encontradas em maior quantidade.

Não foi possível a visualização da membrana peritrófica, enquanto que a camada muscular não apresentou alterações.

3.2 Larvas Resistentes ao AgMNPV

O grau de alterações das estruturas do intestino médio das larvas resistentes e as respectivas concentrações expressas em (mg/g) dos flavonóides rutina e genístina presentes no genótipos de soja, estão descritos na tabela 3.3.

Tabela 3.3 Avaliação das alterações causadas pela rutina e genístina no intestino médio de larvas resistentes (LR) ao nucleopoliedrovírus (AgMNPV) e as concentrações dos flavonóides em mg/g x 10⁻².

Estruturas		Genótipos					
		BRS 257 R: 0 G:0	BR 16 R: 0 G:1,6	Dowling R: 0 G:4,29	PI 229358 R: 2,12 G: 1,36	IAC 100 R:9,72 G: 1,42	PI 227687 R: 36,82 G:1,22
Membrana peritrófica		-	-	-	++	-	+++
Células	Borda Estriada	-	-	+++	+++	+++	+
Colunares	Porção Apical	-	+	+++	++	+++	+++
	Porção Média	-	+++	+	+++	+++	+++
	Porção Basal	-	++	+++	+	+	+
	Protusões	-	+++	+++	+++	+++	+++
Células Caliciformes		-	-	+++	+++	++	+++
Células Regenerativas		-	+	-	-	+++	+
Camada Muscular		-	-	-	+++	+++	+++

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

O intestino médio das larvas resistentes tratadas com o genótipo BR 16 mostrou alterações apenas na camada epitelial e somente nas células colunares que apresentaram vacuolizações nas porções média e basal, sendo que a primeira era a mais vacuolizada (Fig. 4.2 B). Foi visualizado grande quantidade de protusões com conteúdo citoplasmático e nuclear.

De modo geral o tratamento com o genótipo Dowling promoveu alterações na camada epitelial, sendo as células colunares a bordadura estriada estava preservada e bem espessa e com liberação de protusões citoplasmáticas em direção ao lúmen intestinal (Figs. 4.2C). As caliciformes estavam aparentemente em maior quantidade quando comparada às larvas tratadas com o genótipo testemunha BRS 257 (Fig. 4.2 C).

No tratamento com o genótipo PI 229358 observou-se grande desorganização em relação à maioria das estruturas analisadas. Dentre as células epiteliais, aparentemente as células regenerativas não mostraram alterações

morfológicas (Fig. 4.2D). As demais células (colunares e caliciformes) por sua vez eram evidenciadas com grandes alterações. As células colunares apresentavam alterações com presença de vacúolos nas três porções, sendo mais vacuolizadas na porção basal e apical. A bordadura estriada era visível, porém desorganizada, com protusões em grande quantidade e contendo citoplasma e núcleos (Fig. 4.2D).

A membrana peritrófica e camada muscular foram observadas, fragmentadas, em toda a extensão do intestino (Fig. 4.2D).

Em LR tratadas com o genótipo IAC 100 as alterações foram percebidas nos três tipos celulares que compõem o epitélio. O que chamou a atenção foram as células caliciformes, por vezes apresentavam-se mais volumosas, com visualização de liberação de conteúdo do cálice para o lúmen intestinal (Figs. 4.2E). As células regenerativas foram observadas individualmente ou em grupos com até 6 células (Fig. 4.2E) e aparentemente aumentadas em tamanho. A membrana peritrófica não sofreu alteração aparente enquanto que a camada muscular mostrou-se bem espessa (Fig. 4.2E).

No tratamento PI 227687 as alterações foram identificadas em todas as camadas que forma o IM, sendo mais intensa na camada epitelial, onde as células colunares se apresentaram bastante alteradas. A vacuolização estava presente em todas as porções, sendo a porção basal menos vacuolizada que as porções apical e média. Estas últimas mostraram grandes vacúolos e vazios celulares principalmente a porção média (Fig. 4.2 F). A bordadura estriada era espessa e suas microvilosidades bem visíveis. As protusões foram encontradas em grande quantidade destacadas no lúmen intestinal e contendo em seu interior citoplasma e núcleos celulares. As células caliciformes apresentavam abertura voltada para o lúmen e com a liberação do seu conteúdo, em algumas situações esse cálice mostrava-se mais volumoso, e as células regenerativas eram numerosas (Fig. 4.2 F). Não foi possível observar a presença da membrana peritrófica, enquanto que a camada muscular estava fragmentada e fina (Figs. 4.2 F).

4. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Figura 4.1 – Fotomicrografias do intestino médio de larvas de *A. gemmatilis* suscetíveis ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE).

A: Tratamento BRS 257 (testemunha): Morfologia geral do IM.

Células colunares (Co) com bordadura em escova (Be); Células caliciformes (Ca); Células regenerativas (Cr); Camada muscular composta de músculo longitudinal (MI) e músculo circular (Mc). Membrana peritrófica (Mp). Barra = 10µm.

B: Tratamento BR 16:

Células colunares (Co) com protusões citoplasmáticas (P) sendo liberadas para o lúmen intestinal, presença de vacúolos citoplasmáticos (V) de vários tamanhos; Células caliciformes (Ca) aparentemente em maior quantidade e mais altas do que a testemunha; Células regenerativas (Cr); Camada muscular (Cm) preservada e membrana peritrófica (Mp). Barras = 10µm

C: Tratamento Dowling:

Células colunares (Co) com aspecto esponjoso e desprendidas para o lúmen; presença de vacúolos citoplasmáticos (v); Células caliciformes (Ca); e grupo de células regenerativas (Cr); camada muscular (Cm) fragmentada. Barra = 100µm.

D (tratamento PI 229358); E (tratamento IAC 100) e F:

(tratamento PI 227687): Células colunares (Co), vacuolizadas (V), com protusões citoplasmáticas (P), com presença de núcleo (n) e bordadura em escova (Be); Células caliciformes (Ca) em grande quantidade; Células regenerativas (Cr); Camada muscular (Cm). Observar no tratamento PI 229358 a presença de membrana peritrófica (Mp); no tratamento IAC 100 presença de células colunares descartadas inteiras para o lúmen (→), no tratamento PI 227687, as células caliciformes (Ca) com alteração citoplasmática presença de secreção (★) e nos tratamentos PI 229358 e IAC 100 camada muscular (Cm) bastante fragmentada. Barras (D e F) = 10µm; (E) = 100 µm.

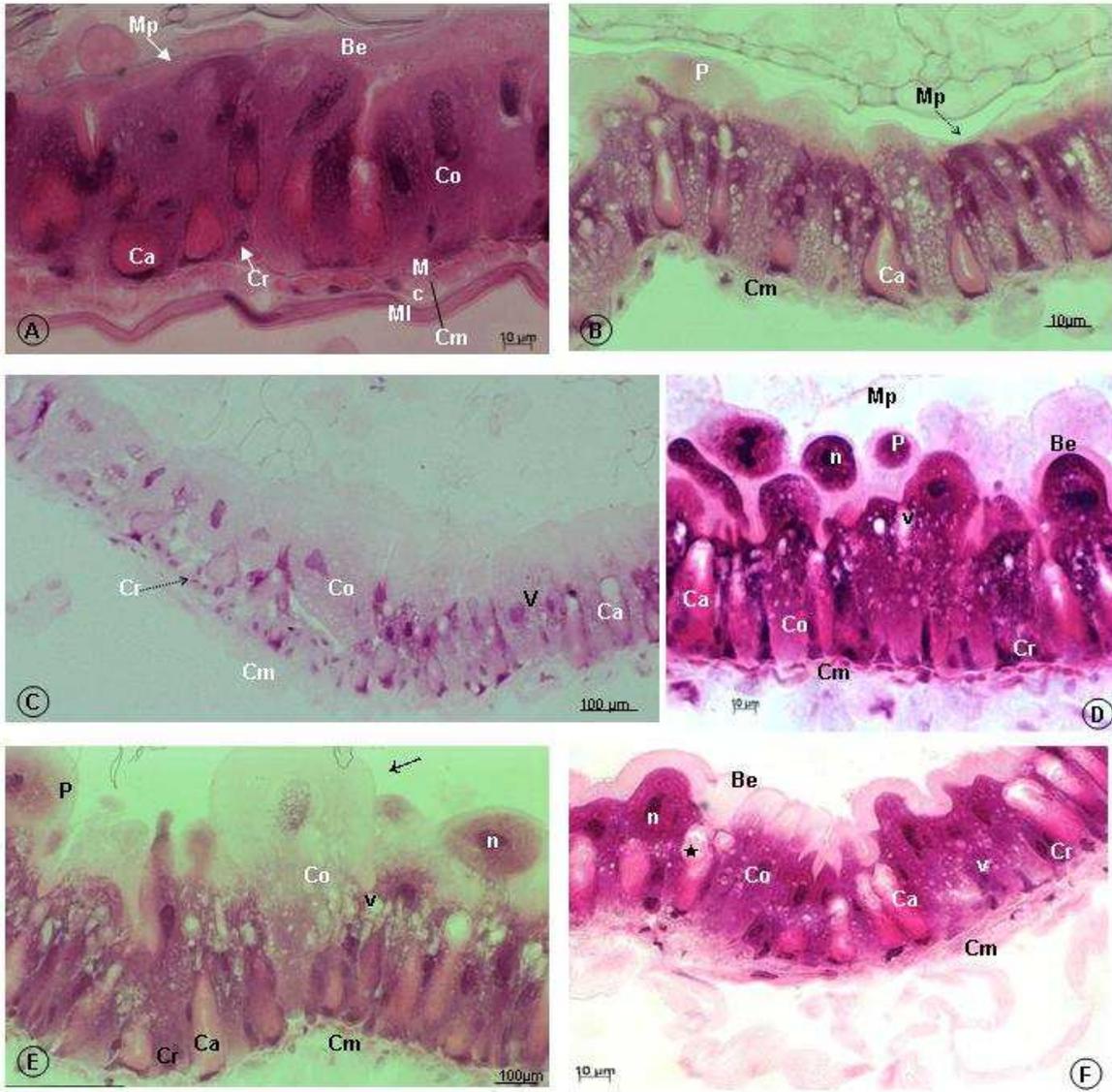
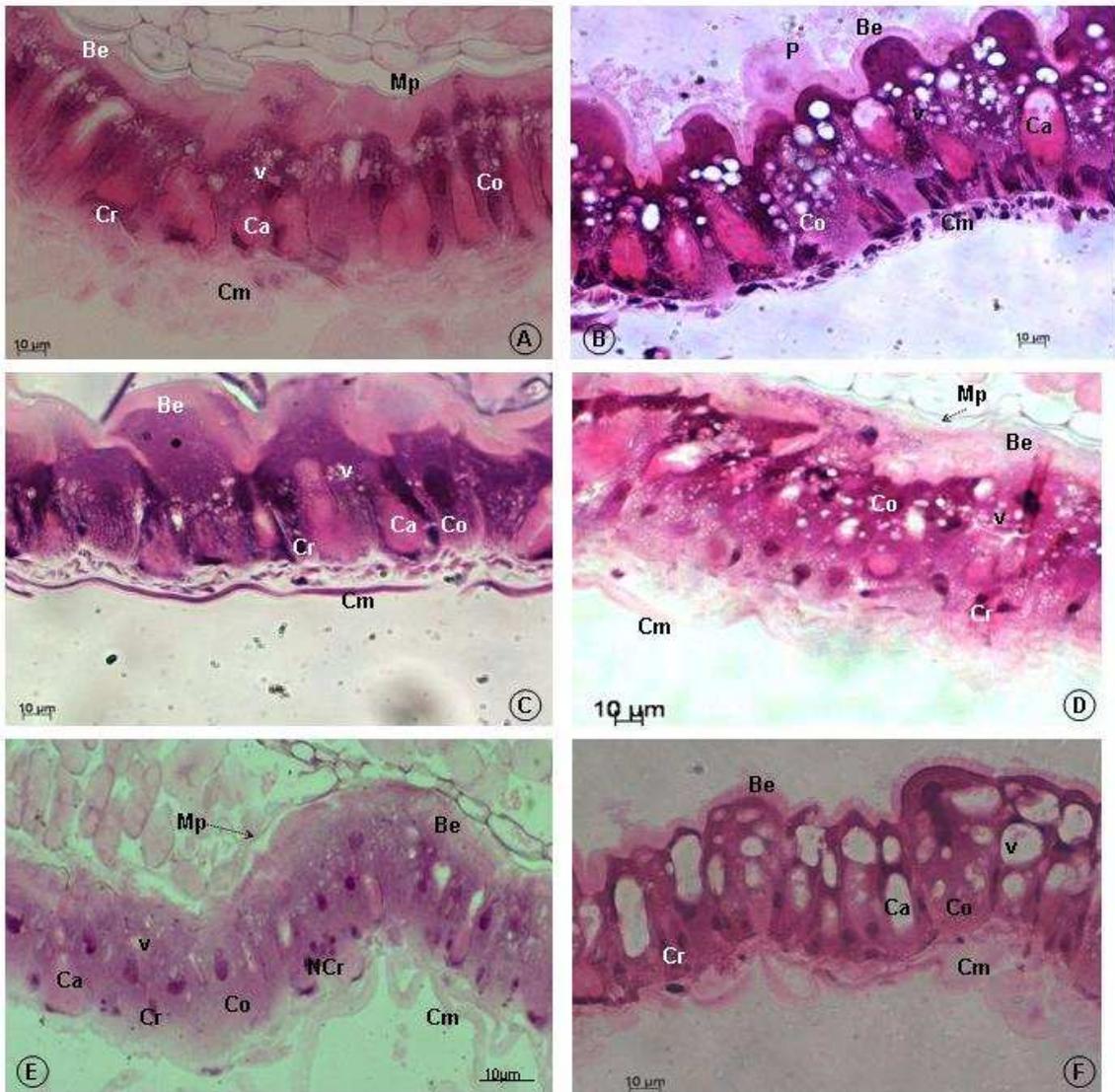


Figura 4.2 - Fotomicrografias do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)

A: Tratamento BRS 257 - Morfologia geral do IM. Células colunares (Co) com vacúolos citoplasmáticos (V) e bordadura em escova (Be); Células caliciformes (Ca); células regenerativas (Cr); Camada muscular (Cm). Membrana peritrófica (Mp), espaço ectoperitrófico (Ec) e espaço endoperitrófico (Ed). Barra = 10µm.

B (tratamento BR 16); C (tratamento Dowling) e D (tratamento PI 229358) – Células colunares (Co) com muitos vacúolos (v); recoberta de bordadura em escova (Be) espessa; protusões citoplasmáticas (P) e com núcleo celular (n); células caliciformes (Ca); células regenerativas (Cr); e camada muscular (Cm). Notar no tratamento PI 229358 presença de fragmentos de membrana peritrófica (Mp). Barra = 10µm.

E (tratamento IAC 100) e F (tratamento PI 227687) – Células colunares (Co) com vacúolos citoplasmáticos (V); recoberta com bordadura em escova (Be) e liberação de protusões citoplasmáticas (P) com núcleo celular (n); Células caliciformes (Ca) volumosas; Camada muscular (Cm) espessa. Observar no tratamento IAC 100 a presença dos ninhos de células regenerativas (Ncr) e da membrana peritrófica (Mp). Barras = 10µm.



5. DISCUSSÃO

No tratamento com o genótipo testemunha BRS 257 (G=0 e R=0), o intestino médio das larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV apresentou morfologia semelhante às descritas na literatura. O intestino médio era formado por um epitélio pseudoestratificado prismático, com bordadura estriada e composto por três tipos celulares distintos: as células colunares, caliciformes e regenerativas. Esta camada epitelial era revestida por uma estrutura acelular, a membrana peritrófica que separava o epitélio do conteúdo intestinal e dividia o lúmen em dois espaços, o ectoperitrófico e o endoperitrófico. Abaixo da camada epitelial, sustentando toda essa arquitetura e separando o tubo digestivo do restante da hemocele, encontrava-se a camada muscular, composta por dois tipos de músculos: os longitudinais e os circulares. Esta arquitetura do órgão é igual às descritas para a maioria dos lepidópteros por vários autores (EISEMANN; BINNINGTON, 1994; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; GALLO et al., 2002; LEVY 2000; 2004; LEVY et al., 2005; LEHANE 2006; SALVADOR 2008; SOUSA et al., 2009).

Nossos resultados mostraram que as duas populações larvais, tanto suscetíveis quanto resistentes ao AgMNPV, alimentadas com as folhas dos genótipos BR 16, Dowling, PI229358, IAC 100 e PI 227687, que apresentavam em sua composição o flavonóide rutina e/ou o isoflavonóide genistina mostraram alterações morfológicas no intestino médio, variando em intensidade, de acordo com a concentração desses compostos. Essas alterações, embora pontuais, eram bastante observáveis e bem distintas variando desde a presença de pequenos vacúolos entre as células colunares; aumento de protusões citoplasmáticas que continham conteúdo celular em seu interior e até o desprendimento total de células inteiras para o lúmen intestinal.

Sabe-se que em um ataque de patógenos ou substâncias químicas toda a estrutura do intestino médio sofre alterações em sua morfologia; fisiologia e metabolismo, resultando em fragilidades que não propiciarão à lagarta completar o seu ciclo de desenvolvimento, e as vezes até causar a morte da mesma (FUGI et al., 2005; SALVADOR, 2008).

As maiores alterações foram observadas na camada epitelial do IM

tanto das LS quanto das LR e dentre os tipos celulares que formam o epitélio o que sofreu forte alteração foi a célula colunar. Estas alterações foram observadas nas protusões celulares e nas regiões apical e média destas células nos dois tipos larvais tratadas com todos os genótipos (BR16, Dowling, PI229358, IAC 100 e PI 227687). Inclusive o genótipo BR16, que foi considerado por Piubelli et al (2005), como suscetível às lagartas por não conter rutina e baixa concentração de genistina, mostrou capacidade de alterar o epitélio.

Os dois tipos larvais tratados com os diferentes genótipos mostraram nas células colunares intensa vacuolização citoplasmática presença de “vazios citoplasmáticos” e liberação de protusões citoplasmáticas sem e com conteúdo celular, principalmente núcleos, em direção ao espaço ectoperitrófico. Esses fatos foram semelhantes aos descritos por Rharrabe et al. (2007) que estudando a ação dos aleloquímicos (alcalóide) beta-carbolinas de *Peganum harmala* (arruda da síria), observaram efeitos citotóxicos nas células epiteliais do intestino médio de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) e que estas células apresentaram vazios citoplasmáticos, intensa vacuolização e liberação de protusões citoplasmáticas.

Salvador (2008) verificou os efeitos do flavonóide rutina e do isoflavonóide genistina em larvas de quarto instar de *A. gemmatilis* alimentadas com dieta artificial e com os genótipos de soja: BR16, PI 227687, IAC 100, PI 274454 e Dowling. Embora a autora tenha utilizado concentração dos dois componentes químicos maior que as concentrações utilizadas neste nosso trabalho (podendo chegar até 10 X), relatou alterações semelhantes às observadas por nós para as células colunares em larvas suscetíveis ao AgMNPV.

Estudos realizados por Arruda et al. (2008) em larvas de *Aedes aegypti* (Díptera), tratadas com extrato de *Magonia pubescens*, conhecida popularmente como tingui, árvore de ocorrência em áreas de cerrado, mostraram que este extrato provocou grandes alterações no intestino médio das larvas testadas, com intensa vacuolização e vazios citoplasmáticos nas células. Silva et al. (2004) descreveram os efeitos larvicidas de taninos isolados do tingui sobre *A. aegypti*, enquanto que estudos realizados por Rey; Pautou; Meyran (1999) através de cortes histológicos mostraram o efeito tóxico do ácido tânico, um tanino natural hidrolisável, sobre o epitélio do intestino médio de larvas de dípteros. Outros autores como Pautou et al. (2000), após avaliarem os efeitos tóxicos de taninos sobre a fauna associada aos culicídeos, sugeriram que os taninos vegetais podem ser úteis

como complementos em programas de controle de espécies de mosquitos.

Segundo Appel (1994) essas alterações podem estar associadas com o processo de ativação de compostos fenólicos através da oxidação, que formam radicais de hidroxila livres e que possuem ação tóxica, sendo responsáveis pela ruptura da integridade da membrana e por causar distúrbios do metabolismo no epitélio intestinal dos insetos. Entretanto as alterações que ocorrem nas células colunares não são causadas apenas pelos aleloquímicos e podem ser desencadeadas também por outros agentes como relatado por Kakamand et al. (2008) que estudaram os efeitos causados por três inseticidas químicos no intestino médio em *Aphis mellifera*, e observaram que as células colunares apresentaram alterações semelhantes às descritas neste trabalho. Levy (2005) notou que as células colunares do intestino médio de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV apresentaram alterações em sua estrutura após a infecção por vírus.

Além da intensa vacuolização e dos vazios citoplasmáticos observados nas células colunares, alguns tratamentos como Dowling e IAC 100 em larvas suscetíveis apresentaram descarte total das células colunares para o lúmen intestinal. Este fato pode estar associado principalmente ao processo de renovação celular, onde as células alteradas ou danificadas são descartadas para o lúmen intestinal (BROOKS et al., 2002; KAKAMAND et al., 2008) e que aqui pode estar correlacionado com o mecanismo de defesa do inseto contra seu agente agressor, no caso alta concentração de genistina presente no genótipo Dowling ($4,29 \times 10^{-2}$ mg/g) e no tratamento com o genótipo IAC 100, do efeito sinérgico dos flavonóides rutina e genistina ($R= 9,72 \times 10^{-2}$ mg/g e $G= 1,42 \times 10^{-2}$ mg/g).

A formação de protusões citoplasmáticas sendo liberadas do epitélio foi evidenciada em todos os tratamentos em ambas as populações larvais e pode ser considerada como um processo fisiológico normal de renovação epitelial. O que nos chamou a atenção foi o aumento destas protusões conforme variação na concentração de genistina e rutina presentes nos genótipos. No tratamento BRS 257 eram evidenciadas poucas protusões citoplasmáticas formadas ou sendo liberadas em direção ao lúmen intestinal, tanto em larvas suscetíveis como em larvas resistentes ao AgMNPV, enquanto que nos tratamentos com os outros genótipos, mesmo aqueles com a menor dosagem de rutina e/ou genistina, ou ainda com ausência da rutina, como é o caso dos genótipos BR16 e Dowling, observou-se protusões em grande quantidade, em igual resposta de alteração para os dois tipos

larvais.

As protusões citoplasmáticas ainda não têm a sua função bem definida, porém segundo Anderson e Harvey (1966) essas protusões podem estar associadas às células colunares sendo então relacionadas com o processo de secreção apócrina. Segundo De Priester (1971), essas protusões podem estar envolvidas no processo de degeneração celular que ocorre durante a muda ou ecdise e na metamorfose dos insetos, conforme observado em *Calliphora erythrocephala*. Além dessas características, o processo de formação de protusões pode ser relacionado à ação de microrganismos ou da ingestão de produtos nocivos, onde as células epiteliais buscam esse processo de formação para “eliminar ou expulsar” estes agentes do interior das células (BROOKS et al., 2002). Segundo Martoja e Ballan-Dufrançais (1984) este processo foi caracterizado ultraestruturalmente pela vesiculação do retículo endoplasmático rugoso, desaparecimento do Complexo de Golgi, aumento do número e volume dos vacúolos autofágicos e também rarefação do citoplasma.

Esse processo de formação e expulsão de protusões pode ser observado por vários autores em diversas espécies de insetos como em *Helicoverpa armigera* (BROOKS et al., 2002); *Aedes aegypti* (ARRUDA et al., 2003); *Apis mellifera* (KAKAMAND et al., 2006); *Plodia interpunctella* (RHARRABE et al., 2007); *Spodoptera frugiperda* (CORREIA et al., 2009); *Alabama argilacea* (SOUSA et al., 2009).

A análise pontual das alterações apresentadas pelos diferentes genótipos mostra que as células colunares em ambas as populações larvais, tanto suscetível quanto resistente ao AgMNPV, quando são consideradas as suas regiões citoplasmáticas observamos que as maiores alterações, estão relacionadas com as regiões apical e média, enquanto que a região basal, só apresentou forte alteração quando tratada com o genótipo Dowling, que apresenta em sua constituição apenas o isoflavonóide genistina, mas em alta concentração, ou seja, em uma concentração de 27 vezes a concentração inicial de genistina.

Poucos foram os trabalhos que descreveram os efeitos da concentração de genistina em células ou tecidos, como os de Dang, 2009, que abordou os efeitos sobre os adipócitos e influência na obesidade e de DI et al., (2008) que trabalharam com a microscopia de luz para determinar os efeitos da genistina na morfologia celular e também fizeram uso de ensaio calorimétrico e antígeno de proliferação celular (PCNA imunocitoquímica); citometria de fluxo (para

quantificar células em fase S e em apoptose); ensaio fluorométrico e microscopia confocal para detetar atividade de caspase-3 e apoptóticas, respectivamente. Observaram que a genistina em baixa concentração (1 mg/mL) estimulou a proliferação em um tipo celular (células UtLM), o aumento da marcação PCNA e o percentual de células em fase S e em concentrações superiores (10 mg/mL) prejudicou a morfologia, inibiu significativamente a proliferação, diminuição PCNA rotulagem, aumentou a atividade da caspase-3 e a indução de apoptose em todos os tipos celulares e concluíram que os efeitos da genistina são dependentes da sua concentração.

Outro ponto focal que se mostrou alterado foi a borda estriada das células colunares que apresentou forte grau de degeneração nos tratamentos Dowling, PI 229358 e IAC 100 nas larvas resistentes ao AgMNPV, enquanto que nas larvas suscetíveis somente os genótipos Dowling e PI 229358 apresentaram esta mesma alteração.

A borda ou bordadura estriada das células colunares apresenta microvilosidades com a presença de glicocálice e como as células colunares apresentam alterações nas regiões apical e média e estas são as regiões que contém preferencialmente organelas como retículo endoplasmático rugoso, lisossomas, vesícula de pinocitose, elementos do citoesqueleto, complexo de Golgi, mitocôndrias e grânulos de secreção (LEVY, 2005) tudo isto se reflete também na estrutura das microvilosidades, alterando-as e também alterando o revestimento glicoprotéico do glicocálice, fazendo-o perder a própria capacidade de adesão e reconhecimento. Esta perda funcional das microvilosidades e também do glicocálice pode interferir na adesão dos vírus AgMNPV, uma vez que os vírions atravessam a membrana peritrófica, considerada a primeira barreira de proteção contra ação de patógenos, através de seus poros, se fundem às membranas das células epiteliais do intestino médio, após um reconhecimento de receptores específicos, iniciando o ciclo de replicação (FLIPSEN et al. 1995, BARRET et al. 1998), nas células colunares e transmitindo a infecção para outros tecidos (FLIPSEN et al., 1995; VOLKMAN, 1997; CASTRO et al., 1999; MOSCARDI; SOUZA, 2002). Estes fatos da desorganização das microvilosidades, da provável alteração na produção de glicoproteínas do glicocálice, devido até às próprias alterações da região apical e média da células colunares, com comprometimento estrutural e funcional das organelas, conforme relatado por Martoja e Ballan-Dufrançais (1984) levam-nos a

crer que possivelmente eles quebrariam a resistência da lagarta ao seu controle biológico, o vírus AgMNPV, permitindo que o vírus penetre nas suas células e dêem continuidade ao processo de replicação viral.

Embora as células caliciformes do intestino médio de larvas suscetíveis e resistentes, não tenham mostrado grandes alterações morfológicas com relação à ingestão dos diferentes genótipos, observamos algumas alterações em relação à turgência da câmara e também com relação à quantidade de células, pois estas aparentemente se encontram hipertrófica, com ligeiro aumento do volume celular e talvez aumento na quantidade de células, entretanto estes dados carecem de análise morfométrica e histométrica que possam corroborar nossas observações visuais. Estas alterações foram observadas tanto nas larvas suscetíveis como nas larvas resistentes alimentadas com os genótipos Dowling e PI 227687, que apresentaram a maior concentração de genistina e rutina, respectivamente.

Quanto às células regenerativas descrevemos como fortes as alterações observadas no intestino médio de larvas suscetíveis alimentadas com os genótipos Dowling e PI 227687 e nas larvas resistentes alimentadas com o genótipo IAC 100. Na verdade o que nos chamou a atenção foi o fato de estas células estarem aparentemente aumentada em números em relação aos controles de cada tipo larval. Entretanto estudos morfométricos se fazem necessários para avaliação mais crítica. As células regenerativas dos genótipos Dowling em larvas suscetíveis e IAC 100 em larvas resistentes apresentaram grandes grupos de células, os chamados “ninhos de células regenerativas”. Estes ninhos de células regenerativas estão relacionados ao processo de renovação epitelial, no qual consiste na substituição de células eliminadas por outras desenvolvidas a partir desses ninhos (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999).

Esse fato pode ser observado em *Melipona quadrifasciata anthidioides*, no qual esses ninhos foram localizados na base do epitélio do intestino médio de abelhas rainhas e rainhas fisogástricas, (FRANÇA et al., 2006); e em *Atelura fórmica* onde foram encontrados cerca de 26 a 30 ninhos de células regenerativas, onde algumas eram encontradas em diferenciação celular (ROST-ROSKOWSKA; VILIMOVA; CHAJEC; 2010).

As larvas suscetíveis tratadas com os genótipos BR 16 mostraram moderada alteração e as larvas resistentes tratadas com genótipo BR 16 e PI

227687 apresentaram discreto aumento do número de células regenerativas. Neste caso chama-nos atenção mais uma vez, as diferenças de concentração da genistina, que no mínimo de sua concentração testada, promoveu alterações e talvez indução de multiplicação nestas células voltadas para a sua função de reposição celular. Esse fato foi observado em *Aedes aegypti* por Arruda et al (2003), que verificaram esse aumento destas células. Cruz-Landim et al (1996) relaciona o fato com a duração do ciclo biológico do inseto, onde em ciclos mais longos estas células são encontradas em pequenas quantidades, mas quando o ciclo é curto as células regenerativas são encontradas em quantidades superiores.

A membrana peritrófica somente sofreu alterações em sua morfologia, tanto nas larvas suscetíveis quanto nas larvas resistentes, em dois tratamentos. As suscetíveis sofreram alterações na membrana peritrófica quando alimentadas com os genótipos IAC 100 e PI 227687 (maior concentração de rutina). Na verdade não foi possível observar a presença da membrana, o que foi considerado por nós como sendo um indicativo de forte alteração. Nas larvas resistentes ao AgMNPV a membrana apresentou moderada alteração para o genótipo PI 227687 estando bastante fragmentada, enquanto que para o genótipo PI 229358 como não observamos nem vestígios da membrana peritrófica, consideramos como grau máximo da alteração ou seja, como forte alteração. Nossos resultados são parcialmente concordantes com os resultados obtidos por Salvador (2008), que relatou que a membrana peritrófica não foi alterada em nenhum tratamento e justificou que a integridade da membrana peritrófica está provavelmente relacionada à ausência de lipídios em sua constituição, uma vez que ação dos flavonóides, principalmente da rutina está associado ao metabolismo de lipídios (LIMA et al., 2003; PIUBELLI, 2004).

Com relação aos tratamentos que apresentaram alteração na membrana peritrófica, este fato pode estar associado com a desorganização que as células colunares sofreram no seu citoplasma, o que impede a produção e a liberação dos produtos secretados, bem como a qualidade do produto a ser utilizado e neste caso, lembramos que os componentes secretados para a formação da membrana peritrófica são produzidos pelas células calciformes. Além disso, a intensa liberação de protusões citoplasmáticas com conteúdo celular pode impedir a organização da membrana da forma estrutural como ela necessita ser para desempenhar a sua função.

A camada muscular que reveste externamente o tubo digestivo, inserindo - o e fixando-o na hemocele, também apresentou alterações tanto para as larvas suscetíveis quanto para as resistentes tratadas com os genótipos PI 229358, IAC 100 e PI 227687, e os prejuízos foram considerados intensos, uma vez que mesmo pontualmente, as camadas estavam desorganizadas e fragmentadas, afetando, portanto, todo o equilíbrio organizacional do tubo digestivo nestas localizações, bem como as trocas metabólicas com a hemolinfa e os outros órgãos, como corpo gorduroso, gerando um fato comprometedor para a integridade funcional do intestino médio dos insetos testados podendo levá-los a não continuidade de ciclo e até a morte.

Dessa forma os resultados apresentados mostram que todos os genótipos causaram alterações em ambas as populações larvais sugerem que os efeitos causados pelo flavonóide (rutina) em conjunto com o isoflavonóide genistina promovem grandes alterações morfológicas no intestino médio em ambas as populações larvais de *A. gemmatalis*, e que também o isoflavonóide genistina provoca isoladamente alterações no intestino médio.

6. CONCLUSÕES

O intestino médio das larvas de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, apresentou grandes alterações morfológicas nas células da camada epitelial, para todos os tratamentos. Estas alterações foram pontuais, e ocorreram principalmente nas células colunares, que apresentaram intensa vacuolização citoplasmática, presença de vazios citoplasmáticos e, aumento nas protusões liberadas em direção ao lúmen, por vezes contendo núcleos celulares. Alterações também foram observadas na membrana peritrófica e na camada muscular para alguns genótipos, todos contendo rutina e genistina em sua composição química foliar.

De modo geral, todos os tratamentos promoveram alterações no intestino médio, com maior ou menor intensidade de acordo com o tecido. Ressaltamos que os genótipos que promoveram maiores alterações em larvas suscetíveis foi o PI 227687, e em larvas resistentes os genótipos responsáveis pelas

maiores alterações foram IAC 100 e PI 227687.

Dessa forma, esses genótipos principalmente a 227687 podem ser recomendados para plantio, pois apresentam características de resistência às larvas de *A. gemmatalis*, bem como podem promover a quebra da resistência das lagartas da soja ao seu controle biológico, o múltiplo nucleopoliedrovírus *Anticarsia gemmatalis* (Ag MNPV).

7. REFERÊNCIAS

- ABOT, A.R.; et al. Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. **Biological Control**, v.7, n. 1, p.126-130, ago. 1996.
- ANDERSON, E; HARVEY, W. Active transport by cercopia midgut. **The journal of Cell Biology**. V.31,n.1, p.107-134, out. 1966
- APPEL, H.M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, n.7, p.1521-1551, jul.1993.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA,G.M.; SILVA, I.G. Estudo ultraestrutural do efeito da toxicidade do extrato da *Magonia pubescens* (ST.HILL) no mesêntero de larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Díptera: Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**, v.37, n.3, p.255-267, jul.-set. 2008.
- BARRET,J.W. et al. Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus. **Tissue & Cell**, [S.I.] v.30, p.602-616, 1998.
- BILLINGSLEY, P.F.; LEHANE, M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: LEHANE, M.J., BILLINGSLEY, P.F. (Eds). **Biology of the Insect Midgut**. Londres: Chapman & Hall, 1996, p.3-30.
- BROOKS, M.E. et al. Infection of its lepidopteran host by the *Helicoverpa armigera stunt virus* (Tetraviridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p.97-111, 2002
- CERRI, P., SASSO-CERRI, E. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. **Micron**, v.34, n.8, p.365, 2003.
- CASTRO, M.E.B. et al. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n. 10, p. 1733-1761, out. 1999.
- CAVALCANTE, V.M.; CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. **Naturalia**, Rio Claro, v.24, p. 19-40, 1999.
- CHAPMAN, R.F. **The Insects: structure and function**. 4.ed. Cambridge: Harvard University Press, 1998
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Indicadores da Agropecuária**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/IA-agos09.pdf> . Acesso em 06 de outubro de 2009.
- CORREIA, A.A.et al. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. **Neotropical Entomology**, Vacaria, v.38, n.1, p.83-91, jan-fev. 2009.

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

DANG, Z.C Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action. **Obesity Reviews**, v.10, n. 3, 342-349, 2009.

DEGRANDE, P.E.; VIVAN, L.M. Pragas da Soja. In: _____ **Boletim de Pesquisa da Soja**. Rondonópolis: Fundação MT, 2006. p.153-169.

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

DI, et al. A low concentration of genistein induces estrogen receptor-alpha and insulin-like growth factor-I receptor interactions and proliferation in uterine leiomyoma cells. **Human Reproduction**, [s.l.], v.23, n.8, p.1873-1883, maio, 2008.

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

EMBRAPA. **Sistemas de Produção: Tecnologia e produção de soja na região central do Brasil 2006**. 1.ed. Londrina:Embrapa-CNPSo, 2005.

FELTON, G.W. et al. Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, California, v.15, n.12, p.2667-2694, 1989.

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

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

FRANÇA, A.A.P. et al. Regenerative cells in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae Melliponini): A comparative study of workers and queens. **Brazilian Journal Morphological Science**, v.23, n. 3-4, p.401-404, 2006.

FUGI, C.G.Q.; et al. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.62, n.1, p.31-35, jan./fev. 2005.

GALLO, D.; et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v.10.

GAZZONI, D.L. HÜLSMEYER, A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Efeito de diferentes doses de rutina e de quercetina na biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818

- (Lep., Noctuidae). **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.7, p. 673-681, jun./jul. 1997.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B. et al. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 1985, 23p.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; et al. Mecanismos de resistência de genótipos de soja: teste de não-preferência para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep.:Noctuidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p. 513-519, abr. 1994.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. Dissertation (Doutorado em Botânica) - 165 p. The University of Reading, Reading.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; et al. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2000.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; et al. Pre-ingestive and and post-ingestive effects of soybean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdã, v.98, n.2, p.181-194, fev. 2001.
- KAKAMAND, F.A.K.H.; MAHMOUD, T.T.; AMIN, A.B.B. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. **Journal Dohuk University**, Kurdistan v.11, n.1, p. 144-151, maio. 2008
- KUBO, I.; HANKE, F.G. Chemical methods for isolating and identifying phytochemicals biologically active in insects. In: MILLER, J.R.; MILLER, T.A. (Eds) **Insects plants interactions**. New York: Springer Verlag. 1986 p.225-249.
- LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, 1991.
- LEVY, S.M. et al. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biopogy**, São Paulo, v.64, n. 3b, p.1-6, ago. 2004.
- LEVY, S.M. et al. Morfologia do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*, susceptível e resistente ao vírus da poliedrose nuclear (AgMNPV), em larvas controle e infectadas pelo vírus. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., 2005, Recife. **Resumos...** Recife: FIOCRUZ, 2005. p.188.
- LIMA, L.R.P. et al. Toxicidade aguda de rutina e bixina de *Bixa orellana*. **Acta Farm Bornaerense**, v.22, n.1, p.21-26, 2003.
- LIMA, L.R.P. et al. Determinação da atividade de lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina. **Revista de Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 626-631, jul./set. 1999.
- LOPES, R.M. et al. Efeito de diferentes doses de rutina sobre as concentrações de

albumina, creatina, uréia e ácido úrico no soro de coelhos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 86, n.1, p. 35-38, jan. 2005.

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

MOSCARDI, F.; CARVALHO, R.C.Z. Consumo e utilização de soja por *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) infectada, em diferentes estádios larvais, por seu vírus de poliedrose nuclear. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.22, n.2, p.267-280, jun.1993.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. **Annual Review Entomology**, v.44, p.257-289, 1999.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. de. Baculovirus para o controle de pragas. **Biociência**, n.24, p. 22-29, jan./fev. 2002

OMYILAGHA, J.C.; GROTEWOLD, E. The biology and structural distribution of surface flavonoids. **Recent Research developments in plant science**, Columbus Ohio, v.2, p. 53-71, 2004.

PAUTOU MP. et al. Toxicity of vegetable tannins on crustaceae associated with Alpine mosquito breeding sites. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p.323-332, 2000.

PIUBELLI, G.C. **Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Entomologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 152p.

PIUBELLI, G.C. et al. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? **Journal of Chemical Ecology**, California, v.31, n.7, p.1509-1525, jul. 2005.

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

RHARRABAE, K et al. Bioinsecticidal effect of hamaline on *Plodia interpunctella* development (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.89, p. 137-145, maio 2007

ROST-ROSZKOWSKA, M.M.; VILIMOVA, J.; CHAJEC, L. Fine structure of the midgut epithelium of *Atelura formicaria* (Hexapoda: Zygantoma: Ateluridae), with special reference to its regeneration and degeneration. **Zoological Studies**, v. 49, n.1, p. 10-18, 2010.

SALVADOR, M.C. **Efeito de genótipos de soja e de flavonóides na biologia e no intestino médio de *Anticarsia gemmatalis***. 2008. Dissertação (Mestrado em

Entomologia Agrícola). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal.

SILVA, H.H.G.S. et al. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.37, n.5, p. 396-399, set./out. 2004

SILVA, R.R. et al. Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.51, n.3, p. 258-264, abr. 2001

SILVA, R.R. et al. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, Ribeirão preto, v.35, p. 127-133, abr./jun. 2002.

SOSA-GÓMEZ, D.R. et al. **Manual de Identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2006.

SOUSA, M.E. et al. Ultrastructure of the *Alabama argilacea* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) midgut. **Micron**, v.40, p.743-749, 2009

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

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. A digestão dos insetos. **Ciência Hoje**, v.12, p.28-38, 1991.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.47, n. 2, p.47-61, jun. 2001.

TOLEDO, T., et al., Effects of different rutin dosages on chloride, calcium and phosphorus levels serum of rabbits. **Revista Chilena de Nutrición**, v.30,n.3, p.263-270, dez. 2003.

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

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

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

4. ARTIGO 2 EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO COM GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES A INSETOS NA SUPERFÍCIE EPITELIAL DO INTESTINO MÉDIO DE LAGARTAS DA SOJA SUSCETÍVEL E RESISTENTE AO VÍRUS DA POLIEDROSE NUCLEAR AgMNPV. ESTUDO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

RESUMO

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* é uma das principais pragas da soja e responsável por perdas na produção final de grãos. O seu controle é realizado pela aplicação de inseticidas biológicos como o nucleopoliedrovírus AgMNPV e cultivares ou plantas resistentes que evitam causar danos ao ambiente. O uso de plantas resistentes causa alterações fisiológicas negativas nos insetos, pela presença de substâncias químicas como os aleloquímicos, como os flavonóides (rutina e genistina). O ação dos agentes patogênicos como o AgMNPV e dos flavonóides se processa no intestino médio (IM) que é a principal via de acesso dessas substâncias. O objetivo deste estudo foi verificar as alterações morfológicas na superfície das células epiteliais do IM causadas pela ingestão da rutina (R) e genistina (G), no máximo de suas concentrações, em larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV. Estas larvas eram provenientes da Embrapa Soja/LondrinaPR e foram tratadas com genótipos de soja “in natura” contendo rutina e genistina: BRS 257 (testemunha); Dowling (G= 0,0429) e PI 227687 (R=0,3682 e G= 0,0122mg/g). Os IM das larvas de 4^o ínstar foram fixados, processados e analisados ao microscópio eletrônico de varredura. As larvas suscetíveis e resistentes tratadas com o genótipo testemunha apresentaram superfície das células colunares sem alterações morfológicas, entretanto nos tratamentos com genótipo Dowling e PI227687 as alterações foram evidenciadas tanto nas microvilosidades quanto nas protusões citoplasmáticas em ambas as populações larvais. Observou-se grande concentração de protusões citoplasmáticas com forma e tamanhos variados liberadas em direção ao lúmen intestinal. Essas protusões foram mais intensas no tratamento PI 227687, tanto em larvas suscetíveis como resistentes em comparação com o tratamento Dowling. Com relação a quantidade de protusões liberadas entre os dois tipos de larvas, as resistentes apresentaram maior quantidade quando comparada às larvas suscetíveis.

Palavras Chave: lagarta da soja, células colunares, protusões, flavonóides, resistência, rutina, genistina

4.ARTICLE 2 EFFECTS OF FEDDING SOYBEANS GENOTYPES RESISTANT TO INSECTS ON THE SURFACE OF THE EPITHELIAL MIDGUT VELVETBEAN CATERPILLAR SUSCEPTIBLE AND RESISTANT TO VIRUS NUCLEAR POLYHEDROSIS AgMNPV. STUDY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

ABSTRACT

The velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* is a pest of soybean and responsible for losses in the final grain production. Its control is accomplished by the application of biological insecticides such as nucleopolyhedrovirus AgMNPV and cultivars or resistant plants that prevent damage to the environment. The use of resistant plants caused negative physiological changes in insects, the presence of chemicals such as allelochemicals such as flavonoids (rutin and genistin). The action of pathogens such as flavonoids AgMNPV and takes place in the midgut (IM) which is the main route of entry of such substances. The objective of this study was to assess the morphological changes in the surface of epithelial cells of IM caused by ingestion of rutin (R) and genistein (G), the maximum concentrations in larvae of *A. gemmatalis* susceptible and resistant to AgMNPV. These larvae were from Embrapa Soja / LondrinaPR and were treated with soybean genotypes in natura rutin and genistin: BRS 257 (control) and Dowling (G = 0.0429) and PI 227687 (R = 0.3682 and G = 0.0122 mg/g). The IM of the larvae of 4th instar were fixed, processed and analyzed by scanning electron microscope. The susceptible and resistant larvae treated with the control genotype showed surface of columnar cells without morphological changes, however the treatments with Dowling and PI227687 genotype changes were observed in both the microvilli and cytoplasmic protrusions in two larval populations. Observed high concentration protrusions in the shape and sizes released into the intestinal lumen. These protrusions were more intense in the treatment PI 227687, both susceptible and resistant larvae compared with the treatment Dowling. Regarding the amount of protrusions released between the two types of larvae, were more resistant when compared to the amount susceptible larvae.

Key-words: velvetbean caterpillar, columnar cells, protrusions, flavonoids, resistance, rutin, genistin

1. INTRODUÇÃO

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada uma das principais pragas desfolhadoras da cultura da soja no Brasil, sendo o seu comportamento e a sua biologia bastante estudados (MOSCARDI; CARVALHO, 1993; HOFFMAN et al., 2006, MENDONÇA et al., 2009).

Visando reduzir os custos de produção e os impactos ambientais desfavoráveis, no Brasil grandes esforços têm sido feitos para desenvolver métodos de controle da *A. gemmatalis* e outros insetos-pragas da soja. O bioinseticida a base do vírus AgMNPV (*Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus) específico para esta praga, tem sido empregado como controle biológico desde a década de 80 (MOSCARDI; CARVALHO, 1993; MOSCARDI, 1999; ABOT et al., 1996). A infecção pelo AgMNPV inicia quando as lagartas ingerem os poliedros virais juntos das folhas de soja; os vírions são liberados no lúmen alcalino do intestino médio, ultrapassam a membrana peritrófica e se fundem com a membrana das células epiteliais, após um reconhecimento de receptores específicos, iniciando o ciclo de replicação (FLIPSEN et al., 1995). Outra técnica alternativa bastante recomendável é a utilização de resistência de plantas, que apresenta entre outras vantagens, praticidade de uso e segurança (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001).

A resistência de plantas a insetos é devida principalmente a agentes químicos, isto é, de substâncias (aleloquímicos) presentes nas plantas hospedeiras, tais como alcalóides, flavonóides, terpenóides e esteróides (KUBO e HANKE, 1986). Embora a importância química dessas substâncias seja reconhecida desde início dos anos 50, somente há pouco tempo sua utilização tem sido considerada, sendo ainda pouco estudada (KOGAN, 1986).

No teste de preferência alimentar com *A. gemmatalis*, os genótipos BR82-12547, IAC74-2832, PI 227687, PI 229358, PI 274454 foram rejeitadas pelas lagartas (HOFFMANN-CAMPO et al., 1994). O efeito de vários genótipos de soja na biologia de *A. gemmatalis*, bem como o consumo e a utilização de alimentos foram estimados por Machado et al., (1999); no qual lagartas alimentadas com a cultivar resistente IAC-100 apresentaram desenvolvimento larval mais longo e menor peso em relação a lagartas alimentados com outros genótipos testados.

Compostos fenólicos, como a rutina e ácido clorogênico, são considerados modelos em estudos de defesa anti-herbivoria de plantas, os efeitos dos flavonóides podem variar dependendo da espécie do inseto, e freqüentemente, insetos monófagos e oligófagas, como *A. gemmatalis* pode usá-lo para reconhecer suas plantas hospedeiras (HARBORNE, 1991). Embora a aglicona quercitina e a rutina, um de seus glicosídeos, tenham causado aumento da mortalidade e alongado o período larval de *A. gemmatalis* (GAZZONI et al., 1997), os efeitos nutricionais e pós-ingestivos dos flavonóides carecem ainda de maiores investigações (HOFFMANN-CAMPO, 1995; PIUBELLI et al., 2005).

O completo entendimento dos efeitos dos flavonóides como a rutina e genistina sobre uma praga especializada e principal desfolhadora da soja como *A. gemmatalis*, além do comportamento e nutrição, é de grande importância para o sucesso dos programas de melhoramento químico e de controle de pragas (PIUBELLI et al., 2005).

Assim nos programas de controle de pragas que visam reduzir a resistência das larvas de *A. gemmatalis* ao AgMNPV têm se utilizado substâncias químicas encontradas em extratos de folhas de soja, que promovem a mortalidade de larvas resistentes ao vírus em comparação com as larvas suscetíveis (HOFFMANN-CAMPO, 1995; PIUBELLI et al., 2005).

Como o intestino médio nos insetos é a principal via de acesso e ação tanto dos bioinseticidas quanto dos flavonóides existe a necessidade de estudos sobre as alterações causadas por estas substâncias..

O tubo digestivo dos insetos é uma eficiente barreira físico-química contra a ação de microrganismos que possam ser ingeridos juntos com a alimentação. Em geral, o canal alimentar compreende três regiões: o intestino anterior, médio e o posterior, sendo o intestino médio a principal região, essencial à digestão e absorção de alimentos, e também dos produtos fitossanitários químicos e biológicos (TERRA; FERREIRA, 1991; CHAPMAN, 1998).

Morfologicamente o intestino médio em larvas de *A. gemmatalis* apresenta-se constituído, por várias estruturas que são morfofuncionalmente distintas. Da luz para a periferia do órgão, revestindo o epitélio, encontra-se uma fina camada acelular denominada de membrana peritrófica que divide o lúmen em dois espaços, o ectoperitrófico e o endoperitrófico. O epitélio é do tipo pseudoestratificado colunar com pelo menos quatro tipos celulares distintos - as

células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas. Abaixo do epitélio encontra-se a camada muscular composta de feixes musculares transversais e longitudinais (LEVY et al., 2007; 2008).

Alguns trabalhos com larvas de lepidoptera sugerem que os diferentes tipos celulares encontrados no epitélio do intestino médio apresentam variações morfológicas e funcionais ao longo de sua extensão, a exemplo dos relatados por Pinheiro et al. (2003), Pinheiro et al. (2008), Levy et al. (2009), Cruz et al. (2010, in press) que trabalharam com larvas de Lepidoptera.

O presente trabalho teve por principal objetivo, estudar as alterações causadas superfície das células epiteliais do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, alimentadas com folhas de diferentes genótipos de soja, contendo diferentes concentrações desses flavonóides.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados o genótipo de soja BRS 257 como testemunha, e os genótipos com características de resistência a insetos Dowling e PI 227687. A concentração dos flavonóides rutina e genístina presentes nestes genótipos era de (0,0 e 0,0); (0,0 e 0,0429); (0,3682 e 0,0122), respectivamente para rutina e genistina. Esses genótipos foram semeados e cultivados em casa de vegetação da Embrapa Soja Londrina-PR em condições ideais de temperatura, pressão, umidade e plantio.

As folhas foram coletadas, levadas ao laboratório e lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 5%; enxaguadas em água destilada; secas em papel filtro e colocadas em gerbox com os ovos de *A. gemmatalis*, suscetíveis e resistentes ao AgMNPV. Esses ovos foram fornecidos pelo Laboratório de Entomologia da EMBRAPA Soja, Londrina/PR, e eram provenientes de insetos suscetíveis e resistentes (Concentração Letal - CL₈₀ em cada geração), criados com dieta artificial (HOFFMANN-CAMPO et al., 1985) sob temperatura controlada (25-27°C), fotoperíodo (14h luz/10h escuro) e com 80% de umidade relativa. Após eclosão das larvas, as mesmas foram repicadas no 2º instar, e mantidas com 25 larvas por gerbóx, para facilitar a manutenção das mesmas. As folhas de soja eram

trocadas a cada 12 horas para não ocorrer a falta de alimento.

As larvas de *A. gemmatilis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV ao atingirem o quarto ínstar (10 -12 dias de idade) eram imobilizadas e anestesiadas por resfriamento no congelador por cerca de 5 minutos e dissecadas sob estereoscópio com solução salina para insetos (1,80 g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16 de CaCl; 0,004g de NaHCO₃ e água destilada-q.s.p 100 mL). As larvas foram presas pelas extremidades por alfinetes entomológicos, em placa de Petri preenchida com paraplast e com auxílio de tesoura oftalmológica, realizou-se uma incisão logitudinal na região ventral, do primeiro segmento torácico ao penúltimo segmento abdominal, com rebatimento lateral da cutícula. Os IM foram identificados e seccionados ao meio, transversal e longitudinalmente, sendo rebatido lateralmente para exposição da superfície interna. Para análise ao microscópio eletrônico de varredura foram coletados 10 tubos digestivos por tratamento para ambas as populações larvais.

O intestinos médios coletados foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,3 por 24 horas e lavados no mesmo tampão; pós fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,3 por 30 minutos; desidratados em série crescentes de álcool etílico (50 a 100%); secos em ponto crítico com CO₂ líquido e recobertos com 10 nm de ouro.

A análise ultraestrutural do material foi realizada no microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 (FEI), do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UEL (LMEM/UEL).

3. RESULTADOS

Nas larvas suscetíveis (LS) tratadas com o genótipo testemunha BRS 257, o intestino médio (IM) se mostrou constituído pelas regiões anterior (RA); mediana (RM) e posterior (RP), que eram facilmente identificáveis A superfície da RA do IM mostrou variação na morfologia das células colunares (Fig. 4.1A). Em parte, a superfície das células era achatada, justaposta, com tamanhos variados, recobertas por discretas microvilosidades e ausência de protusões citoplasmáticas (Fig. 4.1A). Em outras porções, as células eram maiores e abauladas, com

tamanhos variados exibindo muitas microvilosidades e algumas protusões citoplasmáticas (Fig. 4.1B.). Estas protusões eram arredondadas, de tamanhos variáveis e superfície irregular do tipo rugosa. Observou-se também a presença de orifícios de tamanhos variados na porção apical da célula e liberação de gotas de secreção.

A região mediana mostrou pouca variação na superfície das células colunares, quando comparada a RA, com discreto aumento na concentração de protusões citoplasmáticas do tipo rugoso (Fig. 4.1B).

A região posterior apresentou morfologia de superfície celular semelhante às outras duas (RA e RM), mas o que mais chamou atenção foi a intensa secreção de protusões citoplasmáticas apicais em direção ao espaço ectoperitrófico (Figs. 4.1C e D).

Em larvas resistentes (LR) tratadas com o mesmo genótipo, as protusões citoplasmáticas foram detetadas ao longo de toda a superfície epitelial do IM. As regiões RA, RM e RP, não tiveram limites claramente estabelecidos, porém apresentaram células colunares de diâmetros e alturas variados com microvilosidades extensas e abundantes. Observou-se protusões citoplasmáticas apicais, de vários tamanhos e formas, sendo a maior parte com superfície irregular tipo rugosa, porém notou-se discreta presença de outro tipo de protusões, que eram arredondadas e de superfície lisa (Fig. 4.1 E). Várias destas protusões foram visualizadas sendo ainda liberadas da célula além de serem observados grandes orifícios entre as microvilosidades (Fig. 4.1F).

No tratamento com o genótipo Dowling, nas LS, o IM apresentou apenas duas regiões identificáveis, a RA e a RP (Fig. 4.2A). A RP apresentou quantidade de protusões citoplasmáticas, do tipo arredondada e lisa ou com grânulos em sua superfície (Figs. 4,2 C e E). A RA apresentou menor quantidade de protusões, além de uma pequena quantidade de perfurações na superfície das células colunares (Figs. 4.2 A e B).

Além da grande quantidade de protusões sendo liberadas das células colunares (Fig. 4.2 C), observou-se variações na forma e quantidade das microvilosidades, que ora se apresentavam muito longas e livres (Fig. 4.2 D) e ora eram mais curtas e concrecidas (Fig. 4.2 D).

Nas LR, foi difícil identificar as regiões do IM. As células colunares mostraram superfície de tamanhos variados, recobertas por microvilosidades

concrecidas (Fig. 4.2 E) e alguns ninhos de microvilosidades livres e com muitas protusões (Fig. 4.2E). As protusões eram de formatos irregulares, lisas ou rugosas (Fig. 4.2 H) e arredondadas e lisas (Fig. 4.2 F).

Nas LS tratadas com folhas do genótipo PI 227687, o IM apresentou as regiões anterior e posterior. Na RA, a maior parte das células colunares apresentou superfície achatada, com microvilosidades curtas (Fig. 4.3 A), porém em pequena extensão pode-se observar superfície convexa, com microvilosidades curtas e concrecidas, sem protusões (Fig. 4.3 B). A região posterior mostrou-se bastante distinta, com grande quantidade de protusões de formato e superfícies variadas (Fig. 4.3 B). Foram identificadas protusões citoplasmáticas irregulares (Fig. 4.3 B), de superfície rugosa e/ou granulosa (Fig. 4.3 B) e protusões em formato de bastonete, com superfície lisa. Nesta região as microvilosidades eram concrecidas e curtas (4.3 A e B)

Nas LR, foi possível observar as regiões anterior e posterior do IM, bastante individualizadas, sendo que a RA apresentou a superfície das células colunares sem protusões, com tamanhos variados, justapostas e com pouca microvilosidades (Fig. 4.3 C), enquanto a RP apresentou grande quantidade de protusões citoplasmáticas sendo liberadas para o lúmen (Fig. 4.3 D). As protusões citoplasmáticas eram em sua maioria do tipo arredondadas lisas e com pequenos grânulos em sua superfície. Podem-se observar várias protusões ainda sendo liberadas da superfície das células colunares (Fig. 4.3 D), bem como orifícios na superfície dessas células após a liberação das protusões citoplasmáticas. Além de protusões foram observadas gotas de secreção e microvilosidades concrecidas e curtas.

Foi possível observar também uma terceira região, provavelmente a RM, que apresentava uma área com grande quantidade de protusões, e outra área com uma quantidade bastante reduzida nesta estrutura.

4. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

4.1 Elétron-Micrografias do intestino médio de Larvas de *A. gemmatalis* Suscetíveis e Resistentes Ao AgMNPV tratadas com o genótipo BRS 257 (testemunha)

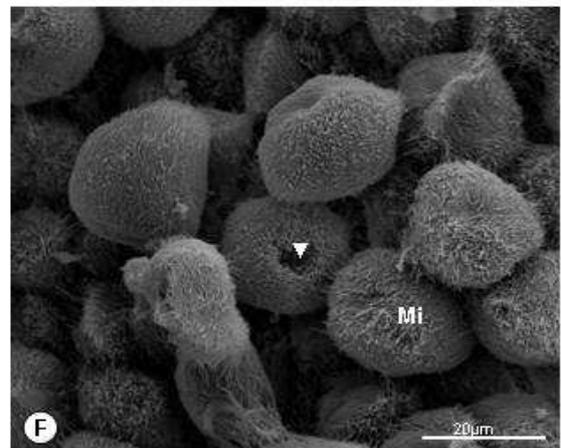
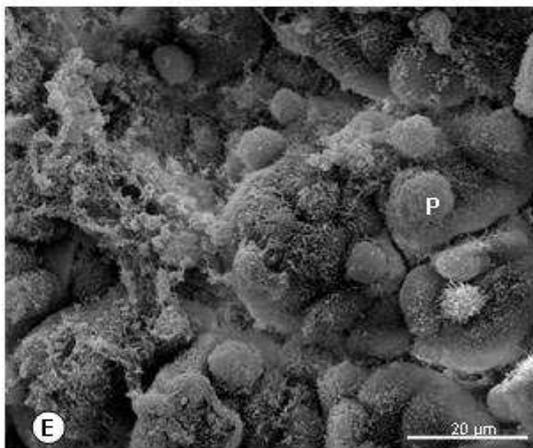
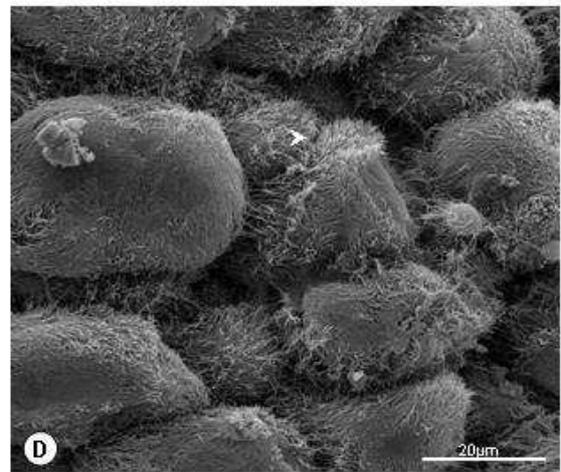
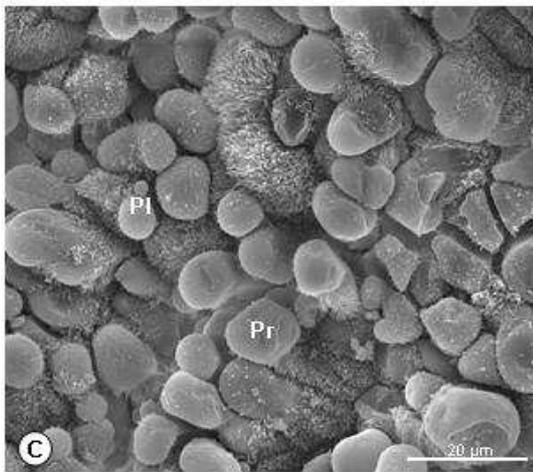
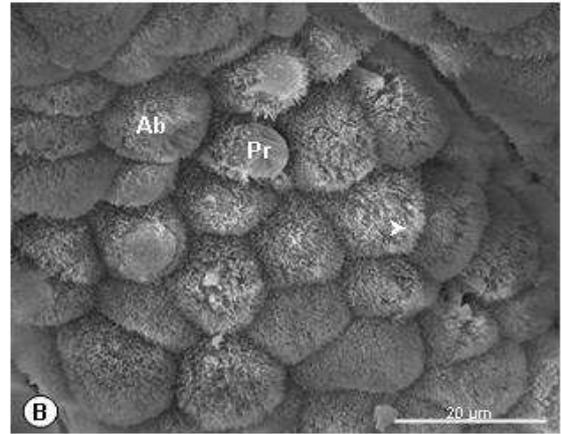
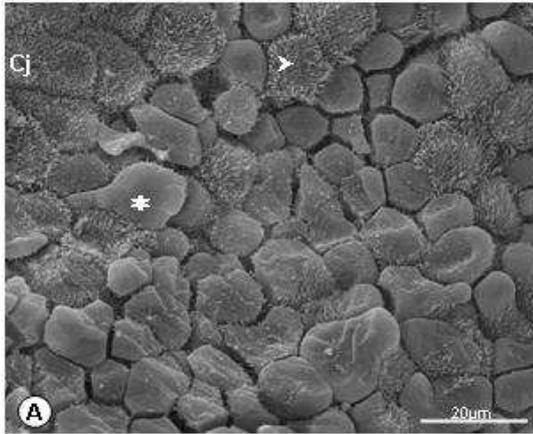
A – Região anterior do IM de LS. Células epiteliais achatadas com discretas microvilosidades (▶) e sem microvilosidades (*); justapostas (Cj) recobertas com microvilosidades (▶). Barra = 20µm.

B – Região mediana do IM de LS. Células abauladas (Ab) com microvilosidades (▶) e protusões citoplasmáticas rugosas (Pr). Barra = 20 µm

C - Região posterior do IM de LS. Células com grande quantidade de protusões citoplasmáticas lisas (Pl) e rugosas (Pr). Barra = 20µm.

D – Região anterior do IM de LR. Células justapostas recobertas com microvilosidades (▶) Barra = 20 µm

E e F – Região posterior do IM de LR. Células com protusões citoplasmáticas (P) e microvilosidades (▶) na superfície das células colunares (Mi). Notar orifícios (provavelmente provenientes da saída das protusões) por entre as microvilosidades (▼). Barra = 20 µm.



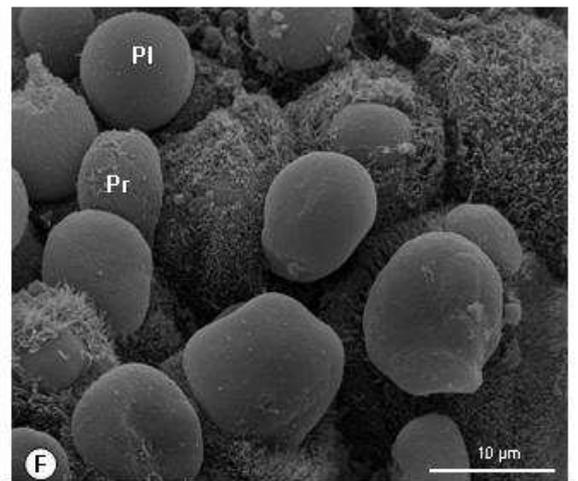
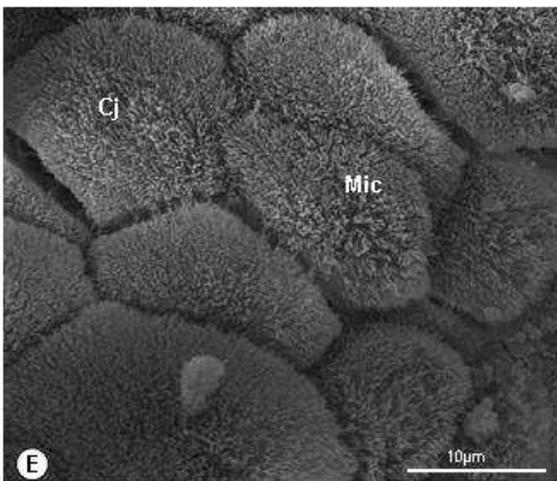
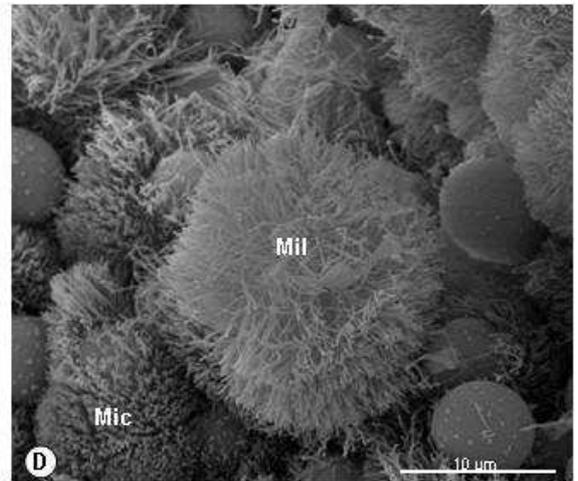
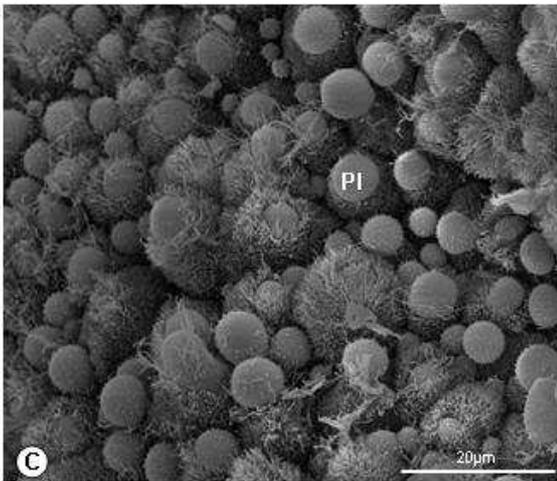
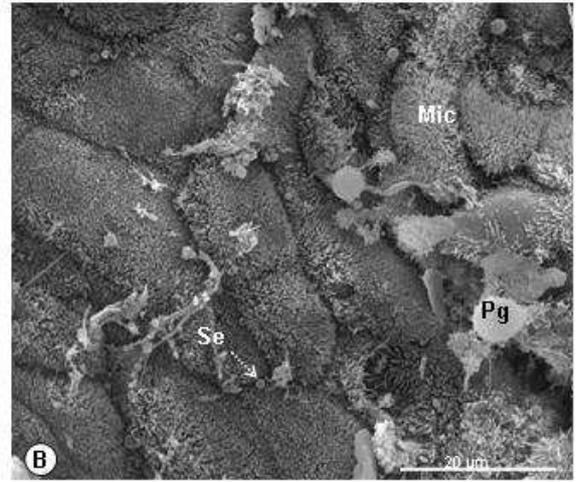
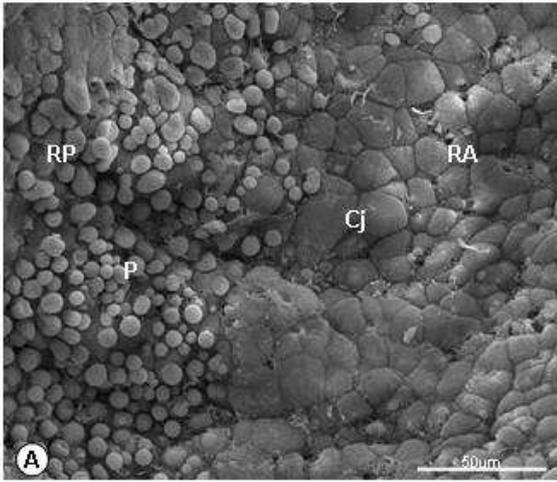
4.2 Elétron-Micrografias do intestino médio de Larvas de *A. gemmatalis* Suscetíveis e Resistentes Ao AgMNPV tratadas com o genótipo Dowling

A – Região anterior (RA) do IM das LS com células justapostas (Cj) e região posterior (RP) com protusões (P). Barra = 50µm.

B – Região anterior do IM de LS. Células justapostas (Cj), com microvilosidades curtas e juntas (Mic), protusões citoplasmáticas com grânulos (Pg) e gota secreção (Se). Barra = 20 µm.

C e D - Região posterior do IM de LS. Células com numerosas protusões citoplasmáticas do tipo lisa (Pl), microvilosidades curtas e juntas (Mic) e células com microvilosidades longas e livres (Mil). Barras C = 20µm e D = 10µm.

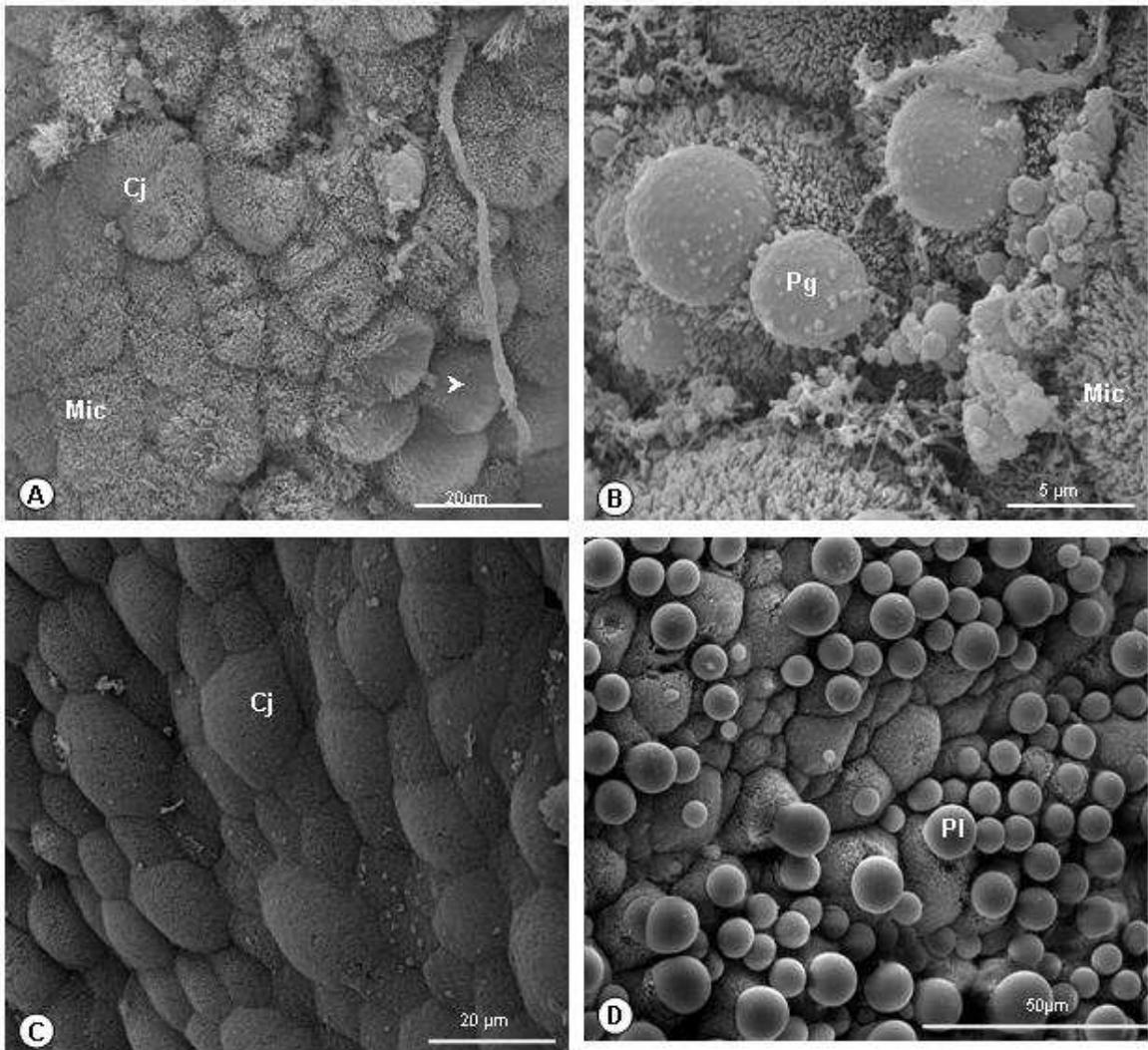
E e F – Superfície do IM de LR. (E) Região anterior com células colunares justapostas (Cj) recobertas com microvilosidades curta concrecidas (Mic). (F) Região posterior com células colunares com microvilosidades curtas e juntas (Mic) e protusões citoplasmáticas lisa (Pl) e rugosa (Pr). Barra = 10µm.



4.3 Elétron-Micrografias do intestino médio de Larvas de *A. gemmatalis* Suscetíveis e Resistentes Ao AgMNPV tratadas com o genótipo PI 227687

A e B – Superfície de células do IM de LS. (A) Região anterior do IM de LS. Células colunares justapostas (Cj) cobertas com microvilosidades curtas e juntas (Mic) ou longas (►). (B) – Região posterior do IM de LS. Células colunares recobertas com microvilosidades curtas e juntas (Mic) e protusões citoplasmáticas granulosas (Pg). Barra = (A) 20µm e (B) = 5 µm.

C e D – Superfície de células do IM de LR . (C) Região anterior com células justapostas (Cj). (D) Região posterior do IM de LR. Células colunares com grande quantidade de protusões citoplasmáticas lisas (Pl). Barra = (C) 20µm e (D) = 50µm.



5. DISCUSSÃO

A morfologia geral da parede do intestino médio na população de larvas de *A. gemmatalis* suscetível e resistente ao AgMNPV tratadas com o genótipo testemunha BRS 257, é semelhante aquela descrita para este mesmo tipo de larva quando tratada com dieta artificial, isentas destes flavonóides, conforme descrito por LEVY et al. (2008); CRUZ et al. (2010) e com os resultados descritos para a maioria das espécies de Lepidopteras (BILLIGSLEY; LEHANE, 1996, RIBEIRO et al., 1997; BROOKS et al., 2002; PINHEIRO et al., 2008).

Em larvas suscetíveis as diferenças em sua superfície possibilitaram diferenciar três regiões distintas no IM: região anterior, média e posterior. Essas regiões também foram identificadas em larvas resistentes, entretanto, sem limites claramente delimitados. De modo geral a superfície das células colunares apresentou variações em relação ao tamanho, altura, formatos, microvilosidades e protusões citoplasmáticas. Houve aumento gradual nestas protusões no sentido da região anterior para a posterior.

As protusões citoplasmáticas foram as principais estruturas que possibilitaram diferenciar as regiões do intestino médio. Aparentemente a intensidade o formato dessas protusões aumentavam de acordo com o tratamento o qual as larvas foram submetidas.

As protusões apresentavam formato arredondado e liso sem ou com grânulos (provavelmente proveniente das microvilosidades) e irregulares rugosos, ou ainda sendo destacados da porção apical das células colunares semelhantes aos descritos por Pinheiro (2006); Pinheiro et al. (2008).

Esta variação nos formatos das protusões foi descritos por Jimenez e Gillian (1990) ao observarem em microscopia eletrônica de transmissão, dois tipos de protusões que variavam na região média e posterior no intestino médio de *Apis mellifera*. Os autores relataram que estas estruturas de aspecto granular fariam parte do processo de secreção merócrina, enquanto as de aspecto liso e com conteúdo celular estariam relacionadas ao processo de secreção holócrina. Levy (2005) descreveu a variação no formato das protusões, relacionando as que apresentam aspecto arredondado como protusões com conteúdo citoplasmático e as rugosas como protusões cujo conteúdo já havia sido extravasado para o lúmen.

Muitas dessas protusões apresentavam em sua superfície a presença de pequenos orifícios na membrana, também observados por Pinheiro (2006) que relatou essas características como interrupções da membrana das protusões.

O genótipo BRS 257 (testemunha) promoveu discretas protusões e em pouca quantidade tanto em larvas suscetíveis como nas resistentes, enquanto as larvas suscetíveis e resistentes ao AgMNPV alimentadas com os genótipos Dowling e PI 227687 apresentaram aumento na concentração destas protusões que variavam ao longo do intestino médio da região anterior para a região posterior, de tamanho e formato. Este fato também observado em larvas de *Diatrea saccharalis* por Pinheiro et al. (2008).

Essas protusões são descritas há muitos anos, porém sem função determinada. Alguns autores relataram que essas protusões estão associadas à ecdise dos insetos como descrito por De Priester (1971) para *Calliphora erythrocephala*, ou ainda ao processo de degeneração celular proveniente da renovação epitelial (ANDERSON, HARVEY, 1966; DE PRIESTER 1971; TERRA; FERREIRA, 1994) e de secreção de enzimas digestivas (SANTOS, et al.,1984; WOOD; LEHANE, 1991; CRISTOFOLETTI et al.,2001).

Entretanto em estudos realizados com *Blatella germanica* a secreção de enzimas foi contestada devido a reduzida atividade enzimática encontrada no intestino médio, mesmo apresentando alta concentração dessas protusões (JIMENEZ; GILLIAM, 1990).

A função dessas protusões pode ser relacionada ainda como processo de defesa dos insetos, que eliminam substâncias nocivas ou até mesmo células danificadas ou infectadas para o lúmen intestinal. Observamos em nossos estudos que as larvas de *A. gemmatalis* tanto suscetíveis quanto resistentes alimentadas com folhas de genótipos Dowling e PI 227687 que continham as mais altas concentrações dos flavonóides rutina e genistina apresentaram intensa produção de protusões no intestino médio, diferentemente do observado para o tratamento testemunha.

O fato da liberação de protusões como sistema de defesa foi observado por De Priester (1971) em *Calliphora erythrocephala*; Washburn et al. (2001) em *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens*; Brooks et al. (2002) em *Helicoverpa armigera*; Arruda, Oliveira; Silva (2003) em *Aedes aegypti*; Pinheiro et al.

(2006) em *Diatrea saccharalis*; Khakamand, Mahmoud, Amin (2008) *Apis mellifera*. Estes autores observaram intensa secreção após a ingestão de substâncias nocivas ou infecção do indivíduo, com eliminação do epitélio de células doentes e lesadas.

Desta forma o fato das larvas *A. gemmatalis* apresentarem protusões citoplasmáticas variando em intensidade entre a população suscetível e a resistente, são corroborados pelos dados da literatura que relacionam esse fato ao processo de resistência e também por Levy (2005), Cruz et al. (2010) que ao analisar em microscopia eletrônica de varredura o intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, tratadas com dieta artificial notou que em larvas resistentes a concentração de protusões eram maiores nesse tipo larval.

As microvilosidades que recobriam a superfície das células colunares foram encontradas com densidade e tamanhos variados como descrito por Pinheiro et al (2008) em *Diatrea saccharalis*.

Na região anterior as microvilosidades eram encontradas com pouca densidade e concrecidas e na região posterior estas se apresentavam mais longas e livres. As microvilosidades têm como uma das funções a proteção da camada de células colunares e com relação ao vírus do AgMNPV estes tem que atravessar essas microvilosidades antes de penetrarem na membrana das células colunares para iniciar o processo de replicação do vírus no interior dessas células (FLIPSEN et al., 1995; VOLKMAN, 1997).

Outra variação observada em meio à microvilosidades era a presença de orifícios entre elas podem ser atribuídas justamente à liberação das protusões citoplasmáticas que carregavam em sua superfície pedaços dessas estruturas

Também foi notado junto às microvilosidades gotas de secreção, principalmente no tratamento Dowling com larvas resistentes. Essas gotas parecem estar associadas à liberação de enzimas digestivas das células colunares para o lúmen e estariam relacionadas ao processo de secreção microapócrina que ocorre a partir das microvilosidades (SANTOS et al., 1984; WOOD, LEHANE 1991, CRISTOFOLETTI et al., 2001).

A ausência dessas microvilosidades na superfície das células colunares pode facilitar a adesão e penetração de corpos estranhos e patógenos que possam infectar e causar desestruturação das células acelerando dessa forma o

processo de infecção celular.

6. CONCLUSÕES

O intestino médio das larvas de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis e resistentes apresentou três regiões distintas, região anterior, média e posterior. Essas regiões eram diferenciadas de acordo com a intensidade de protusões citoplasmáticas apresentadas. Houve aumento dessas projeções em ambas as populações larvais nos tratamentos Dowling e PI 227687 que continham os flavonóides genistina e rutina.

Entre os tratamentos o genótipo PI 227687 foi o que proporcionou maior quantidade de protusões que no tratamento Dowling, o que poderá alterar na absorção e metabolismo do inseto.

Entre as populações larvais as larvas resistentes apresentaram maior quantidade de protusões do as larvas suscetíveis, o que poderia ser relacionado a maior capacidade deste inseto em degradar células lesadas..

7. REFERÊNCIAS

- ABOT, A.R.; et al. Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. **Biological Control**, v.7, n. 1, p.126-130, ago. 1996.
- ANDERSON, E; HARVEY, W. Active transport by cercopia midgut. **The journal of Cell Biology**. V.31,n.1, p.107-134, out. 1966.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.; SILVA, I.G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.36, n.1, p.17-25, jan-fev. 2003.
- BROOKS, M.E. et al. Infection of its lepidopteran host by the *Helicoverpa armigera stunt virus* (Tetraviridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p.97-111, 2002.
- CHAPMAN, R.F. **The Insects: structure and function**. 4.ed. Cambridge: Harvard University Press, 1998.
- CRISTOFOLETTI, P.T; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.T. Apocrine secretion of amylase, exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Journal Insect Physiology**, v.47, n.2, p.143-155, fev. 2001.
- CRUZ, N.A. et al. Ultramorfologia da superfície celular do intestino médio de larvas de *Anicarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae) resistentes e suscetíveis ao nucleopoliedrovírus AgMNPV. **Neotropical Entomology** (In Press), 2010.
- DE PRIESTER, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Callifora erythrocephala*. **Journal of Ultrastructure Research**. Nova lorque v.36, n.5, p. 783-805, set. 1971.
- FLIPSEN, J.T.M.; et al. Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. **Virology**, New York v.208, p.328-335, 1995.
- GAZZONI, D.L. HÜLSMEYER,A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Efeito de diferentes doses de rutina e de quercetina na biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep., Noctuidae). **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.7, p. 673-681, jun./jul. 1997.
- HARBONE, J.B. Flavonoid pigments. In: ROSENTHAL, G.A.; BEREMBAUM, M.R. (Eds) **Herbivores and their interaction with secondary metabolites**, London: Academic Press, 1991, p.389-429.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI,F. **Criação Massal da Lagarta da Soja**. Londrina: EMBRAPA, 1985.
- HOFFMANN-CAMPO,C.B.; et al. Mecanismos de resistência de genótipos de soja: teste de não-preferência para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep.:Noctuidae).

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

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

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; et al. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2000.

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

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; et al. Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.10, p. 1453-1459, out. 2006.

JIMENEZ, D.R.; GILLIAN, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. **Cell and Tissue Research**, v.261, p.431-443, 1990.

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

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

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

LEVY, S.M. *et al.* The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biopogy**, São Paulo, v.64, n. 3b, p.1-6, ago. 2004.

LEVY, S.M. **Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera:Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovirus (AgMNPV): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio**. 2005.Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-UNESP. Campus de Botucatu, Botucatu.

LEVY, S.M.,et al.. Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): structural study of the peritrophic membrane. **Journal of Invertebrate Pathology** v.93, p.183–186, 2007

LEVY, S.M. et al. Ultramorfology of digestive tract of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera:Noctuidae) at final larval development. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina v. 29, n.2, p.313-322, abr./jun. 2008.

- LEVY, S.M.; et al. A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.101, n.1, p.17-22, abr. 2009.
- MACHADO, V.O.F., et al. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM CULTIVARES DE SOJA (*Glycine max* MERRIL). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 29, n.1, p.39-41, 1999.
- MENDONÇA E. G., et al. Determinação da atividade enzimática e do número de bactérias associadas ao intestino médio da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*, criada em diferentes dietas. **Revista Ceres**, v.56, n.1, p.18-24, jan./fev. 2009
- MOSCARDI, F.; CARVALHO, R.C.Z. Consumo e utilização de soja por *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) infectada, em diferentes estádios larvais, por seu vírus de poliedrose nuclear. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.22, n.2, p.267-280, jun.1993.
- PINHEIRO, D. O. **Variações regionais nas células epiteliais do intestino médio de *Diatrea saccharalis* Fabricius 1794 (Lepidoptera: Crambidae), em larvas não-parasitadas e na vigência do parasitismo por *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Zoologia). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-UNESP Campus de Botucatu, Botucatu.
- PINHEIRO, D.O. et al. Morphometric study of the midgut epithelium in the *Diatrea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. **Neotropical Entomology**, Vacaria, v.32, n.3, p. 453-459, jul./set. 2003
- PINHEIRO, D.O. et al. Morphometry of the midgut epithelium of *Diatrea saccharalis* Fabricius, 1974 (Lepidoptera) parasitized by *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.93, n.1, p.60-62, set. 2006.
- PINHEIRO, D.O. et al., Morphological Regional Differences of Epithelial Cells along the Midgut in *Diatrea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) Larvae. **Neotropical Entomology**, Vacaria, v.37, n.4, p.413-419, jun./ago. 2008
- PIUBELLI, G.C et al. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis* ? **Journal of Chemical Ecology**, California, v.31, n.7, p.1509-1525, jul. 2005.
- RIBEIRO A F, FERREIRA C, TERRA, W R Morphological basis of digestion in insects. **Acta Microscopica** v.6: p.71-73. 1997.
- SANTOS, C.D. et al. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erynnis ello*): ultrastructure, fluid and fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. **Cell and Tissue Research**, v.237, p. 565-574, 1984.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. A digestão dos insetos. **Ciência Hoje**, v.12, p.28-38, 1991.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 109, p. 1-62, 1994.

WASHBURN, J.O., et al. Comparative pathogenesis of *Helicoverpa zea* M nucleopolyedrovirus in noctuidae larvae. **Journal of General Virology**, v.84, p.343-351, 2001.

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

5. ARTIGO 3 ESTUDO HISTOQUÍMICO DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE *A. gemmatalis* SUSCETÍVEIS E RESISTENTES AO VÍRUS AgMNPV ALIMENTADAS COM GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTE A INSETOS

RESUMO

O intestino médio dos insetos é a principal via de absorção e ação da maioria dos inseticidas químicos, biológicos e das substâncias que promovem a resistência de plantas aos insetos (aleloquímicos). O intestino médio pode apresentar em sua composição moléculas que são de extrema importância para a manutenção das células; além de auxiliarem na metamorfose desses insetos. Dentre essas moléculas os polissacarídeos tanto os carboidratos neutros quanto ácido, as proteínas e lipídeos (entre outros) podem ser detectados em preparados histológicos através de técnicas de coloração especial, a histoquímica, que identifica essas moléculas no tecido. O objetivo deste trabalho foi verificar a composição química das substâncias presentes no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao múltiplo nucleopoliedro vírus (AgMNPV) após o tratamento com folhas de genótipos de soja contendo flavonóide rutina (R) e o isoflavonóide genistina (G) em diferentes concentrações. Ambas as populações larvais foram tratadas com genótipos de soja "in natura" contendo rutina e genistina (BRS 257, testemunha; BR 16, G=0,0016mg/g; Dowling, G= 0,0429; PI 229358, R=0,0212 e G= 0,0136mg/g; IAC 100 R=0,0972 e G= 0,0142 mg/g e PI 227687, R=0,3682 e G= 0,0122mg/g). Os intestinos médios das larvas de quarto instar foram fixados e processados para as técnicas de detecção de carboidratos neutros, ácidos, proteínas e lipídeos. O PAS revelou que as larvas resistentes tratadas com o genótipo IAC 100 e PI 227687 apresentaram maior concentração de polissacarídeos neutros e após a diástase o tratamento IAC 100 em larvas resistentes apresentou a maior concentração em comparação com a testemunha e os demais tratamentos. Na detecção de proteínas totais as larvas suscetíveis apresentaram reação positiva, em todos os tratamentos, para as três técnicas aplicadas com intensa marcação nuclear, enquanto que as larvas resistentes apresentaram reação positiva nos tratamentos IAC 100 e PI 227687 (azul de bromofenol mercúrio); IAC 100 (azul de bromofenol). Na detecção de lipídeos a reação apresentou positividade apenas em larvas resistentes para os tratamentos PI229358, IAC 100 e PI227687. Na detecção de carboidratos ácidos não houve reação positiva para nenhum dos genótipos tratados, em ambos os tipos larvais.

Palavras-chave: *Anticarsia gemmatalis*, rutina, genistina, carboidratos, proteínas, lipídeos

5. ARTICLE 3 HISTOCHEMICAL STUDY OF THE MIDGUT OF LARVAE SUSCEPTIBLE AND RESISTANT TO THE VIRUS AGMNPV FED SOYBEAN GENOTYPES RESISTANT TO INSECTS

ABSTRACT

The midgut of insects is the main route of absorption and action of most chemical insecticides, biological and substances that promote plant resistance to insects (allelochemicals). The midgut may present in its composition molecules that are extremely important for the maintenance of cells, as well as helping in the metamorphosis of insects. Among these molecules polysaccharides both neutral and acid carbohydrates, proteins and lipids (among others) can be detected in histological preparations by special staining techniques, the staining, which identifies these molecules in the tissue. The objective of this study was to determine the chemical composition of substances present in the midgut of larvae of *A. gemmatalis* susceptible and resistant to multiple nucleopolyedrovirus (AgMNPV) after treatment with leaves of soybean containing flavonoid rutin (R) and the isoflavone genistein (G) at different concentrations. Both larval populations were treated with soybean genotypes "in natura" rutin and genistin (BRS 257, control; BR 16, G = 0.0016 mg/g; Dowling, G = 0.0429; PI 229358, R = 0.0212 and G = 0.0136 mg/g; IAC 100 R = 0.0972 and G= 0.0142 mg/g and PI 227687, R = 0.3682 and G= 0.0122 mg/g). The intestines of the average fourth instar larvae were fixed and processed for the detection techniques of neutral carbohydrates, acids, proteins and lipids. The PAS revealed that the resistant larvae treated with IAC 100 and PI 227687 showed a higher concentration of neutral polysaccharides and after diastase treatment in IAC 100 resistant larvae had the highest concentration compared with the control and other treatments. In detection of total protein susceptible larvae showed a positive reaction in all treatments for three techniques applied with intense nuclear staining, while the resistant larvae showed a positive reaction in the IAC 100 and PI 227687 (mercury bromophenol blue); IAC 100 (bromophenol blue). Detection of lipid reaction was positive only in larvae resistant to treatments PI229358, PI227687 and IAC 100. The detection of acid carbohydrates no positive reaction to any of the genotypes treated in both larval types.

Keywords: *Anticarsia gemmatalis*, rutin, genistein, carbohydrates, proteins, lipids

1. INTRODUÇÃO

Nos insetos, o mecanismo de alimentação, sua estrutura e a química-digestiva se processam no sistema digestivo, que é constituído pelo canal alimentar ou tubo digestivo e órgãos anexos. O tubo digestivo é formado por três regiões morfofuncionais distintas: o intestino anterior, o intestino médio e o intestino posterior (CHAPMAN, 1998), sendo o intestino médio (IM) o principal local de digestão, absorção do alimento e a principal via de acesso dos inseticidas químicos e biológicos administrados (MOSCARDI; CARVALHO, 1993).

Atualmente o combate de pragas em geral tende a reduzir gradualmente a utilização dos agrotóxicos em decorrência de seus efeitos colaterais, sendo substituídos e/ou associados aos métodos alternativos de controle que consideram os aspectos econômicos e ecológicos, para a solução a médio e longo prazo. A estratégia é uma proposta de convivência com as pragas, dando oportunidade ao controle biológico e recomendando o controle químico quando a população da praga atinge níveis que causam prejuízos maiores do que os custos de controle (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). Esta proposta está alicerçada em conhecimentos ecológicos, econômicos e sociais, visando interferir o mínimo possível no agroecossistema e é conhecida como Manejo Integrado de Pragas (MIP), e pode ser caracterizado pela consonância dos métodos de controle com princípios ecológicos, econômicos e sociais, visando interferir o mínimo possível no agroecossistema (GAZZONI et al., 1988; PANIZZI, 1990).

Os prejuízos causados por uma praga-chave da soja, a lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* têm sido minimizados pelo controle biológico pelo nucleopoliedrovírus (*AgMNPV*). Os poliedros virais, quando ingeridos pela lagarta, atingem o lúmen do IM, onde a sua cápsula protéica é solubilizada por ação do meio alcalino desta região, liberando os nucleocapsídeos (GRANADOS, 1981). Estudos apontam o epitélio do IM como o primeiro tecido a ser infectado pelo vírus durante o processo de infecção (KAWANISHI et al., 1972). Para que ocorra este processo de infecção, os nucleocapsídeos precisam atravessar a MP, a primeira barreira contra patógenos; os nucleocapsídeos penetram através de seus poros, alcançando o interior da célula após fusão com a membrana de suas microvilosidades, replicando-

se nos núcleos das células colunares e transmitindo a infecção para outros tecidos (FLIPSEN et al., 1995; VOLKMAN, 1997).

A eficiência do vírus no controle biológico e o baixo custo de produção vêm aumentando a sua utilização, o que pode acarretar uma maior pressão de seleção sobre a população de insetos no campo. Experimentos em laboratório, envolvendo pressão de seleção com o AgMNPV resultaram em rápida seleção para resistência a esse entomopatógeno (ABOT et al., 1996). O surgimento de larvas resistentes ao nucleopoliedrovírus, mesmo que em condições de laboratório, levaram pesquisadores a questionar sobre quais mecanismos estariam envolvidos nesta resistência. Alguns estudos indicam a possibilidade desta resistência ser atribuída a mecanismos de defesa diferencial no IM (ABOT et al., 1996).

A resistência da soja a insetos é um mecanismo de defesa da planta que abrangem uma série de características morfológicas e, também, um complexo de substâncias químicas, que podem torná-la repelente, tóxica ou, de algum modo, inadequada para os insetos-praga (PIUBELLI, 2004). Na soja, as substâncias de defesa mais prováveis são os flavonóides (HOFFMANN-CAMPO, 1995), que em geral são mais abundantes nos genótipos resistentes às pragas. Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais que possuem atividades biológicas bastante diversificadas. Uma das maiores ações de flavonóides está relacionada à formação de ácidos graxos pela ação de fosfolipase A2, responsável pela hidrólise de fosfolípídeos presentes nas membranas celulares, com a liberação do ácido araquidônico (KUBO; HANKE, 1986; LARA, 1991; SILVA et al., 2002; ONYILAGHA; GROTEWOLD, 2004; LOPES et al., 2005). Assim, os flavonóides podem interagir e penetrar nas bicamadas lipídicas das membranas, alterando as barreiras e a permeabilidade das membranas celulares (LIMA et al., 1999; SILVA et al., 2001). Outras funções seriam relacionadas à atuação na expressão de receptores de membrana, como agentes antibacterianos e antivirais e inibidores de enzimas proteolíticas (TOLEDO et al., 2003).

Os compostos fenólicos presentes nas plantas possuem diferentes efeitos sobre os herbívoros. A ativação desses compostos ocorre por oxidação e pode levar a precipitação de proteínas (APPEL, 1993). Os radicais de hidroxila formados durante a oxidação dos compostos fenólicos possuem ação tóxica, e são responsáveis pela ruptura da integridade da membrana e por distúrbios de

metabolismo no epitélio intestinal (APPEL, 1993). Em lagartas, a ligação covalente do ácido clorogênico com proteínas monoméricas inibe a absorção de aminoácidos (FELTON et al., 1989; FELTON; DUFFEY, 1991).

Buscando entender os efeitos dos flavonóides nos insetos, HOFFMANN-CAMPO et al., (1994) realizaram testes de preferência alimentar em *A. gemmatalis* e notaram que os genótipos de soja BR82-12547, IAC74-2832, PI 227687, PI 229358, PI 274454 foram os mais rejeitados pela lagarta. Estudos posteriores identificaram a presença de sete flavonóides na PI 227687, uma das mais utilizadas nos programas de resistência para insetos, o que poderia indicar uma maior toxicidade desta cultivar e explicar a rejeição do inseto. Dentre os flavonóides, a rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo) é reconhecida por desempenhar papel muito importante na defesa da planta a lepidópteros (HOFFMANN-CAMPO, 1995; HOFFMANN-CAMPO et al, 2001). Essa substância foi também identificada em extratos de folhas de PI 227687, PI 274454 e outros poucos genótipos resistentes a insetos (PIUBELLI et al, 2005). Estudos prévios destas substâncias em insetos desfolhadores mostraram efeitos antibiótico e/ou não consumível em larvas de Lepidoptera como *Manduca sexta* (L.) (STAMP; SKROBOLA, 1993), *Heliothis virescens* (F.) (HOFFMANN-CAMPO, 1995) e *Trichoplusia ni* (Hübner) (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001). Em *A. gemmatalis*, a rutina apresentou efeitos característicos de antibiose, alongando o ciclo larval e reduzindo a sua sobrevivência (GAZZONI et al., 1997). Adicionalmente, o isoflavonóide genistina (7-O-β-D-glicosídeo) foi observado em menor concentração na maioria dos extratos foliares dos genótipos estudados por Piubelli et al. (2005) e utilizados pelos programas de melhoramento como fonte de resistência a insetos desfolhadores.

Os isoflavonóides são uma classe distinta de flavonóides e demonstram uma grande extensão de propriedades biológicas, mas provavelmente as mais importantes são atividades estrogênicas, antifúngicas e bactericidas das fitoalexinas e a atividade inseticida de rotenóides (HARBORNE, 1991). Porém pouco se sabe sobre seus efeitos na preferência alimentar e na biologia de pragas bem como da ação de uma substância química de defesa da planta na atividade biológica do inseto (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001).

Ambos os controles contra os insetos, tanto o biológico quanto o de resistência a plantas, utilizam o sistema digestivo, especialmente do IM, para sua atuação, já que os mesmos necessitam ser ingeridos pelas lagartas. No entanto

existem poucos estudos sobre o efeito nutricional e pós-ingestivo dos flavonóides nas células epiteliais do IM, na vigência ou não da infecção pelo AgMNPV. Alguns estudos têm demonstrado que a rutina tem aumentado a mortalidade de larvas resistentes de *A. gemmatalis* ao vírus, em comparação com larvas suscetíveis (PIUBELLI et al., 2006). O desconhecimento de como atua a rutina, assim como os mecanismos de atuação desta substância na diminuição da resistência em larvas de *A. gemmatalis*, reforça a necessidade de maiores estudos sobre o IM destes insetos, possível local de atuação dos flavonóides e principal via de acesso do AgMNPV.

Em larvas de *A. gemmatalis* o IM é formado por um epitélio pseudoestratificado colunar, com quatro tipos celulares distintos: células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (LEVY et al., 2004), como descrito em outras espécies de Lepidoptera (CHIANG et al., 1986; BINDER; BOWERS, 1994; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996). O epitélio é revestido por uma estrutura acelular denominado de membrana peritrófica (MP) que separa o epitélio do conteúdo intestinal protegendo-o contra abrasão, atuando como barreira permeável às enzimas digestivas e produtos da digestão (EISEMANN; BINNINGTON, 1994; TERRA, 2001), além de formar uma barreira que dificulta ou impede a entrada de microrganismos na cavidade do corpo (WANG; GRANADOS, 2001). Apoiando o tubo e separando-o da hemocele, existem duas camadas musculares, a mais interna, o músculo circular e a externa, o músculo longitudinal.

Estudos morfológicos do intestino médio em larvas de *A. gemmatalis*, comprovaram a diferenças estruturais neste órgão entre larvas suscetíveis e resistentes, sendo que nestas últimas a camada epitelial era mais alta, com maior quantidade de células regenerativas; as células colunares apresentavam um maior número de protusões citoplasmáticas em comparação as larvas suscetíveis (LEVY et al., 2005).

É conhecido que estes diferentes tipos celulares estão envolvidos em diferentes processos e atividades funcionais. As células colunares participam do processo de secreção de enzimas digestivas, membrana peritrófica e absorção de produtos assimilados da digestão (RICHARDS; DAVIES, 1994; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996); as células caliciformes estão relacionadas a absorção de metabólitos e homeostasia iônica (MOFFET et al., 1995; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; CHAPMANN, 1998); as células regenerativas tem o papel importante na renovação epitelial (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMANN,

1998; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999) e as células endócrinas tem função no controle hormonal, digestão, diurese, desenvolvimento, reprodução e movimentos peristálticos (BROWN et al., 1985; PRATT et al., 1989; WOODHEAD et al., 1989; SCOOFIS et al., 1993, COAST; KAY, 1994; PATEL et al., 1995).

Devido a variação funcional do IM as células apresentam substâncias que auxiliam na manutenção do órgão e da própria célula, que podem estar envolvidas na produção de energia (carboidratos), reserva energética (lípidos), síntese proteica que podem ser identificadas através de técnicas histoquímicas. No entanto pouco se conhece sobre a composição química do IM das larvas de *A. gemmatalis*, bem como é ausente a informação da presença destas substâncias em larvas com ingestão de plantas resistentes. Dessa forma o estudo histoquímico dos componentes do intestino médio é necessário para verificar se os flavonóides podem alterar a atividade normal do IM nas duas populações larvais de *A. gemmatalis* correlacionando os achados com os mecanismos de resistência ao AgMNPV.

2.MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os genótipos de soja, BRS 257 como testemunha, o genótipo BR 16 com característica de suscetibilidade a insetos segundo Salvador (2008) e os genótipos com características de resistência a insetos: Dowling (0.0 – 0.0429 mg/g de rutina e genistina); PI 229358 (0.0212 – 0.0136 mg/g de rutina e genistina); IAC 100 (0.0972 – 0.0142 mg/g de rutina e genistina) e PI 227687 (0.3682 – 0.0122 mg/g de rutina e genistina), provenientes da Embrapa Soja Londrina-PR. Larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, oriundas de ovos selecionados pelo laboratório de entomologia (EMBRAPA-CNPSoja) foram alimentadas com as folhas destes genótipos até atingirem o quarto ínstar (10 - 12 dias de idade pós eclosão); foram anestesiadas por resfriamento, dissecadas sob estereoscópio em solução salina para insetos (1,80 g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16 de CaCl; 0,004g de NaHCO₃ e água destilada-q.s.p 100 mL), as presas pelas extremidades por alfinetes entomológicos, com o auxílio de tesoura oftalmológica foi realizado uma incisão logitudinal na região ventral, do

primeiro segmento torácico ao penúltimo segmento abdominal. A cutícula foi rebatida para os lados, os tubos foram coletados em número 30 por tratamento e fixados por 6 horas em solução Karnovsky segundo Cerri e Cerri-Sasso (2003), para detecção de Polissacarídeos Neutros (PAS), glicogênio, polissacarídeos ácidos e proteínas totais. Para lipídios utilizou-se o protocolo de HERNÁNDEZ-BLAZQUEZ et al (1989) em solução fixadora de paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 1% e cloreto de cádmio 1% durante 24 horas pós fixados em ósmio. Posteriormente os materiais foram desidratados em série crescente de álcool etílico e incluídos em historesina (Historesin[®], Kit de inclusão da Leica). Foram obtidos cortes de 4µm, com navalha de tungstênio, em micrótomo rotativo automático modelo LEICA RM 2265, que foram submetidos as técnicas propostas.

2.1. Detecção de Polissacarídeos Neutros

Para detecção de polissacarídeos neutros os cortes foram tratados com ácido periódico 0,1% a 56°C em estufa (15 minutos) e Reativo de Schiff (60 minutos), (MACMANUS – HOTCHKISS, in LISON, 1950), mediante controle pela amilase salivar , para excluir a presença de glicogênio) e bloqueio pela acetilação segundo McManus e Cason para comprovação de grupos vic-glicol), contracorado com Hematoxilina de Harris (35 minutos), lavados, desidratados em série crescente de álcool etílico (70 a 100%), diafanizados em xilol, montados com bálsamo do Canadá e analisados ao fotomicroscópio de luz Axiphot da Zeiss, do Departamento de Histologia da UEL.

2.2. Detecção de Glicogênio

Para a detecção de glicogênio as lâminas foram previamente tratadas com amilase 0,5% por 2 horas em estufa a 37°C (FIORE-DONNO; BAUME, 1966) submetidas ao PAS e analisadas.

2.3.Deteção de Polissacarídeos Ácidos

Para esta técnica foram utilizados soluções de Azul de Toluidina, por 15 minutos em pH 1,0 (polissacarídeos ácidos altamente sulfatados); pH 2,5: (polissacarídeos ácidos sulfatados); pH 4,0: (polissacarídeos ácidos), conforme protocolo de PEARSE (1972).

2.4.Deteção de Proteínas Totais

2.4.1. Método do Fast Green 0,1% segundo protocolo de Mello e Vidal (1980)

Tratamento dos cortes com solução de Fast Green 0,1 % em ácido acético 1% pH 2,7 (30 minutos), desidratação em butanol, diafanização em xilol, montagem e análise.

2.4.2 Método do Azul de Bromofenol Mercúrio segundo Pearse (1972)

Tratamento dos cortes em solução de Azul de Bromofenol 0,05% e 1% de Cloreto de Mercúrio em ácido acético 2% (2 horas); lavagem em solução aquosa de ácido acético 0,5% (5 minutos), diferenciação em álcool butílico, diafanização, montagem e análise.

2.4.3 Azul de Bromofenol segundo protocolo Coello (1989)

Tratamento dos cortes em solução de Azul de Bromofenol 0,1% em álcool etílico 95% (15 minutos), lavagem dos cortes em solução aquosa de ácido

acético a 0,5% (5 minutos), rápida diafanização em Xilol e montagem com Bálsamo do Canadá.

2.5. Detecção de Lípidos

Para esta técnica, os tubos digestivos foram fixados segundo protocolo de Hernández-Blazquez et al (1989) em solução fixadora de Paraformaldeído 4%, Cloreto de Cálcio 1% e Cloreto de Cádmio 1% durante 24 horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% (tampão fosfato 0,1M pH 7,2) durante 3 horas, desidratados em álcool etílico (90%, 100%), incluídos em historesina (Historesin[®], Kit de inclusão da Leica), cortados com 4µm com navalha de tungstênio, em micrótomo rotativo automático modelo LEICA RM 2265, colocados em lâminas de vidro previamente limpas com álcool éter.

Após obtenção dos cortes histológicos os mesmos foram tratados com solução de peróxido de hidrogênio (10 minutos), corados com solução de Sudan Black B a 1% em álcool etílico 70% (15 minutos), diferenciados em álcool etílico 70%, lavados, montados com glicerina e analisados imediatamente.

3. RESULTADOS

3.1. Polissacarídeos Neutros

Os resultados da detecção histoquímica de carboidratos neutros evidenciados pelo método do Ácido Periódico-Schiff (PAS) estão expressos na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Resultados da reação do PAS, para detecção de polissacarídeos neutros, no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis (LS) e resistentes (LR) ao AgMNPV.

Estruturas		Genótipos											
		BRS 257		BR 16		Dowling		PI 229358		IAC 100		PI 227687	
		LS	LR	LS	LR	LS	LR	LS	LR	LS	LR	LS	LR
Membrana peritrófica		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Células Colunares	Borda Estriada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Porção Apical	+++	++++	-	+	+	+	++	-	++	+++	++	+++
	Porção Média	+++	++++	+	+	++	+	++	-	++	+++	-	+++
	Porção Basal	+++	++++	+	+	++	-	-	-	++	+++	-	+++
	Protusões	-	-	++	-	-	-	+++	-	-	-	-	+++
Células Caliciformes		-	+++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
Células Regenerativas		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Camada Muscular		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

O intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV tratadas com folhas do genótipo testemunha (BRS 257), apresentaram reação PAS positiva apenas na camada epitelial, sendo as células colunares as responsáveis pela positividade nos dois tipos larvais. A reação foi visualizada nas três porções apical, média e basal (Figs. 4.1 A e 4.2 A).

De modo geral a reação foi mais intensa nas células do epitélio das larvas resistentes. Além disso, as LR apresentaram forte reação nas células caliciformes (Fig. 4.2 A).

3.1.1 Larvas Suscetíveis ao AgMNPV

No tratamento com o genótipo BR 16, as colunares mostraram fraca positividade na porção média e basal, enquanto as protusões apresentaram reação moderadamente positiva. As demais estruturas não apresentaram positividade à técnica (Fig. 4.1 B).

Com o tratamento do genótipo Dowling, as células colunares apresentaram grânulos moderadamente positivos nas porções média e basal, enquanto a porção apical apresentou reação fracamente positiva ao PAS (Fig. 4.1 C).

Para o genótipo PI 229358, observou-se positividade nas protusões das células colunares, nas células calciformes e nas células regenerativas, variando na intensidade da coloração entre elas. As células colunares apresentaram grânulos PAS-positivos com reação moderada nas porções apical e média, enquanto que nas protusões citoplasmáticas, a marcação foi intensa (Fig. 4.1 D). As células calciformes apresentaram moderada positividade e as células regenerativas apresentaram fraca reação ao PAS.

No tratamento com o genótipo IAC 100, observou-se moderada positividade ao método, nas três porções citoplasmáticas das células colunares (Fig. 4.1 E). As demais estruturas não apresentaram reatividade ao método.

Para o genótipo PI 227687, somente a porção apical das células colunares apresentaram discreta granulação com moderada positividade (Fig. 4.1F), e as demais estruturas não mostraram positividade ao método.

3.1.2. Larvas Resistentes ao AgMNPV

A reação PAS foi fracamente positiva nas LR tratadas com o genótipo BR16, com a presença de discretos grânulos nas porções apical, média e basal de algumas células colunares (Fig. 4.2 B). As demais estruturas não apresentavam positividade ao método.

No tratamento com o genótipo Dowling, somente algumas células

colunares reagiram fracamente e apresentaram granulação positiva nas porções apical e média, sendo às vezes mais concentradas na porção apical (Fig.4.2 C). As demais estruturas foram PAS negativas.

Para o genótipo PI 229358 houve uma fraca reação de positividade em uma células ao PAS (Fig. 4.2 D).

No tratamento com o genótipo IAC 100, observou-se a presença de grânulos positivos nas três porções das células colunares (apical, média e basal) que proporcionaram uma forte intensidade de reação. As demais estruturas mostraram-se negativas ao método (Fig. 4.2 E)

Para o genótipo PI 227687, as células colunares e as protusões mostraram forte positividade ao método (Fig. 4.2 F). As outras estruturas não apresentaram reação ao método.

3.2 Glicogênio

Os resultados da detecção histoquímica para o glicogênio, precedida pela diastase para larvas suscetíveis e resistentes ao *AgMNPV* estão expressos na tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Resultados histoquímicos para detecção de glicogênio. Reação do PAS precedido pela amilase salivar, no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis (LS) e resistentes (LR) ao AgMNPV.

		Genótipos											
		BRS 257		BR 16		Dowling		PI 229358		IAC 100		PI 227687	
		R: 0		R: 0		R: 0		R: 0,0212		R:0,0972		R: 0,3682	
		G:0		G:0,0016		G:0,0136		G: 0,0136		G: ,0142		G:0,0122	
Estruturas		LS	LR	LS	LR	LS	LR	LS	LR	LS	LR	LS	LR
Membrana peritrófica		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Borda Estriada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Células	Porção Apical	+++	+	-	-	+	-	++	-	+	++	++	+++
Colunares	Porção Média	+++	+	+	-	++	+	++	-	+	++	-	+++
	Porção Basal	+++	+	+	-	++	-	-	-	+	++	-	+++
	Protusões	-	-	+	-	-	-	+++	-	-	-	-	+++
Células Caliciformes		-	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
Células Regenerativas		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Camada Muscular		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

Após a diastase observou-se que para o tratamento testemunha houve grande redução de positividade nas células colunares e caliciformes das larvas resistentes, enquanto que as larvas suscetíveis não apresentaram alterações na positividade de reação.

Para o tratamento com o genótipo BR 16, o intestino médio mostrou redução de positividade em todas as estruturas marcadas no IM das LR, enquanto que nas LS houve redução da positividade somente nas protusões das células colunares.

No tratamento Dowling, as larvas resistentes mostraram redução na positividade apenas na porção apical das células colunares e manutenção da intensidade nas outras porções, enquanto que as larvas suscetíveis não mostraram alteração nas estruturas do IM.

No tratamento IAC 100 houve redução em proporção similar, nas duas populações tanto em larvas suscetíveis quanto em larvas resistentes.

O IM das larvas suscetíveis e resistentes, alimentadas com o genótipos PI 229358 e PI 227687, não mostrou alteração na positividade de reação.

3.3. Polissacarídeos Ácidos

A detecção de polissacarídeos no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV pela reação de Azul de Toluidina em pH 1,0 ; 2,5 e 4,0, não apresentou positividade de reação em todos os métodos testados.

3.4. Proteínas Totais

3.4.1. Fast Green 0,1%

Os resultados da detecção de proteínas totais evidenciados pelo método de Fast Green 0,1% estão expressos na tabela 3.3.

O intestino médio das LS e LR alimentadas com folhas do genótipo testemunha BRS 257, apresentou positividade ao método nas células caliciformes e na camada muscular. Observou-se diferença na intensidade da reação, sendo que LS a reação foi moderada enquanto que em larvas resistentes a reação foi fraca (Figs. 4.3 A e G).

Nas LS as demais estruturas não apresentaram reação positiva ao método aplicado, entretanto em larvas resistentes pode ser evidenciada reação positiva nas células colunares e regenerativas, que tiveram fraca reação ao método (Fig. 4.3 G).

Tabela 3.3 - Resultados histoquímicos para detecção de proteínas totais no intestino médio de larvas de *A.gemmatalis* suscetíveis (LS) e resistentes (LR) ao AgMNPV pelo método de Fast Green 0,1%.

Estruturas	Genótipos											
	BRS 257		BR 16		DOWLING		PI 229358		IAC 100		PI 227687	
	R: 0,0		R: 0,0		R: 0,0		R: 0,0212		R: 0,0972		R: 0,3682	
	G: 0,0		G: 0,0016		G: 0,0429		G: 0,0136		G: 0,0142		G: 0,0122	
	LS	LR										
Membrana Peritrófica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Células Colunares	-	+	+	-	+	-	++	-	+	-	++	-
Células Caliciformes	++	++	+	-	++	-	++	-	++	-	++	+
Células Regenerativas	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Camada Muscular	++	+	-	-	+	-	-	-	-	-	++	-

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

3.4.1.1. Larvas Suscetíveis ao AgMNPV

No tratamento com o genótipo BR 16 houve fraca reação nas células colunares e caliciformes, as demais estruturas não apresentaram positividade (Fig. 4.3 B).

Para o genótipo Dowling as células caliciformes apresentaram reação moderada, as células colunares e a camada muscular apresentaram reação fracamente positiva (Fig.4.3 C), enquanto as demais estruturas não apresentaram positividade.

No tratamento PI 229358 as células colunares e calciformes mostraram reação moderada e as demais estruturas não apresentaram reação positiva (Fig. 4.3 D).

O IM das LS tratadas com o genótipo IAC 100 apresentou reação positiva nas células colunares e nas calciformes, variando apenas na intensidade da reação, nas células colunares a reação foi fraca enquanto que nas calciformes essa reação foi moderada. As demais estruturas não apresentaram reação a este método (Fig. 4.3 E).

Nas larvas tratadas com o genótipo PI 227687 observou-se reação moderadamente positiva nas células colunares, calciformes e na camada muscular (Fig. 4.3 F). As demais estruturas não apresentaram reação ao método aplicado.

3.4.1.2. Larvas Resistentes ao AgMNPV

Somente as células calciformes do epitélio do IM das larvas alimentadas com o genótipo PI 227687 apresentaram fraca reação. Os outros tratamentos não apresentaram positividade.

3.4.2. Azul de Bromofenol Mercúrio

De modo geral, todas as estruturas do intestino médio dos dois tipos larvais, apresentaram reação positiva ao método aplicado. A tabela 3.4 expressa os valores de intensidade de reação das larvas suscetíveis.

Tabela 3.4 - Resultados histoquímicos para detecção de proteína totais no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis (LS) ao AgMNPV - Método de azul de bromofenol mercúrio segundo Pearse (1972).

Estruturas	Genótipos					
	BRS 257	BR 16	Dowling	PI 229358	IAC 100	PI 227687
	R: 0,0 G: 0,0	R: 0,0 G:0,016	R: 0,0 G: 0,0429	R: 0,0212 G: 0,0136	R: 0,0972 G: 0,0142	R: 0,3682 G: 0,0122
Membrana Peritrófica	-	-	-	-	-	-
Protusões	+	+++	+	+++	++	-
Células Colunares						
Citoplasma	++	++	++	++	+++	+++
Núcleo	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Células Caliciformes						
Citoplasma	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Núcleo	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Células Regenerativas						
Citoplasma	-	++	+	-	++	+
Núcleo	++++	++++	++++	++++	++++	+++
Camada Muscular	+	+	+	+	+	+

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

As larvas suscetíveis e resistentes ao AgMNPV alimentadas com os diferentes genótipos apresentaram o mesmo padrão, muito forte, de coloração nuclear em todas as células epiteliais.

No tratamento testemunha (BRS 257) as células caliciformes mostraram forte reação citoplasmática para os dois tipos larvais (Figs. 4.4 A e 4.5 A), enquanto que as células colunares apresentaram intensidade de reação moderada (Fig. 4.4 A e 4.5 A). Além disso, nas LR as células regenerativas apresentaram moderada positividade, diferente das LS que não apresentaram positividade.

A bordadura estriada, protusões e camada muscular, nos dois tipos larvais mostraram uma fraca positividade, enquanto a membrana peritrófica não apresentou reação.

3.4.2.1. Larvas Suscetíveis ao AgMNPV

No tratamento com o genótipo BR 16, as células regenerativas e colunares apresentaram reação moderada em todo o citoplasma (Fig. 4.4 B), porém observou-se que as protusões das colunares eram bem marcadas com variações na intensidade de coloração bastante evidentes naquelas que possuíam material nuclear em seu interior (Fig. 4.4 B), enquanto que as células caliciformes apresentaram forte reação citoplasmática (Fig. 4.4 B). A MP não apresentou positividade ao método e a camada muscular mostrou fraca reação em pontos (Fig. 4.4 B). Algumas estruturas foram visualizadas com variações de azul escuro ao vermelho, a exemplo dos três tipos celulares e as protusões. Tal fato pode estar relacionado com a concentração de proteínas encontradas nessas estruturas do intestino médio.

Observou-se positividade ao método em todas as estruturas para o tratamento Dowling, com exceção da membrana peritrófica. O citoplasma das células caliciformes apresentou forte reação; as colunares apresentaram moderada reação e a regenerativas fraca reação (Fig. 4.4 C). A camada muscular apresentou fraca reação. Observou-se também neste tratamento variação na tonalidade de cor de reação entre azul e vermelho (Fig. 4.4 C).

No tratamento PI 229358 observou-se positividade no citoplasma das células colunares e caliciformes e na camada muscular (Fig. 4.4 D). As células regenerativas e a membrana peritrófica não mostraram positividade ao método.

As células caliciformes apresentaram forte reação, enquanto que as células colunares apresentaram moderada reação citoplasmática e forte reação nas protusões (Fig. 4.4 D). A camada muscular mostrou fraca reação à técnica aplicada.

Neste tratamento pode ser observada variação de tonalidades de cor de reação, variando do azul ao vermelho.

No tratamento com o genótipo IAC 100, as células caliciformes e colunares mostraram forte reação citoplasmática, no entanto as protusões apresentaram moderada reatividade, semelhante a apresentada pelas células regenerativas (Fig. 4.4 E), enquanto a camada muscular mostrou fraca positividade em pequenos fragmentos de músculos (Fig. 4.4 E). A membrana peritrófica não apresentou positividade.

Para o genótipo PI 227687, o citoplasma das células colunares e caliciformes apresentou forte positividade, enquanto que as células regenerativas e a camada muscular apresentaram fraca reatividade (Fig. 4.4 F). Não se observou reatividade na membrana peritrófica.

3.4.2.2. Larvas Resistentes ao AgMNPV

A tabela 3.5. expressa os valores de intensidade de reação das larvas resistentes.

Para as células colunares as reações nucleares foram: muito fortes (BRS 257, IAC 100 e PI 227687) e negativas para os outros genótipos (Figs. 4.5 A, B e C). As reações citoplasmáticas foram: moderadas (BRS 257, PI227687), fraca para IAC 100 e negativas para os demais genótipos (Fig. 4.5 B).

Para as células caliciformes as reações nucleares foram: muito fortes BRS 257, IAC 100 e PI 227687 (Figs. 4.5 A, B e C), moderada Dowling e negativa BR16 e PI229358. O citoplasma destas células apresentou reação: forte IAC 100, PI 227687 (Figs. 4.5 B e C), moderada BRS 257 e Dowling e negativa para os demais (Fig. 4.5 A).

As células regenerativas apresentaram reações nucleares muito fortes nos genótipos BRS 257 IAC 100 e PI 227687 (Figs. 4.5 A, B e C) e negativas para os demais genótipos. O citoplasma apresentou reação fraca para PI 227687 e para os outros demais genótipos apresentou reações negativas (Fig. 4.5 C).

A camada muscular apresentou fraca reação para o genótipo BRS 257 (Fig. 4.5 A) e reação negativa para os demais genótipos, enquanto que a membrana peritrófica mostrou-se negativa em todos os tratamentos.

Tabela 3.5 - Resultados histoquímicos para detecção de proteína totais no intestino médio de larvas de *A. gemmatilis* resistentes (LR) ao AgMNPV - Método de azul de bromofenol mercúrio segundo Pearse (1972).

Estruturas	Genótipos					
	BRS 257	BR 16	Dowling	PI 229358	IAC 100	PI 227687
	R: 0,0 G: 0,0	R: 0,0 G: 0,016	R: 0,0 G: 0,0429	R: 0,0212 G: 0,0136	R: 0,0972 G: 0,0142	R: 0,3682 G: 0,0122
Membrana Peritrófica	-	-	-	-	-	-
Protusões	++	-	-	-	-	-
Células Citoplasma	++	-	-	-	+	++
Colunares Núcleo	++++	-	-	-	++++	++++
Células Citoplasma	++	-	++	-	+++	+++
Caliciformes Núcleo	++++	-	++	-	++++	++++
Células Citoplasma	-	-	-	-	-	+
Regenerativas Núcleo	++++	-	-	-	++++	++++
Camada Muscular	+	-	-	-	-	-

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

3.4.3. Azul de Bromofenol

Os resultados da detecção de proteínas totais evidenciados pelo método de azul de bromofenol segundo Coello 1989, estão expressos na tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Resultados histoquímicos para detecção de proteína totais no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis (LS) ao AgMNPV - Método de azul de bromofenol segundo Coello (1989).

Estruturas	Genótipos					
	BRS 257	BR 16	Dowling	PI 229358	IAC 100	PI 227687
	R: 0,0 G: 0,0	R: 0,0 G: 0,016	R: 0,0 G: 0,0429	R: 0,0212 G: 0,0136	R: 0,0972 G: 0,0142	R: 0,3682 G: 0,0122
Membrana Peritrófica	-	-	-	-	-	-
Células Protusões	-	+++	-	++	-	-
Colunares Citoplasma	++	+	++	+	+	+
Núcleo	++++	-	++++	+++	+++	+++
Células Citoplasma	+++	-	+++	++	++	+
Caliciformes Núcleo	++++	-	++++	+++	+++	+++
Células Citoplasma	-	-	-	-	-	+
Regenerativas Núcleo	++++	+	+++	+	+++	+++
Camada Muscular	++	++	-	+	-	-

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

3.4.3.1. Larvas Suscetíveis ao AgMNPV

Esta metodologia apresentou reação muito forte nos núcleos das células colunares, caliciformes e regenerativas nas larvas suscetíveis tratadas com o genótipo BRS 257; IAC 100; PI 227687 (Figs. 4.6 A , E e F), enquanto que as larvas tratadas com o genótipo Dowling apresentaram reação muito forte nos núcleos das células colunares e caliciformes e reação forte no núcleo das células regenerativas (Fig. 4.6 C).

As larvas tratadas com o genótipo PI 229358 apresentaram reação forte nos núcleos das células colunares e caliciformes e reação fraca no núcleo das células regenerativas (Fig. 4.6 D).

Quanto às larvas tratadas com o genótipo BR 16 só observou-se resultado fracamente positivo no núcleo das células regenerativas (Fig. 4.6 B).

3.4.3.2. Larvas Resistentes ao AgMNPV

Os resultados da detecção de proteínas totais em larvas resistentes ao AgMNPV evidenciados pelo método de azul de bromofenol segundo Coello 1989, estão expressos na tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Resultados histoquímicos para detecção de proteína totais no intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* resistentes (LR) ao AgMNPV - Método de azul de bromofenol segundo Coello (1989).

Estruturas	Genótipos					
	BRS 257	BR 16	Dowling	PI 229358	IAC 100	PI 227687
	R: 0,0 G: 0,0	R: 0,0 G: 0,016	R: 0,0 G: 0,0429	R: 0,0212 G: 0,0136	R: 0,0972 G: 0,0142	R: 0,3682 G: 0,0122
Membrana Peritrófica	-	-	-	-	-	-
	Protusões	++	-	-	-	-
Células	Citoplasma	+	-	+	-	++
Colunares	Núcleo	+++	-	+++	-	++++
Células	Citoplasma	++	-	-	+	++
Caliciformes	Núcleo	+++	-	-	++	+++
Células	Citoplasma	-	-	-	-	+
Regenerativas	Núcleo	+	-	-	-	+++
Camada Muscular		+	-	-	-	-

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

As células colunares apresentaram reações nucleares: muito forte (PI227687); forte (BRS 257, Dowling e IAC100), negativa (BR 16 e PI 229358). As

reações citoplasmáticas foram: moderada (PI 227687); fraca (BRS 257, Dowling e IAC 100) e negativas BR16 e PI 229358 (Figs. 4.6 G, H e I).

Os núcleos das células caliciformes apresentaram reações: fortes nos tratamentos BRS 257 e IAC 100 (Figs. 4.6 G e H); moderada (PI229358) e negativas (BR16, Dowling e PI 227687). As reações citoplasmáticas foram: moderadas nos genótipos BRS 257 e IAC 100 (Figs. 4.6 G e H), fraca para os tratamentos PI 229358 e negativas nos genótipos BR16, Dowling, PI 227687.

Para células regenerativas as reações nucleares foram: forte no tratamento IAC 100 (Fig. 4.6 H) , fracas nos genótipos BRS 257 e PI 227687 (Figs. 4.6G e I) e negativas (BR16; Dowling, PI 229358), enquanto que o citoplasma apresentou reação fraca para o genótipo IAC 100 e negativa para os demais genótipos (Fig. 4.6 H).

3.5. Lipídeos

Após a reação histoquímica para detecção de lipídeos o intestino médio de larvas suscetíveis de *A. gemmatalis* não apresentou grânulos positivos de lipídeos no epitélio do intestino médio dessas larvas, entretanto em larvas resistentes houve pontuações positivas em alguns tratamentos.

Em larvas resistentes tratadas com o genótipo IAC 100 pode se notar a presença de reação nas células colunares e caliciformes indicando a presença de lipídeos estruturais (formadores de membrana) e alguns grânulos positivos nas protusões citoplasmáticas (Fig. 4.7 B).

No tratamento PI 229358 os grânulos positivos podem ser observados nas células colunares a , as demais estruturas não tiveram reação ao método (Fig. 4.7 A).

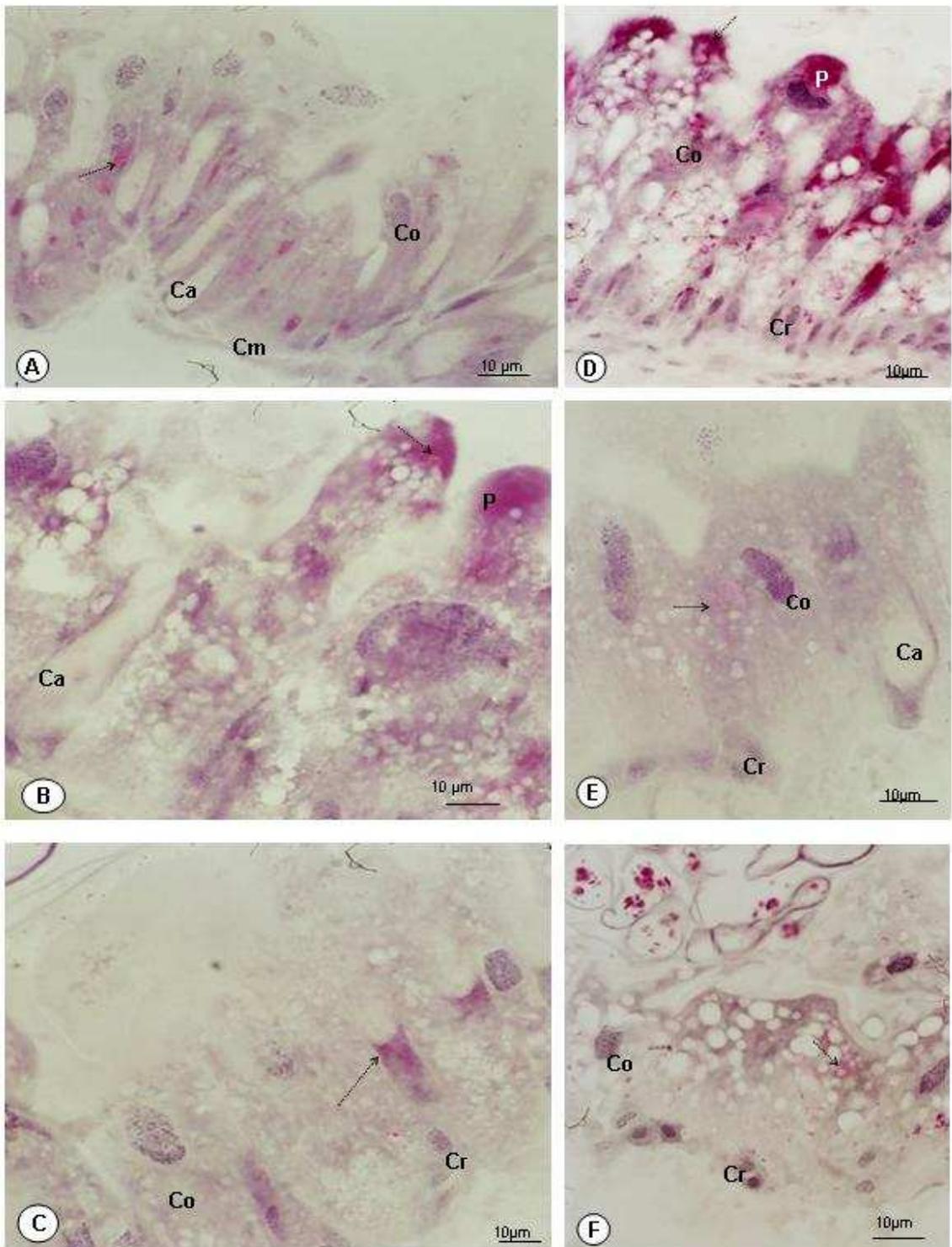
Para as larvas resistentes do tratamento PI 227687 o epitélio do intestino médio mostrou reação positiva apenas nas protusões citoplasmáticas liberadas pelas células colunares com presença de poucos grânulos positivos (Fig. 4.7 C).

Os demais tratamentos (BRS 257, BR 16, Dowling) não apresentaram grânulos positivos em suas estruturas.

4. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

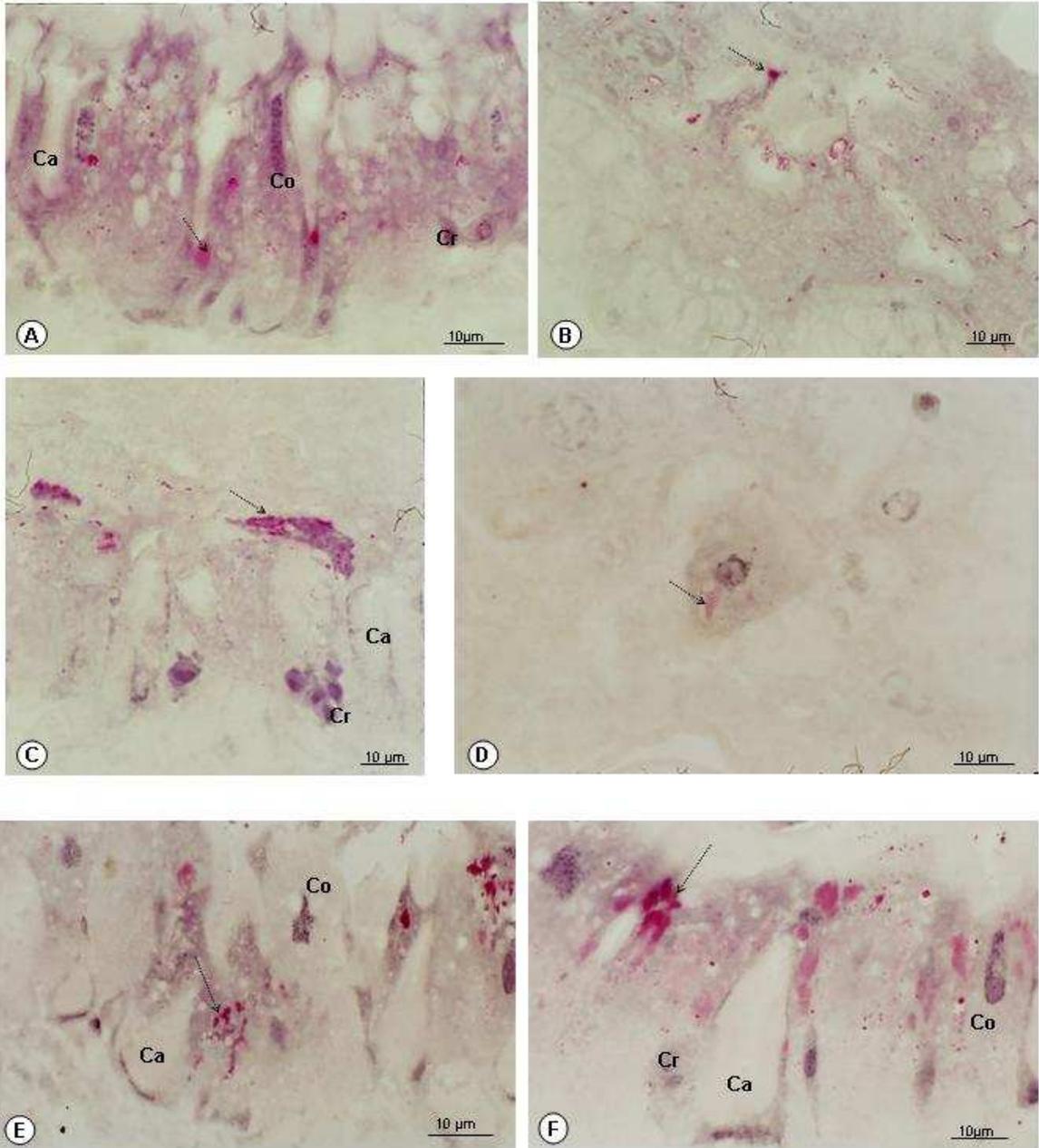
4.1 Fotomicrografias do Intestino Médio de larvas *A. gemmatalis* suscetíveis ao AgMNPV tratadas com os genótipos: BRS 257 (A); BR16 (B); Dowling (C), PI 229358 (D), IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica para polissacarídeos neutros (PAS).

Presença de células colunares (Co) com grânulos PAS positivos (→); protusões citoplasmáticas (P) com grânulos PAS positivos (→). Células caliciformes (Ca) com grânulos PAS positivos (→); Células regenerativas (Cr) com grânulos PAS positivos (→). Barras =10µm.



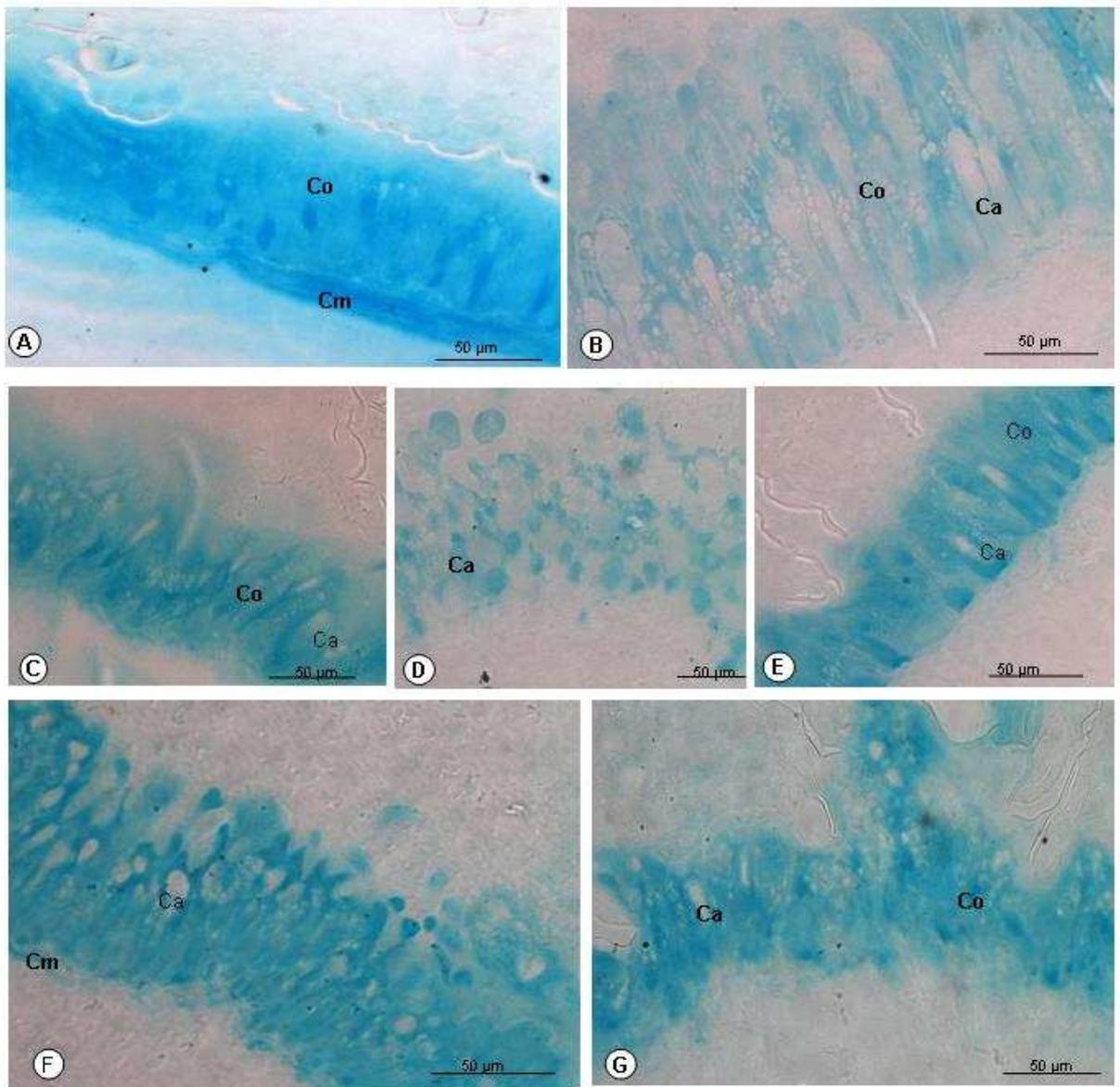
4.2 Fotomicrografias do Intestino Médio de larvas *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos: BRS 257 (A); BR16 (B); Dowling (C), PI 229358 (D), IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica para polissacarídeos neutros (PAS).

Presença de células colunares (Co) com grânulos PAS positivos (→); Células caliciformes (Ca); Células regenerativas (Cr). Barras = 10µm.



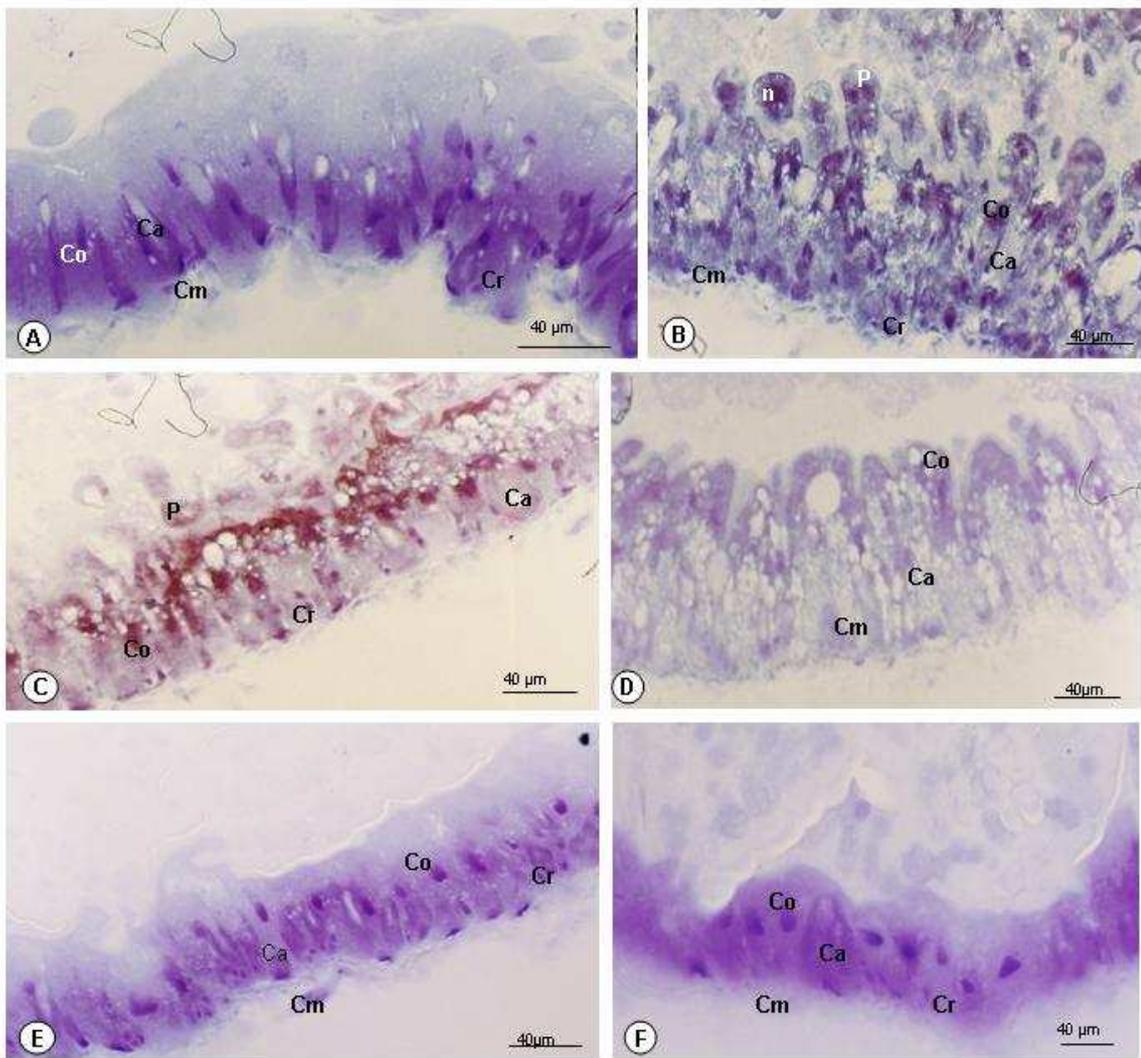
4.3 Fotomicrografias do Intestino Médio de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A e G); BR16 (B); Dowling (C), PI 229358 (D), IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica proteínas totais Fast Green 0,1%.

Reação positiva ao método Fast Green nas células colunares (Co); Células caliciformes (Ca) e Camada muscular (Cm). Barras= 50µm.



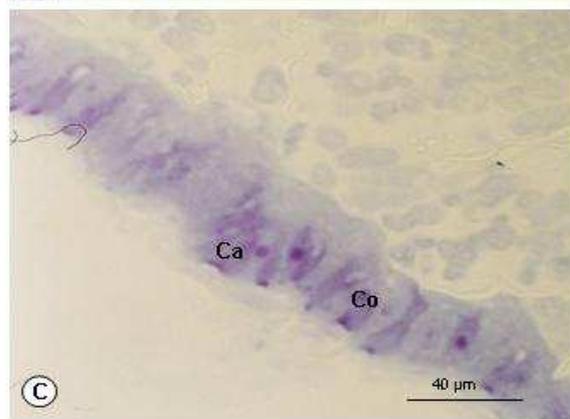
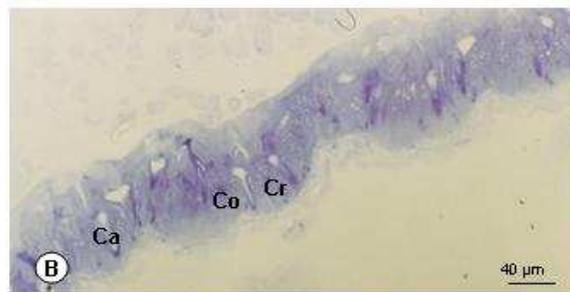
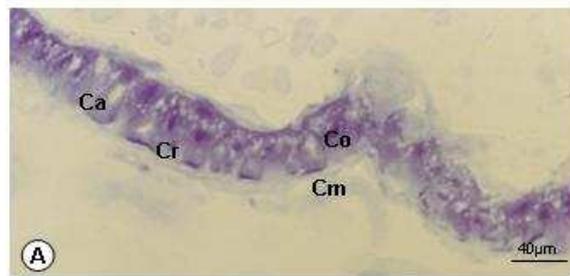
4.4 Fotomicrografias do Intestino Médio de larvas *A. gemmatalis* suscetíveis ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A); BR16 (B); Dowling (C), PI 229358 (D), IAC 100 (E) e PI 227687 (F). Histoquímica de proteínas totais com azul de bromofenol mercúrio segundo Pearse (1972)

Células colunares (Co) com protusões citoplasmáticas (P) com núcleo (n); Células caliciformes (Ca); Células regenerativas (Cr). Camada muscular (Cm) .Barras= 40µm



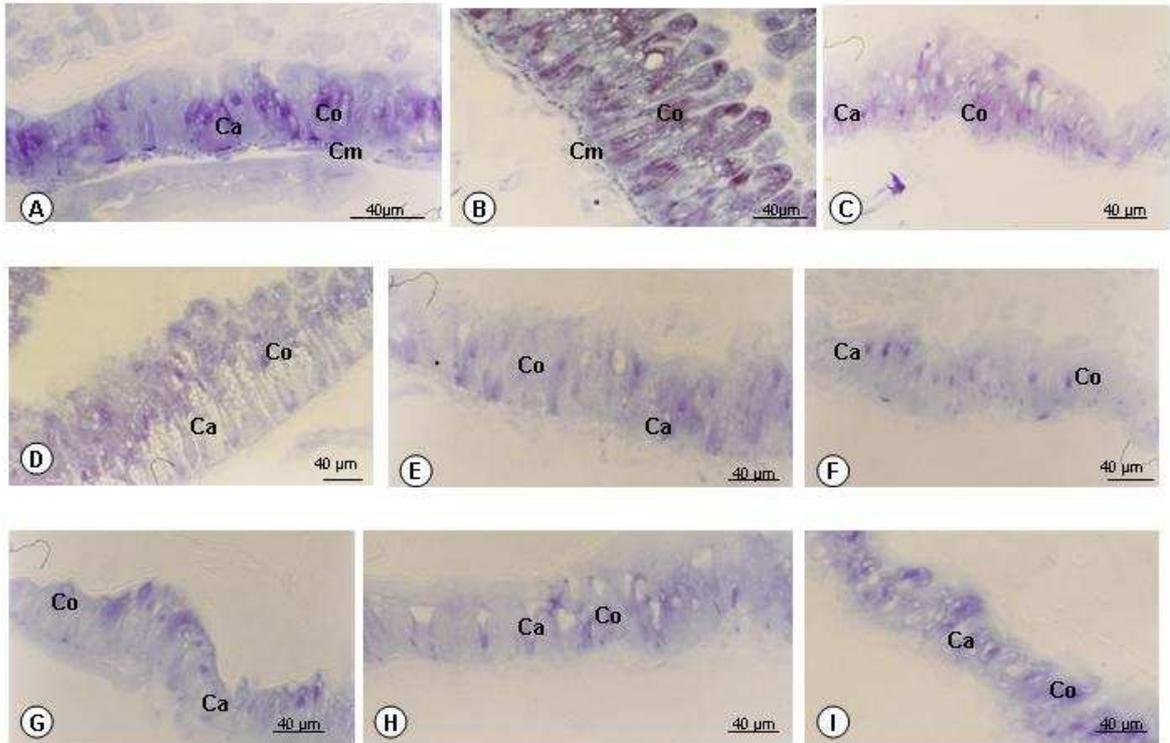
4.5 Fotomicrografias do Intestino Médio de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A), IAC 100 (B) e PI 227687 (C). Histoquímica para detecção de proteínas totais com azul de bromofenol mercúrio segundo Pearse (1972)

Células colunares (Co) Células caliciformes (Ca); Células regenerativas (Cr). Barras= 40µm



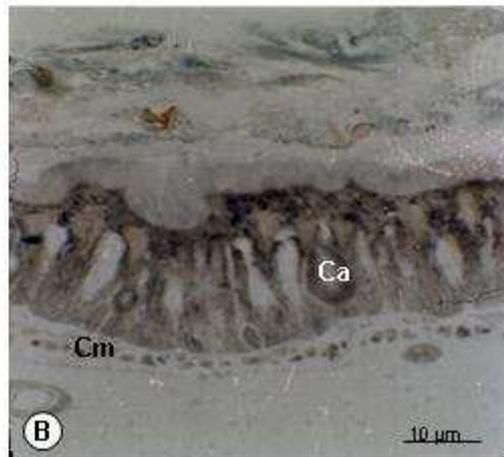
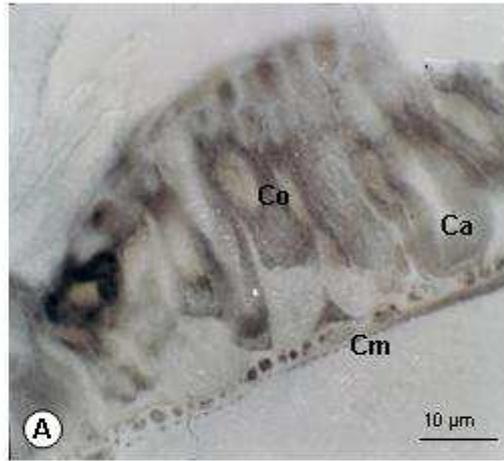
4.6 Fotomicrografias do Intestino Médio de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos BRS 257 (A e G), BR 16 (B); Dowling (C); PI 229358 (D); IAC 100 (E e H) e PI 227687 (F e I). Histoquímica para detecção de proteínas totais com azul de bromofenol segundo Coello (1989)

Células colunares (Co); Células caliciformes (Ca); e camada muscular (Cm). Barras= 40µm.



4.7 Fotomicrografias do Intestino Médio de *A. gemmatalis* resistentes ao AgMNPV tratadas com os genótipos PI 229358 (A); IAC 100 (B) e PI 227687 (C). Histoquímica detecção de lipídeos segundo Hernández-Blazquez et al (1989).

Células colunares (Co) com protusões citoplasmáticas (P); Células caliciformes (Ca) e camada muscular (Cm). Barras= 10µm.



5. DISCUSSÃO

A camada epitelial do intestino médio das larvas de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, apresentaram diferentes níveis de intensidade de reação aos métodos histoquímicos propostos, nos três tipos celulares, variando de acordo com o tratamento.

As células colunares foram as que apresentaram maior positividade ao método do Ácido Periódico-Schiff (PAS), com presença de grânulos PAS+ distribuídos irregularmente por todo o citoplasma celular. Em ambas as populações larvais, o tratamento com o genótipo BRS 257 apresentou maior intensidade de grânulos PAS positivos. Os tratamentos IAC 100 e PI 227687 apresentaram forte positividade, porém somente em larvas resistentes, enquanto que nas LS os IM apresentaram respectivamente, moderada e fraca positividade. Outro componente da camada epitelial que mostrou intensa concentração de grânulos PAS positivos foram as protusões citoplasmáticas das larvas suscetíveis tratadas com o genótipo PI 229358 e moderadamente positiva para o genótipo BR16, e em larvas resistentes após tratamento com o genótipo PI 227687.

A presença de grânulos PAS positivos nas células colunares e nas protusões do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes são corroboradas pelos resultados encontrados por alguns autores que identificaram essas estruturas nas células colunares e protusões citoplasmática do intestino médio em larvas de outros lepidópteros como em *Diatrea saccharalis* (PINHEIRO et al., 2008); *Spodoptera frugiperda* (CORREIA et al., 2009); *Alabama argilacea* (SOUZA et al., 2009).

A identificação desse material não está restrita à ordem Lepidoptera, sendo identificados em outras ordens e espécies de insetos como em *Triatoma infestans* (Hemíptera-Heteroptera) relatado por Burgos; Gutierrez (1976); *Dermatobia hominis* e *Aedes aegypti*, (Diptera) por Lello; Vieira, 2001; Arruda; Oliveira, Silva (2003) e *Tropidacris collaris* Orthoptera Wanderley-Teixeira (2006).

Segundo Terra e Ferreira (1991) esses polissacarídeos encontrados nas células colunares têm como funções a absorção de produtos da digestão e produção de enzimas, podendo variar em concentração de acordo com a região do

intestino médio, sendo que a maior concentração foi evidenciada na região distal do intestino médio (RIBEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 2008).

Em células caliciformes essa reação é raramente encontrada, e quando localizadas a reação ocorre principalmente no citoplasma dessas células, em nossos trabalhos a reação ocorreu apenas nas células caliciformes do intestino médio de larvas resistentes do tratamento com o genótipo BRS 257 e nas larvas suscetíveis tratadas com o genótipo PI 229358. Pinheiro et al. (2008) identificaram grânulos PAS+ nesse mesmo tipo celular em larvas de *Diatrea saccharalis* e sugeriram, à exemplo de outros autores, que a presença de polissacarídeos pode estar relacionada com a atividade destas células no auxílio às células colunares como absorção de metabólitos e homeostasia iônica (MOFFET et al., 1995; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998).

As células regenerativas apresentaram material PAS+ apenas no tratamento PI 229358 para larvas suscetíveis. Lehane e Billingsley (1996) relataram que pelo fato destas células estarem envolvidas no processo de renovação epitelial, elas apresentariam o material PAS positivo. Este fato também foi relatado em larvas de *Aedes aegypti*, no qual estas apresentavam intensa atividade na renovação epitelial (ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003).

A reação PAS positiva indica a presença de polissacarídeos neutros, que podem representar depósito de glicogênio e outros açúcares neutros. Os depósitos de glicogênio foram identificados após a diastase, no qual as lâminas contendo os cortes de IM e submetidas ao PAS apresentaram redução em alguns tratamentos em relação à intensidade dos grânulos PAS positivos. Os tratamentos BRS 257 (testemunha), BR16 e Dowling apresentaram diminuição apenas para LR, enquanto para as LS a intensidade foi mesma. Assim podemos inferir que as LS tratadas com estes genótipos apresentaram polissacarídeos neutros nas suas células, porém não o glicogênio.

O tratamento IAC 100 foi o único que apresentou diminuição da positividade em ambos os tipos larvais, indicando que estas larvas apresentavam grande quantidade de glicogênio em suas células. Nos demais tratamentos ocorreram alterações pontuais no decorrer do intestino médio, variando de acordo com o tratamento e a estrutura de reação.

De acordo com Kilby (1965) o glicogênio e outros carboidratos são importantes no metabolismo, pois é considerada uma reserva importante que pode

ser mobilizada e utilizadas em situações que exija o gasto energético do inseto como mudas (metamorfose), reprodução, defesa, entre outros fatores.

Hock, Pilarska e Dobart ao estudarem larvas de *Lymantria díspar* (Lepidoptera: Lymantriidae) verificaram que a concentração de glicogênio aumentava conforme o nível de desenvolvimento larval tanto em larvas sadias como em infectadas com o entomopatógeno *Endoreticulatus schubergi*, entretanto após alguns dias de infecção essa concentração de glicogênio reduzia drasticamente nas larvas infectadas e as sadias apresentavam níveis superiores de concentração de glicogênio. Nossos resultados indicaram que o polissacarídeo presente no citoplasma das células do intestino médio das larvas suscetíveis, não é um polissacarídeo energético, como o glicogênio e sim polissacarídeo estrutural, podendo ser até quitina, um polissacarídeo estrutural bastante comum nos artrópodes.

Entre os polissacarídeos encontram-se outros grupos os chamados ácidos e que podem ser classificados como polissacarídeos ácidos altamente sulfatados; polissacarídeos ácidos sulfatados e polissacarídeos ácidos. O intestino médio das larvas suscetíveis e resistentes após serem submetidos ao processo histoquímico de azul de toluidina em diferentes pHs, não apresentaram reação ao método, pois de acordo com Pearse (1972) a presença desses ácidos seria evidenciada pela coloração azul ou coloração rósea, e o IM destas larvas, não apresentou nenhuma reação, indicando a ausência de carboidratos ácidos.

Além dos polissacarídeos outras substâncias estão presentes nos insetos, como as proteínas que tem funções variadas nos insetos como a produção de fios de seda ou de glândulas de veneno (CHAPMAN, 1998).

Dean et al., (1985) relatam que as proteínas estão presentes na grande maioria das ordens de insetos exceto em Hymenoptera que não tem relatos da presença de grânulos protéicos.

Em nossos estudos a reação histoquímica de proteínas, pelo Fast Green, no intestino médio de larvas suscetíveis de *A. gemmatalis*, mostrou-se positiva com presença de grânulos protéicos nas células caliciformes de todos os tratamentos, na camada muscular (BRS257, Dowling e PI 227687) e nas células colunares (Dowling e PI 227687). Em larvas resistentes somente a testemunha (BRS 257) apresentou os grânulos na maioria das estruturas enquanto que o genótipo PI 227687 mostrou reação nas células caliciformes. Nossos resultados são

corroborados pelos dados de Lehninger (2006) o qual divide as proteínas em duas classes fibrosas (funções estruturais em células e tecidos) conforme descrito em nossos resultados e a globular função fisiológica.

Com o método de Pearse (1972) para detecção de proteínas totais pelo azul de bromofenol mercúrio, observamos a presença de proteínas no epitélio do intestino médio de larvas suscetíveis em todos os tratamentos, e nas larvas resistentes, alguns tratamentos apresentaram positividade ao método aplicado como BRS 257, Dowling, IAC 100 e PI 227687. Segundo Pearse (1972) a reação apresenta a maioria das proteínas com coloração azul claro com leve tendência para o verde, o que também foi observado por nós, nos núcleos celulares, na camada muscular, protusões citoplasmáticas tanto em larvas suscetíveis quanto resistentes, variando na intensidade de coloração.

As protusões citoplasmáticas apresentavam geralmente núcleos das células colunares, por isto esta forte reação.

A presença de proteínas pode estar relacionada a diversos fatores como a ecdise dos insetos, fonte de reserva de energia principalmente em períodos de falta de alimento, formação de tecidos e injúrias (DEAN et al., 1985).

Rocha (2009) em estudo com *Triatoma vitticeps* observou nas células digestivas do intestino médio desses insetos um acúmulo de proteínas em insetos que estavam em “jejum alimentar”, e quanto mais dias em jejum, maior era a concentração dessas proteínas. Este fato pode estar correlacionado às injúrias sofridas e ao acúmulo de proteínas no organismo e que serão convertidas para a manutenção dos órgãos do inseto.

Considerando que os insetos utilizam-se de várias moléculas acumuladas em seu organismo nos processos evolutivos (metamorfose) como também na sua proteção e manutenção de seus órgãos, os lipídeos são substâncias que auxiliam nesses processos.

Os lipídeos possuem a característica de apresentar um valor energético maior que os carboidratos, dessa forma tornando-se fontes energéticas que podem ser acumuladas no organismo dos insetos para serem utilizadas durante o seu desenvolvimento.

A reação histoquímica para a determinação de lipídeos no epitélio do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes mostrou presença de poucas gotas de lipídeos somente em larvas resistentes dos

tratamentos IAC 100, PI 229358 e PI 227687, os demais tratamentos não apresentaram reação positiva ao método aplicado.

Pinheiro (2001) analisando o as regiões do intestino médio de *Diatrea saccharalis* observou presença de gota de lipídeos nessas três regiões e em todas as células epiteliais. Em *A. gemmatalis* concentrações maiores de lipídeos são encontradas no corpo gorduroso conforme relatado por Carvalho, (2008), e cuja disponibilidade dessa reserva se dá no estágio de pupa. Este fato também foi observado em larvas de *Lymantria dispar* que apresentou níveis de lipídeos em concentração maior em larvas de quinto e sexto ínstar tanto em larvas sadias como infectadas com vírus.

6. CONCLUSÕES

As técnicas histoquímicas aplicadas mostraram que o intestino médio de larvas de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, apresentaram em suas estruturas, compostos como polissacarídeos neutros, glicogênio, proteínas e lipídeos. Estes compostos exercem funções diferentes, tanto na manutenção de tecidos quanto na sua fisiologia celular, principalmente das células epiteliais:

Com relação aos polissacarídeos neutros, o intestino médio das larvas suscetíveis e resistentes quando comparadas com a testemunha apresentaram maior positividade ao PAS nos tratamentos IAC 100, e em PI 227687 em larvas resistentes, principalmente nas células colunares, sendo que nestas células, a maior participação, para o genótipo IAC 100 foi de polissacarídeos de reserva, neste caso o glicogênio, enquanto que nos outros genótipos a presença era de polissacarídeo estrutural.

As proteínas totais foram evidenciadas com intensa marcação nas células colunares, pelo fast green 0,1% em todos os tratamentos em larvas suscetíveis, enquanto que as larvas resistentes não apresentaram reação em todos os tratamentos. Pelo método do azul de bromofenol mercúrio os tratamentos que tiveram maior concentração de proteínas foram BR 16, Dowling e IAC 100 com reações variando entre todas as estruturas do epitélio intestinal, sendo que em

larvas resistentes os resultados foram notados em IAC 100 e PI 227687. Pela reação histoquímica do azul de bromofenol, o genótipo PI 229358 apresentou maior concentração de proteínas em comparação aos demais tratamentos, e nas larvas resistentes o tratamento IAC 100 mostrou maior reação positiva. Assim pelas técnicas utilizadas o tratamento com o genótipo IAC 100, tanto em larvas suscetíveis quanto resistentes ao *AgMNPV*, foi o que apresentou maior concentração de proteínas na camada epitelial do intestino médio, principalmente nas células caliciformes.

Com relação aos lipídeos as larvas resistentes foram as que apresentaram gotas de lipídeos quando tratadas com os genótipos PI 229358, IAC 100 e PI 227687.

Dessa maneira a presença dessas substâncias químicas indica uma resposta do sistema fisiológico do inseto a ação das substâncias tóxicas no intestino médio.

7. REFERÊNCIAS

- ABOT, A.R.; et al. Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. **Biological Control**, v.7, n. 1, p.126-130, ago. 1996.
- APPEL, H.M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, n.7, p.1521-1551, jul.1993.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.; SILVA, I.G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.17-25, jan-fev. 2003.
- BILLINGSLEY, P.F.; LEHANE, M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: LEHANE, M.J., BILLINGSLEY, P.F. (Eds). **Biology of the Insect Midgut**. Londres: Chapman & Hall, 1996, p.3-30.
- BINDER, B.F.; BOWERS, W.S. Precocene II-induced changes in the anatomy of midgut goblet cells of last instar larvae of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Insect Morphology e Embriology**. Ouxford v. 23, n.2, p.127-134, abr. 1994.
- BROWN, M.R., RAIKEL, A.S., LEA, A.D. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. **Tissue and Cell**, Ouxford v.17, n.5, p. 709-722, ago. 1985.
- BURGOS, M.H.; GUTIÉRREZ, L.S. The intestine of *Triatoma infestans*. **Journal of Ultrastructure Research**, v.57, p.1-9, 1976.
- CARVALHO, R.B.R. **Estudo histológico, histoquímico e ultraestrutural do corpo gorduroso de larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia).Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina
- CAVALCANTE, V.M.; CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. **Naturalia**, Rio Claro, v.24, p. 19-40, 1999.
- CERRI, P., SASSO-CERRI, E. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. **Micron**, v.34, n.8, p.365, 2003.
- CHAPMAN, R.F. **The Insects: structure and function**. 4.ed. Cambridge: Harvard University Press, 1998.
- CHIANG, A.S.; YEN, D.F.; PENG, W.K. Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. **Journal Invertebrate Pathology**, v.47,n.3, p.333-339, maio 1986.

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

COELLO, S.A. A new staining schedule for formalin-fixed, glycol methacrylate-embedded fish ovaries. **Journal Fish Biology**, v.34, p.195-213, 1989.

CORREIA, A.A. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. **Neotropical Entomology**, Vacaria, v.38, n.1, p.83-91, jan-fev. 2009.

DEAN, R.L. et al., Structure of fat body. In: KERBUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985, p.155-210, v.3

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

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

FELTON, G.W. et al. Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, California, v.15, n.12, p.2667-2694, 1989.

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

FIORÉ-DONNO, G.; BAUME, L.J. Étude histochimique de la dentinogenese humaine. *Helvetica odontologica acta*, v. 10, Supplementum IV, 1996.

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

GAZZONI, D. L.; et al. **Manejo de pragas da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1988.

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

GRANADOS, R.R.; LAWLER, K.A. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. **Virology**, New York, v.108, n.30, p.297-308, jan. 1981.

GRANADOS, R.R.; WILLIAMS, K.A. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986, p.89-108 v.1.

HARBONE, J.B. Flavonoid pigments. In: ROSENTHAL, G.A.; BEREMBAUM, M.R. (Eds.). **Herbivores and their interaction with secondary metabolites**. London: Academic Press, 1991, p.389-429.

HERNÁNDEZ-BLAZQUEZ, F.C.; et al., Fat intestinal absorption in the catfish A histochemical study in glycol methacrylate embedded tissue. **Gegenbaur morphology Jahrb. Leipzig**, v.135 , p.941-946, 1989.

HOCH,G.; PILARSKA, D.K.; DOBART, N. Effect of midgut infection with the microsporidium *Endoreciculatus schubergi* on carbohydrate and lipid levels in *Lymantria dispar* larvae. **Journal Pest Science**, v.82, p. 351-356, jun. 2009

HOFFMANN-CAMPO,C.B.; et al. Mecanismos de resistência de genótipos de soja: teste de não-preferência para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep.:Noctuidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p. 513-519, abr. 1994.

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

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; et al. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2000.

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

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; et al. Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.10, p. 1453-1459, out. 2006.

KAWANISHI, C.Y.; et al. Entry of insect virus *in vivo* by fusion of viral envelope and microvilli membrane. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.20, p.104-108, jul. 1972.

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

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

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

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

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (Eds.). **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2006

LELLO, E ; VIEIRA, A.M. Desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.) (Diptera:Cuterebridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, p.91-98, 2001.

LEVY, S.M. *et al.* The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biopogy**, São Paulo, v.64, n. 3b, p.1-6, ago. 2004.

LEVY, S.M.;et al. A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.101, n.1, p.17-22, abr. 2009.

LIMA, L.R.P. et al. Determinação da atividade de lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina. **Revista de Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 626-631, jul./set. 1999.

LISON, L. **Histochemie et Cytochemie Animales, Principes et Méthods**. Paris: Gauthier-Villars, 1960, v.2.

LOPES, R.M. et al. Efeito de diferentes doses de rutina sobre as concentrações de albumina, creatina, uréia e ácido úrico no soro de coelhos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 86, n.1, p. 35-38, jan. 2005.

MCMANUS, J.F.A.; CASON, J.F. Carbohydrates Histochemistry Studied by Acetylations Techniques. I Periodic Acid Methods. **The Journal of Experimental . Medicine**. Rockefeller, v.91, p. 651-654, 1950.

MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C. **Práticas em biologia celular**. São Paulo: Edgar Blücher, 1980.

MOFETT, F.; KOCH, A. Electrophysiology of K⁺ transport by midgut epithelium of lepidopteran insect larvae. **The Journal of Experimental Biology**, Londres, v.198, n.10, p.2115-2125,out. 1995.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis* modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed). **Controle biológico**. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA, 2000, v.3, p.163-200.

MOSCARDI, F.; CARVALHO, R.C.Z. Consumo e utilização de soja por *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) infectada, em diferentes estádios larvais,

por seu vírus de poliedrose nuclear. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.22, n.2, p.267-280, jun.1993.

OMYILAGHA, J.C.; GROTEWOLD, E. The biology and structural distribution of surface flavonoids. **Recent Research developments in plant science**, Columbus Ohio, v.2, p. 53-71, 2004.

PANIZZI, A.R. Manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: CROCOMO, W.B. (Ed.). **Manejo integrado de pragas**. São Paulo: UNESP-FUNEP, 1990. p.293-321.

PATEL, N.; HAYES, T.K., COAST, G.M. Evidence for the hormonal function of a CRF-related diuretic peptide (*Locusta*-DP) in *Locusta migratoria*. **The Journal of Experimental Biology**, Londres, v.198, n. 3, p.793-804, mar. 1995.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry**: theoretical and applied. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1972.

PINHEIRO, D.O. **Morfologia de células epiteliais em diferentes regiões do mesêntero de larvas de *Diatrea saccharalis*, Fabricius 1794 (Lepidoptera: Pyralidae)**. 2001 Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP Campus de Botucatu, Botucatu.

PINHEIRO, D.O. et al., Morphological Regional Differences of Epithelial Cells along the Midgut in *Diatrea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) Larvae. **Neotropical Entomology**, Vacaria, v.37, n.4, p.413-419, jun./ago. 2008.

PIUBELLI, G.C. **Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais**. 2004.Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Entomologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 152p.

PIUBELLI, G.C et al. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? **Journal of Chemical Ecology**, California, v.31, n.7, p.1509-1525, jul. 2005.

PIUBELLI, G.C. et al. Baculovirus-resistant *Anticarsia gemmatilis* response differently to dietary rutin. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.119, p.53-60, 2006.

PRATT, G.E. et al. Identification of allatostatin from adult *Diploptera punctata*. **Biochemical and biophysical research communications**, Estados Unidos, v.163, n.3, p. 1243-1247, set. 1989.

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

RICHARDS, O.W., DAVIES, R.G. **Imms' general textbook of entomology**. 10. ed. Londres: Chapman & Hall, 1994. v.1.

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

SCOOF, L., VAN DEN BROECK, J., DE LOOF, A. The myotropic peptides of *Locusta migratoria*: structures, distribution, functions and receptors. **Insect biochemistry and molecular biology**. Inglaterra, v.23, n.8, p.859-81, dez. 1993.

SILVA, R.R. et al. Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.51, n.3, p. 258-264, abr. 2001.

SILVA, R.R. et al. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, Ribeirão preto, v.35, p. 127-133, abr./jun. 2002.

SOUSA, M.E. et al. Ultrastructure of the *Alabama argilacea* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) midgut. **Micron**, v.40, p.743-749, 2009

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

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. A digestão dos insetos. **Ciência Hoje**, v.12, p.28-38, 1991.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.47, n. 2, p.47-61, jun. 2001.

TOLEDO, T., et al., Effects of different rutin dosages on chloride, calcium and phosphorus levels serum of rabbits. **Revista Chilena de Nutrición**, v.30,n.3, p.263-270, dez. 2003.

VOLKMAN, L.E. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts. **Adv. Virus Res.**, v.48, p.313-348, 1997.

WANDERLEY-TEIXEIRA, V. et al., Histological description of the midgut and the pyloric valve of *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.66, n.4, p.1045-1049, nov. 2006.

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

WOODHEAD, A.T.; et al. Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Iowa City, v.86, n. 15, p.5997-6001, ago. 1989.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O intestino médio das larvas de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao AgMNPV mostrou alterações nas células da camada epitelial após o tratamento com os genótipos de soja composto por flavonóides (rutina e genistina) em diferentes concentrações.

Tais alterações morfológicas foram pontuais e ocorreram principalmente nas células colunares, as quais mostraram intensa vacuolização e liberação de protusões citoplasmáticas que por vezes continham núcleos celulares para o lúmen. Outras estruturas como membrana peritrófica e camada muscular também apresentaram algumas alterações em suas estruturas dependendo do genótipo.

Os danos causados em larvas suscetíveis foram promovidas principalmente pelo genótipo PI 227687, enquanto que em larvas resistentes essas alterações foram causadas principalmente pelos genótipos IAC 100 e PI 227687, os quais provocaram total desestruturação da camada epitelial do intestino dos insetos.

O epitélio apresentou alterações morfológicas superficiais, no qual pode ser verificada a presença de três regiões distintas: a anterior com células colunares com superfície variada e raras protusões citoplasmáticas; região média com algumas projeções citoplasmáticas e superfície das células colunares variadas e a região posterior com grande quantidade de projeções citoplasmáticas que variavam de formato.

Essas projeções foram evidenciadas em maior quantidade no intestino médio de ambas as populações larvais tratadas com genótipos Dowling e PI 227687, evidenciando dessa forma que estruturas estão relacionadas à eliminação de substâncias tóxicas ou de células lesionadas já que esses genótipos apresentam rutina e genistina em altas concentrações.

As análises histoquímicas evidenciaram ser composto por polissacarídeos, glicogênio, proteínas e lipídeos em LS e LR exercendo diversas funções no sistema digestivo dos insetos.

Esses compostos seriam considerados fontes de reserva de energia. Os genótipos IAC 100 e PI 227687 apresentaram maiores concentrações de compostos químicos nas células do intestino médio em larvas suscetíveis e resistentes.

De modo geral os genótipos IAC 100 e PI 227687 são recomendados para plantio por apresentarem características de resistência a pragas por promoverem intensas alterações no intestino médio das larvas de *A. gemmatalis* em ambas populações,

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)