

ALBERTO LUIZ MARSARO JÚNIOR



**Resistência de genótipos de milho, *Zea mays* L. (Poaceae),
ao ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky
(Coleoptera: Curculionidae)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sonia M. N. Lazzari

Co-orientadores: Prof. Dr. Evaldo Ferreira Vilela
Prof. Dr. Flávio A. Lazzari

CURITIBA

2004

ALBERTO LUIZ MARSARO JÚNIOR

**Resistência de genótipos de milho, *Zea mays* L. (Poaceae),
ao ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky
(Coleoptera: Curculionidae)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sonia M. N. Lazzari

Co-orientadores: Prof. Dr. Evaldo Ferreira Vilela
Prof. Dr. Flávio A. Lazzari


CURITIBA

2004

ALBERTO LUIZ MARSARO JÚNIOR

“Resistência de genótipos de milho, *Zea mays* L. (Poaceae), ao ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae).”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Doutor em Ciências”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



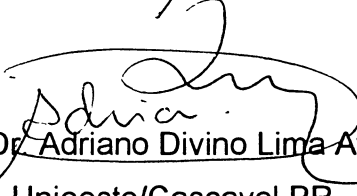
Profa. Dra. Sonia Maria Noemberg Lazzari (Orientadora)

UFPR



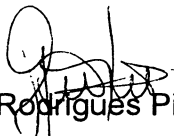
Prof. Dr. Evaldo Vilela

UFV



Prof. Dr. Adriano Divino Lima Afonso

Unioeste/Cascavel PR



Prof. Dr. Airton Rodrigues Pinto Júnior

PUC/ PR



Dr. Edilson Batista de Oliveira

Embrapa/Florestas Colombo PR

Curitiba, 26 de fevereiro de 2004.

Dedico ao meu pai
Alberto (*in memoriam*),
à minha querida mãe
Alda, à minha esposa
Alice e à minha irmã
Eliandra.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua presença constante durante todo este trabalho.

À Dra Sonia M. N. Lazzari e ao Dr. Flavio Antonio Lazzari pela orientação, amizade e confiança.

Ao Dr. Evaldo Ferreira Vilela, pelo apoio, sugestões e amizade.

À Coordenação e professores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da UFPR, pela oportunidade de realização do curso.

A toda a equipe do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), do Centro Regional de Desenvolvimento Rural Centro Serrano, Domingos Martins, ES, especialmente ao pesquisador Jacimar Luís de Souza, pela oportunidade de realização desta pesquisa, pelo apoio técnico, material e científico e, principalmente, pela agradável convivência com todos os membros dessa grande família.

A toda a equipe do Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, especialmente à Dra. Elisa Yoko Hirooka e ao Dr. Édson L. Z. Figueira, pela dedicação e contribuição nos bioensaios com os inibidores de amilase de *Sitophilus zeamais*.

A toda a equipe do Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Nutrição da UFPR, especialmente à Dra. Lys Mary B. Cândido, pela dedicação e contribuição nas análises bromatológicas.

Ao pesquisador Antônio Carlos Gerage, do IAPAR, e ao Sr. Alexandre Zamboni, da DOW AGROSCIENCIAS, pelo fornecimento dos híbridos.

Ao pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS) da EMBRAPA, Sete Lagoas, MG, Dr. Jamilton P. dos Santos, pela doação dos insetos e orientações para a realização dos testes de resistência.

Ao Dr. Edílson de Oliveira, pesquisador da EMBRAPA-FLORESTA, pelo auxílio com as análises estatísticas, sugestões e amizade.

Ao Dr. Airton Rodrigues Pinto Júnior, professor da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pelo apoio, sugestões e amizade.

Ao Dr. Adriano Divino Lima Afonso, professor da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pelas sugestões e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Entomologia, Carlos Caneppele, Maria Aparecida Caneppele, Fabiane C. Ceruti e Dalva Santana, pelos bons momentos passados juntos, pela amizade e carinho.

Aos amigos Marliton Barreto, Amáfi Gonzaga e Francisco Santana, e suas respectivas famílias, pelo apoio, amizade e pelos bons momentos passados juntos.

Ao secretário do curso de Entomologia, Sr. Jorge L. Silveira dos Santos e às bibliotecárias pelas informações e serviços prestados.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Página

AGRADECIMENTOS-----	iv
RESUMO-----	viii
ABSTRACT-----	x
INTRODUÇÃO GERAL-----	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	4

CAPÍTULO 1: Influência de diferentes sistemas de adubação na composição nutricional do milho <i>Zea mays</i> L. (Poaceae) e seus efeitos no ataque de <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) no produto armazenado-----	6
RESUMO-----	7
ABSTRACT-----	8
1. INTRODUÇÃO-----	9
2. MATERIAL E MÉTODOS-----	12
2.1. Área experimental-----	12
2.2. Delineamento experimental e análise estatística-----	12
2.3. Análise química do solo e dos compostos orgânicos-----	13
2.4. Análise dos nutrientes foliares-----	16
2.5. Secagem e desinfestação dos grãos-----	16
2.6. Criação dos insetos e infestação das amostras-----	16
2.7. Avaliação da resistência-----	17
2.8. Análise bromatológica-----	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	21
4. CONCLUSÕES-----	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	32

CAPÍTULO 2: Inibidores de amilase em híbridos de milho, <i>Zea mays</i> L. (Poaceae), como fator de resistência ao ataque de <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae)-----	35
RESUMO-----	36
ABSTRACT-----	37
1. INTRODUÇÃO-----	38

2. MATERIAL E MÉTODOS-----	41
2.1. Híbridos de milho-----	41
2.2. Secagem e desinfestação dos grãos-----	41
2.3. Criação dos insetos e infestação das amostras-----	42
2.4. Avaliação da resistência-----	42
2.5. Análise bromatológica-----	43
2.6. Avaliação dos inibidores de amilase-----	43
2.7. Delineamento experimental e análise estatística-----	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	47
4. CONCLUSÕES-----	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	56

CAPÍTULO 3: Resistência de híbridos de milho, <i>Zea mays</i> L. (Poaceae), associada a protetores de grãos no controle de <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae)-----	59
--	-----------

RESUMO-----	60
-------------	----

ABSTRACT-----	61
---------------	----

1. INTRODUÇÃO-----	62
--------------------	----

2. MATERIAL E MÉTODOS-----	64
----------------------------	----

2.1. Híbridos de milho-----	64
-----------------------------	----

2.2. Obtenção e criação dos insetos-----	64
--	----

2.3. Caracterização dos protetores de grãos-----	65
--	----

2.4. Delineamento experimental e Bioensaios com os protetores de grãos-----	65
---	----

2.5. Análise de resíduo de deltametrina-----	66
--	----

2.6. Análise estatística-----	66
-------------------------------	----

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	67
--------------------------------	----

4. CONCLUSÕES-----	79
--------------------	----

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	80
------------------------------------	----

CONSIDERAÇÕES FINAIS-----	83
---------------------------	----

RESUMO

A utilização de genótipos de milho resistentes ao ataque de insetos representa uma ferramenta valiosa para o manejo integrado de pragas durante o armazenamento de grãos e sementes. Tão importante quanto a seleção de genótipos resistentes, é o estudo dos fatores envolvidos na resistência. Nesse sentido, os objetivos desta pesquisa foram relacionar a composição nutricional e a presença de inibidores de amilase nos grãos de diferentes híbridos de milho com sua resistência ao ataque do gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais*, e a aplicação dessa ferramenta associada a medidas convencionais de controle. Para avaliar o efeito da nutrição da planta sobre a resistência do grão, cinco cultivares de milho foram cultivados em sistemas de adubação orgânica, mineral, orgânica e mineral combinadas, e em ausência de adubação. A adubação influenciou positivamente na produção e na composição nutricional dos grãos, porém, não na resistência dos grãos secos dos cultivares ao ataque de *S. zeamais*, como evidenciado pela ausência de diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis índice de suscetibilidade e ciclo biológico. Para a avaliação dos inibidores de amilase, foram obtidos extratos dos grãos macerados em etanol e em tampão, aos quais foram adicionados o macerado das larvas que continham as amilases em seu trato digestivo, cuja atividade foi determinada pelo método iodométrico. Dos compostos nutricionais, somente os lipídios correlacionaram-se significativamente com o índice de suscetibilidade, em 0,46. Os inibidores de amilase, contidos nos extratos, correlacionaram-se significativamente com o índice de suscetibilidade em -0,58. Esses resultados indicam que os inibidores de amilase contribuem para a resistência de híbridos de milho ao ataque de *S. zeamais*. No estudo da associação de genótipos com outras medidas de controle, adultos de *S. zeamais* foram expostos a grãos secos de seis híbridos de milho tratados com quatro dosagens de terra de diatomácea, 125, 250, 500 e 1000 g/t, e com quatro dosagens de deltametrina, 0,125, 0,25, 0,5 e 1,0 g i.a./t, além de uma testemunha. Avaliou-se a mortalidade acumulada até o 28º dia após a infestação e o número de descendentes aos 56 dias. A dosagem de 1,0 g i.a./t de deltametrina matou 100% dos insetos aos 3 dias, enquanto que, nas dosagens de 0,25 e 0,5 g i.a./t a eficiência de 100% foi obtida aos 5 dias após a exposição. A dosagem de 1000 g/t de terra de diatomácea atingiu esse nível de controle aos 7 dias, enquanto a dosagem de 500 g/t, aos 14 dias. Com exceção dos tratamentos com as três dosagens mais altas de deltametrina, os gorgulhos reproduziram-se em todos os demais tratamentos mantidos

até os 56 dias. Os híbridos mais resistentes, D 8480 e D 8420, mesmo na testemunha ou quando associados a baixas dosagens de deltametrina ou de terra de diatomácea, reduziram a produção de descendentes de *S. zeamais* quando comparados com os demais híbridos, indicando um efeito aditivo resultante da associação de características de resistência de determinados híbridos com outras medidas de controle, o que pode proporcionar uma melhor armazenabilidade dos grãos.

ABSTRACT

The utilization of insect resistant maize genotypes represents a valuable tool for integrated pest management during the storage of grains and seeds. As important as the selection of resistant genotypes, is the study of the factors involved in plant resistance. In that sense, the objectives of this research were to relate the nutritional composition and the presence of amylase inhibitors in the grains of different corn hybrids with their resistance to the attack of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*, and the application of that tool associated to conventional control measures. To evaluate the effect of the plant nutrition on grain resistance, five cultivars of corn were cropped under different fertilization systems: organic, mineral, organic and mineral combined, and without fertilizers. Fertilization had positive influence on production and on nutritional composition of the grains, however, it did not affect the resistance of the kernels of the cultivars to the attack of *S. zeamais*. This fact was shown by the absence of significant differences among treatments for the susceptibility index and for the insect biological cycle. For the evaluation of the amylase inhibitors, extracts of the grains in ethanol and in buffer were added to the macerated larvae containing amylases in their digestive tract, which activity was determined by the iodine method. From the nutritional compounds analyzed, only lipids were correlated significantly with the susceptibility index in 0,46. The amylase inhibitors present in the extracts were correlated significantly with the susceptibility index in -0,58. These results indicate that amylase inhibitors contribute to the resistance of corn hybrid against the attack of *S. zeamais*. To evaluate the association of resistant corn genotypes with other control measures, adults of *S. zeamais* were reared on kernels of six hybrids treated with four dosages of diatomaceous earth, 125, 250, 500 and 1000 g/t, and with four dosages of deltamethrin, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 g a.i./t, besides an untreated control. The accumulated mortality was evaluated until the 28th day after the infestation and the number of progeny by the 56th day. The dosage of 1.0 g a.i./t of deltamethrin killed 100% of the insects by the 3rd day, while with 0.25 and 0.5 g a.i./t the 100% efficiency was obtained by the 5th day after exposition. The dosage of 1000 g/t of diatomaceous earth reached 100% control level by the 7th day, while with 500 g/t, only by the 14th day. Except for the treatments with the three highest dosages of deltamethrin, the weevils reproduced in all treatments until the 56th day. The most resistant hybrids, D 8480 and D 8420, either in the control or associated to the low dosages of deltamethrin and diatomaceous earth, reduced

roduction of *S. zeamais* when compared with the other hybrids. This fact indicates an additive effect resultant of the association of resistance characteristics of certain hybrids with other control measures providing more appropriate grain storage conditions.

INTRODUÇÃO GERAL

O milho, *Zea mays* L. (Poaceae), é cultivado na maioria dos países, representando o segundo cereal mais importante em termos de produção mundial, suplantado apenas pelo trigo. Os Estados Unidos, a China e o Brasil figuram como os principais países produtores e, também, como os maiores consumidores (GODOY, 1999).

O Brasil produziu, na safra 2002/2003, 47.384.000 t de milho (CONAB, 2003), sendo que, aproximadamente, 65% dessa produção destinam-se à alimentação animal, visando atender principalmente a avicultura e à suinocultura que, juntas, respondem por 45% da demanda total brasileira desse cereal (GODOY, 1999).

Diante da necessidade de prever o abastecimento de milho para sua utilização ao longo do ano, prevenir eventuais períodos de escassez, proporcionar maior estabilidade dos preços e preservar as qualidades físico-químicas e nutritivas dos grãos, faz-se necessário o armazenamento dos mesmos. Desse modo, quando necessário, o mercado poderá dispor do produto ofertado a preços razoáveis (FAO, 1985).

Vale ressaltar que, mesmo sob boas condições de armazenamento, ocorrem perdas nos grãos armazenados causadas por insetos, fungos, ácaros, roedores e pássaros (LAZZARI, 1997).

Dentre os insetos, o gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), destaca-se como a principal praga do milho armazenado, devido ao seu elevado potencial biótico, capacidade de atacar grãos tanto no campo quanto em silos e de sobreviver a grandes profundidades na massa dos grãos (FARONI, 1992).

Dentre os prejuízos ocasionados pelo ataque de *S. zeamais* destacam-se: perda de peso, perda do poder germinativo das sementes e desvalorização comercial dos grãos (LAZZARI, 1997). Além desses prejuízos, essa praga favorece o desenvolvimento de fungos de armazenamento como o *Aspergillus flavus* e a consequente produção de suas micotoxinas (aflatoxinas) (BETI *et al.*, 1995). As aflatoxinas presentes em rações podem reduzir a postura de ovos pelas aves e causar-lhes mortalidade (LAZZARI, 1997). Além disso, nos seres humanos, o consumo continuado dessas micotoxinas, mesmo em doses pequenas, pode levar ao câncer hepático (WEBER, 1995).

Em decorrência dos prejuízos causados por *S. zeamais*, faz-se necessária a aplicação contínua de medidas de controle. No Brasil utilizam-se, principalmente, os inseticidas protetores e fumigantes. Porém, o uso indiscriminado dessas substâncias químicas tem favorecido a seleção de populações resistentes, bem como, contribuído para aumentar a contaminação de alimentos com resíduos de ingredientes ativos (LORINI, 2001).

Após a Segunda Guerra Mundial, as medidas para o controle de pragas passaram rapidamente da área biológica para a química. Ocorreu também um grande esforço unilateral no desenvolvimento de variedades de plantas, visando basicamente à produtividade, não havendo a preocupação com a perda ou possível incorporação de caracteres que conferissem resistência às pragas (HUFFAKER & SMITH, 1980). Esses autores salientam que esses dois comportamentos foram, basicamente, os responsáveis pela perda acentuada de eficiência de dois sistemas naturais que continham as populações de pragas a níveis aceitáveis, ou seja, os inimigos naturais e as próprias características das plantas que conferiam resistência ao ataque de insetos.

Devido aos problemas ambientais ocasionados pelos inseticidas e à demanda da sociedade por alimentos saudáveis, sem resíduos desses químicos, a pesquisa de plantas resistentes a insetos tem sido intensificada, inclusive para grãos armazenados. Estudos já demonstraram a existência de genótipos de milho resistentes a *S. zeamais* (GÓMEZ *et al.*, 1994; BOIÇA JÚNIOR *et al.*, 1997; CANEPPELE *et al.*, 2003).

Outros estudos estão investigando os processos de inibição de enzimas importantes para a degradação do amido, as α -amilases, no mecanismo de digestão dos insetos. Os primeiros grãos transgênicos, ervilhas, expressando o inibidor de α -amilase α -AI1 se mostraram resistentes a duas pragas importantes de grãos armazenados, *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) e *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae), conforme demonstrado por SHADE *et al.* (1994).

No milho, a presença de inibidores de α -amilase ativos contra as enzimas de insetos pragas de grãos armazenados foi demonstrada para *S. zeamais*, *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae), *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae), *C. maculatus*, *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae), *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae) e *Sitotroga cerealella* (Olivier)

(Lepidoptera: Gelechiidae), por vários autores (BLANCO-LABRA & ITURBE-CHIÑAS, 1981; BLANCO-LABRA *et al.*, 1995; FIGUEIRA *et al.*, 2003a; FIGUEIRA *et al.*, 2003b).

A nutrição mineral também é um fator importante que influencia na resistência das plantas ao ataque dos insetos, conforme demonstrado por CARVALHO *et al.* (1984), MOREIRA *et al.* (1999) e AZEREDO *et al.* (2002). Estudos de BOIÇA JÚNIOR *et al.* (1996), indicam que os danos provocados por *S. zeamais*, que ataca o milho tanto a campo como no armazém, podem ser influenciados pela condição de fertilidade do solo.

Diante do exposto, e devido ainda à escassez de estudos sobre o estado nutricional das plantas e enzimas digestivas, relacionados com a resistência de pragas de grãos armazenados, foi proposta esta pesquisa com o objetivo geral de avaliar a resistência de genótipos de milho ao ataque de *S. zeamais* e os fatores que podem influenciar na manifestação dessa resistência, em particular, o efeito da fertilidade do solo e a presença de inibidores de amilases.

No primeiro capítulo, os objetivos foram: avaliar a composição nutricional dos grãos de diferentes cultivares de milho cultivados em diferentes sistemas de adubação, relacionando sua influência sobre a resistência do grão seco ao gorgulho-do-milho, *S. zeamais*.

No segundo capítulo, os objetivos foram: avaliar a resistência de híbridos de milho ao ataque de *S. zeamais*, buscando correlacioná-la com a presença de inibidores de amilase e com a composição nutricional dos grãos.

No terceiro capítulo, os objetivos foram: avaliar a associação de genótipos de milho com os protetores de grãos, terra de diatomácea e deltametrina, para o controle de *S. zeamais* em condições de armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEREDO, E.H., CASSINO, P.C.R., LIMA, E. Avaliação da infestação de insetos-praga associados à batata (*Solanum tuberosum* L.) sob efeito de nutrientes nitrogenados e potássicos e teores acumulados de aminoácidos livres nas cultivares Achat e Monalisa. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.46, n.1, p.7-14, 2002.

BETI, J.A., PHILLIPS, T.W., SMALLEY, E.B. Effects of maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on production of aflatoxin B sub (1) by *Aspergillus flavus* in stored corn. **Journal of Econ. Entomol.**, v.88, n.6, p.1776-1782, 1995.

BLANCO-LABRA, A., ITURBE-CHIÑAS, F.A. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). **Journal of Food Biochemistry**, v.5, p.1-17, 1981.

BLANCO-LABRA, A., CHAGOLLA-LOPEZ, A., MARTÍNEZ-GALLARDO, N., VALDES-RODRIGUES, S. Further characterization of the 12 kDa protease/alpha-amylase inhibitor present in maize seeds. **Journal of Food Biochemistry**, v.19, p.27-41, 1995.

BOIÇA JÚNIOR, A.L., LARA, F.M., LUCCIN, L.M., COSTA, G.M. Avaliação dos efeitos da adubação em genótipos de milho sobre a incidência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797), *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850) e *Sitophilus zeamais* MOTS., 1855. **Cultura Agrônômica**, v.5, n.1, p.39-50, 1996.

BOIÇA JÚNIOR, A.L., LARA, F.M., GUIDI, F.P. Resistência de genótipos de milho ao ataque de *Sitophilus zeamais* (Mots.) (Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.3, 1997.

CANEPPELE, C., CANEPPELE, M.A.B., LAZZARI, S.M.N. Resistência de híbridos de milho, *Zea mays* (L.) ao ataque de *Sitophilus zeamais* (Mots.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.28, n.1, 2003.

CARVALHO, R.B., TRISTÃO, M.M., GIACON, E., CALAFIORI, M.H., TEIXEIRA, N.T., BUENO, B.F. Estudo de diferentes dosagens de potássio em milho (*Zea mays* L.) influenciando sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797). **Ecossistema**, v.9, p.95-100, 1984.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra 2002/2003. 6º Levantamento, agosto de 2003.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 05 de dezembro de 2003.

FAO. **Prevención de pérdidas de alimentos pos-cosecha: manual de capacitación.** Roma: ONU/FAO, 1985. 130p.

FARONI, L.R.A. Manejo das pragas de grãos armazenados e sua influência na qualidade do produto final. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.76, p.36-43, 1992.

FIGUEIRA, E.L.Z., BLANCO-LABRA, A., GERAGE, A.C., ONO, E.Y.S., MENDIOLA-OLAYA, E., UENO, Y., HIROOKA, E.Y. Amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant Disease**, v.87, n.3, p.233-240, 2003a.

FIGUEIRA, E.L.Z., HIROOKA, E.Y., MENDIOLA-OLAYA, E., BLANCO-LABRA, A. Characterization of an hydrophobic amylase inhibitor from corn (*Zea mays*) seeds with activity against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Phytopathology**, v.93, n.8, p.917-922, 2003b.

GODOY, R.C.B. **Acompanhamento da situação agropecuária do Paraná: prognóstico da cultura do milho**. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura, 1999. p.26-42.

GÓMEZ, H.S., SANTOS, J.P., LIMA, J.O.G. Resistencia de genotipos de maíz con diferentes características físicas y químicas al ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v.20, n.1, p.37-42, 1994.

HUFFAKER, C.B., SMITH, R.F. Rationale, organization, and development of a national integrated pest management project. In: HUFFAKER, C.B. (Ed.). **New technology of pest control**. New York: John Wiley & Sons, 1980, p.1-25.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba: Paranaset, 1997. 148p.

LORINI, I. **Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 80p.

MOREIRA, A.N., OLIVEIRA, J.V., HAJI, F.N.P., PEREIRA, J.R. Efeito de diferentes níveis de NPK na infestação de *Aculops lycopersici* (Masse) (Acari: Eriophyidae), em tomateiro no Submédio do Vale do São Francisco. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, n.2, p.275-284, 1999.

SHADE, R.E., SCHROEDER, H.E., PUEYO, J.J., TUBE, L.M., MURDOCK, L.L., HIGGINS, T.J.V., CHRISPEELS, M.J. Transgenic pea seeds expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. **Bio/Technology**, v.12, n.8, p.793-796, 1994.

WEBER, E.A. **Armazenagem agrícola**. Porto Alegre: Kepler Weber Industrial, 1995. 400p.

CAPÍTULO 1

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SISTEMAS DE ADUBAÇÃO
NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO MILHO
Zea mays L. (Poaceae) E SEUS EFEITOS NO ATAQUE DE
Sitophilus zeamais Motschulsky (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)
NO PRODUTO ARMAZENADO**

RESUMO

A disponibilidade de minerais no solo influencia a composição nutricional das plantas e, por conseguinte, sua suscetibilidade ao ataque de insetos, contudo, não há informação sobre o resultado da nutrição da planta sobre os insetos que atacam os grãos e sementes após a maturação fisiológica. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência da composição nutricional de grãos de diferentes cultivares de milho, cultivados em diferentes sistemas de adubação, sobre a resistência do grão seco ao gorgulho-do-milho *Sitophilus zeamais*. Foram plantados cinco cultivares de milho (EMCAPA 201, EMCAPA 202, Composto 1, Composto 2 e AG 405), sob quatro sistemas de adubação: orgânica, mineral, orgânica e mineral combinadas, e em ausência de adubação. Após a colheita, avaliou-se a produção de grãos, o teor de umidade, de cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos. A resistência dos cultivares foi avaliada através de parâmetros biológicos do inseto (ciclo biológico, número de insetos emergidos e peso dos adultos), índice de suscetibilidade e pela perda de peso da matéria seca dos grãos provocada pelos insetos. A maior produtividade foi obtida nas parcelas com adubação combinada, e as menores sob ausência de adubação. Os teores de cinzas, lipídios e proteínas foram menores na ausência de adubação, enquanto o de carboidratos foi maior neste sistema. O teor de cinzas, que reflete o teor de minerais, foi maior nas adubações orgânica e combinada. O teor de proteínas foi maior na adubação combinada. Os resultados não indicaram a existência de um efeito significativo da composição nutricional dos grãos dos diferentes cultivares sobre o desenvolvimento, reprodução e índice de suscetibilidade, provavelmente devido à base genética pouco distinta entre os cultivares testados.

ABSTRACT

The availability of minerals in the soil affects the nutritional composition of the plants and, consequently, their susceptibility to the attack of insects, however, there is no information on the effect of plant nutrition on the biology of the insects that infest grains and seeds after physiological maturation. Therefore, the objective of this research was to evaluate the influence of nutritional composition of grains of different corn cultivars produced under different fertilization systems on resistance of dry kernel against the maize weevil *Sitophilus zeamais*. Five cultivars of corn were planted (EMCAPA 201, EMCAPA 202, Composto 1, Composto 2, and AG 405), under four fertilization systems: organic, mineral, organic and mineral combined, and in absence of fertilizer. After harvesting, grain production, moisture content, ashes, lipids, proteins and carbohydrates were evaluated. The resistance level of the cultivars was evaluated based on biological parameters of the insect (biological cycle, number of emerged insects and adult weight), susceptibility index, and on grain weight loss caused by insect feeding. The highest grain production was obtained from the plot with combined fertilization, and the lowest in the unfertilized plot. The content of ashes, lipids and proteins were lower in the kernels from the area without fertilizer, while the carbohydrate levels were higher in this system. The ash content, that reflects minerals levels in the grain, was higher in the organic and combined fertilization areas. The protein levels were higher under combined fertilization. The results did not indicate the existence of a significant effect of the nutritional composition of the grains of different cultivars on development, reproduction and susceptibility index, probably due to the narrow genetic bases of the cultivars tested here.

1. INTRODUÇÃO

A “revolução verde”, na década de 1960, sem dúvida nenhuma, proporcionou um elevado aumento na produtividade vegetal, até então inimaginável, principalmente através da utilização dos fertilizantes químicos. Porém, o uso exagerado desses insumos, muitas vezes sem critérios, provoca desequilíbrios nutricionais nas plantas, tornando-as mais vulneráveis ao ataque das pragas.

Segundo a teoria da trofobiose (CHABOUSSOU, 1972), uma planta fica mais vulnerável ao ataque de pragas quando os teores de substâncias solúveis correspondem às exigências da praga na forma de aminoácidos livres, açúcares e minerais solúveis, condições que são favorecidas pela inibição na proteossíntese ou pelo excesso na produção de aminoácidos. Esse excesso pode ser devido ao uso intensivo de adubos nitrogenados, enquanto aquela inibição pode ser atribuída ao uso de agrotóxicos.

MOREIRA *et al.* (1999) afirmam que a maior disponibilidade de nutrientes no solo, como potássio e fósforo, favorece a infestação do ácaro *Aculops lycopersici* (Masse) (Acari: Eriophyidae) em tomateiro. Os estudos de BOIÇA JÚNIOR *et al.* (1996) indicam que plantas de milho adubadas com fósforo são menos danificadas por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) quando comparadas com plantas adubadas sem fósforo. Estes últimos autores também observaram menores danos nas folhas de milho, pela praga mencionada, quando se aplicava fósforo e potássio no solo, em comparação com a aplicação somente de potássio. Isso demonstra que a interação entre os nutrientes é um fator importante a ser considerado na relação inseto-planta.

CARVALHO *et al.* (1984) constataram que a maior taxa de oviposição e os maiores danos provocados por *S. frugiperda* ocorreram nas plantas de milho que não haviam sido adubadas com potássio quando comparadas com as plantas dos demais tratamentos adubadas com potássio.

BARBOSA *et al.* (1989) verificaram que lagartas de *S. frugiperda* que se alimentaram de folhas de milho adubadas com zinco apresentaram ciclo biológico mais longo e peso menor de larvas e pupas, quando comparados com a testemunha.

O nitrogênio é outro nutriente que apresenta influência na relação inseto-planta. BETHKER *et al.* (1987) observaram que altos níveis de nitrogênio proporcionam

aumento no número de pupas e adultos de *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae), em tomateiro. AZEREDO *et al.* (2002) constataram que o aumento da dose de nitrogênio elevou a infestação de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) no cultivar de batata Monalisa, porém, no cultivar Achat a infestação dessa praga diminuiu. Em ambos os cultivares o teor de aminoácidos livres reduziu com o aumento dos níveis de nitrogênio que foram fornecidos no processo de adubação.

AZEREDO *et al.* (2002) constataram, ainda, que o aumento da dose de potássio aumentou a infestação de *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) nos dois cultivares de batata, porém, enquanto o teor de aminoácidos livres aumentou no cultivar Monalisa esse teor foi reduzido no cultivar Achat. Esses resultados demonstram que diferentes cultivares e pragas podem responder de maneira diferenciada quando se alteram os níveis dos nutrientes.

Os teores de nitrogênio e fósforo também influenciam no desenvolvimento de uma importante praga que ataca o milho, tanto em campo como em armazenamento, o gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). BOIÇA JÚNIOR *et al.* (1996) constataram que *S. zeamais* consumiu maior peso de grãos produzidos em solos que receberam adubação com nitrogênio e fósforo do que de grãos produzidos em solos na ausência desses nutrientes.

O teor do alumínio no solo também tem influência sobre os insetos. OLIVEIRA *et al.* (1990a) constataram que larvas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho, oriundas de solo com baixo teor de alumínio, apresentaram uma redução na duração da fase larval quando comparadas com os demais tratamentos, sendo o efeito no quarto instar mais significativo. Além disso, OLIVEIRA *et al.* (1990b) concluíram que as folhas de milho produzidas em solo com baixo teor de alumínio foram as mais adequadas para *S. frugiperda*, pois foram menos consumidas, melhor digeridas e apresentaram o menor custo metabólico, quando comparadas com os demais tratamentos.

Tão importante quanto os minerais na nutrição das plantas e na sua suscetibilidade aos insetos, são os diferentes meios pelos quais esses nutrientes são fornecidos às plantas. Nesse sentido, destacam-se a adubação convencional e a orgânica. SMITH (1993) comparou os principais macro e microminerais de trigo, batata, maçã, pêra e milho verde, oriundos da agricultura convencional e orgânica, e constatou que,

em média, os alimentos orgânicos apresentaram duas vezes mais elementos minerais que os convencionais.

CUNHA *et al.* (2000), ao avaliarem a infestação de *Empoasca* sp. (Hemiptera: Cicadellidae) em feijoeiros, constataram que os tratamentos que receberam matéria orgânica (biofertilizante e/ou esterco) apresentaram menor número de insetos por planta quando comparados ao tratamento que recebeu adubação mineral.

A disponibilidade de nutrientes no solo, além de influenciar a composição nutricional das folhas, pode também afetar a composição mineral dos grãos de milho, conforme verificou FERREIRA (2001). Os teores das proteínas e dos açúcares dos grãos de milho também podem ser influenciados quando fertilizantes químicos são combinados com compostos orgânicos (SINGARAM & KAMALAKUMARI, 1999).

Visto que, a disponibilidade de minerais no solo influencia na composição mineral das folhas e grãos, e que os insetos de campo respondem às diferenças na qualidade nutricional das plantas, foi proposta esta pesquisa com os objetivos de avaliar se cultivares de milho, plantados sob diferentes sistemas de adubação, afetam o desempenho biológico do gorgulho-do-milho, *S. zeamais*, no grão armazenado e, relacionar a maior ou menor resistência dos materiais ao ataque do inseto com a composição nutricional dos grãos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área experimental

A pesquisa foi realizada na área experimental do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), no Centro Regional de Desenvolvimento Rural Centro Serrano, localizado no município de Domingos Martins, Estado do Espírito Santo, a uma altitude de 950 m, a 20°20'S e 41°10'W, no ano agrícola de 2000/01.

O experimento foi instalado em uma área de ensaio permanente, onde se estuda, desde 1990, os efeitos das adubações orgânica e mineral sobre a produção de diversas culturas em rotação, incluindo o milho (SOUZA, 1998).

2.2. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com parcelas subdivididas. Nas parcelas foram estudados quatro tratamentos, correspondendo aos seguintes sistemas de adubação: ausência de adubação (Tratamento 1), adubação mineral conforme resultado da análise de solo (Tratamento 2), adubação com composto orgânico totalizando 15 t/ha em peso seco (Tratamento 3) e adubação combinando o segundo com o terceiro sistema (Tratamento 4).

As parcelas experimentais apresentavam área de 100 m², e cada uma foi dividida em subparcelas de 20 m². Nas subparcelas foram testados cinco cultivares de milho, cujas características são apresentadas na Tabela 1. O plantio foi realizado em 28 de novembro de 2000, em sulcos espaçados de 1,0 m, com 10 sementes/m. Uma semana após a emergência realizou-se o desbaste, resultando numa população de 50.000 plantas/ha.

O experimento foi realizado em três blocos. A área útil das subparcelas foi formada pelas três linhas centrais, das cinco linhas existentes, descartando-se 1,0 m das bordaduras, ou seja, 9 m².

As variáveis obtidas foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 1 – Caracterização dos cultivares de milho plantados em quatro sistemas de adubação para testes de resistência dos grãos ao ataque de *Sitophilus zeamais*, em Domingos Martins (ES), 2000.

Cultivares	Grupo	Classe
Composto 1 ¹	Mole	Amarelo
Composto 2 ¹	Duro	Amarelo
EMCAPA 201 ²	Semi-duro	Amarelo
EMCAPA 202 ²	Semi-duro	Amarelo
AG 405 ³	Semi-duro	Amarelo

¹ Cultivar em fase final de melhoramento pelo INCAPER

² Cultivar lançado pelo INCAPER

³ Cultivar lançado pela AGROCERES

O critério para a escolha dos cultivares foi em função do interesse do INCAPER em avaliar o desempenho de seus genótipos nos experimentos a campo e em laboratório, não tendo sido possível trabalhar com outros materiais com características genéticas mais diferenciadas.

2.3. Análise química do solo e dos compostos orgânicos

Realizou-se análise de solo das parcelas antes da instalação do experimento para verificar a condição de fertilidade e proceder à adubação dos tratamentos 2 e 4. Os resultados dessas análises e os fertilizantes químicos aplicados nesses tratamentos (no plantio e em cobertura), segundo recomendação de PREZOTTI (1992), estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2 - Características químicas das amostras de solo da área experimental, realizada antes da semeadura do milho, para testes de resistência dos grãos ao ataque de *Sitophilus zeamais*, em Domingos Martins (ES), 2000.

Características químicas		Tratamentos			
		T1	T2	T3	T4
pH	(H ₂ O)	6,27	5,37	7,30	6,33
P ¹	mg/dm ³	6,67	80,67	412,67	513,33
K ¹		62,00	136,67	340,00	486,67
Ca ²		3,27	4,80	6,33	8,87
Mg ²		0,80	0,90	1,80	2,10
Al ²	(Cmol/dm ³)	0,00	0,10	0,00	0,00
H + Al ³		3,33	6,33	1,40	2,29
SB		4,22	6,05	9,00	12,21
CTC	Efetiva	4,22	6,15	9,00	12,21
	Total	7,56	12,38	10,40	14,50
V	(%)	55,57	48,82	86,57	84,06
m		0,00	1,67	0,00	0,00
Carbono orgânico ⁴	dag/kg	1,27	1,50	1,89	2,66

T1 = Testemunha (ausência de adubação)

T2 = Adubo mineral (no plantio = 75 kg de sulfato de amônio/ha + 111 kg de superfosfato simples/ha + 34 kg de cloreto de potássio/ha) e em cobertura = 300 kg de sulfato de amônio/ha após 30 dias da emergência das plantas de milho

T3 = Composto orgânico (10 t/ha no plantio e 5 t/ha em cobertura após 30 dias da emergência das plantas de milho)

T4 = T2 + T3

SB = Soma de bases

CTC = Capacidade de troca catiônica

V = Saturação de bases

m = Saturação de alumínio

¹ Extrator Mehlich-1 (SILVA, 1999)

² Extrator KCl 1 mol/L (SILVA, 1999)

³ Extrator SMP (SILVA, 1999)

⁴ Método de Walkley-Black (DEFELIPO & RIBEIRO, 1981).

As características dos compostos orgânicos aplicados no solo são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Características dos compostos orgânicos aplicados no solo nas adubações de plantio e de cobertura no milho, para testes de resistência dos grãos ao ataque de *Sitophilus zeamais*, em Domingos Martins (ES), 2000.

Características	Unidade	Valores	
		Adubação de plantio	Adubação de cobertura
Umidade	dag/kg	68,00	71,00
Carbono orgânico	dag/kg	35,96	30,74
Relação C:N	-	19:1	15:1
Nitrogênio	dag/kg	1,90	2,00
Fósforo	dag/kg	0,77	1,36
Potássio	dag/kg	1,30	1,80
Cálcio	dag/kg	2,10	4,70
Magnésio	dag/kg	0,28	0,51
Enxofre	dag/kg	0,29	0,33
Cobre	mg/kg	35,00	33,00
Zinco	mg/kg	468,00	520,00
Manganês	mg/kg	458,00	500,00
Ferro	mg/kg	3125,00	4375,00

A umidade dos compostos foi obtida através da secagem das amostras a 65°C em estufa de ventilação forçada por 12 horas (KIEHL, 1985). O carbono orgânico foi obtido através do método da perda de peso por ignição (KIEHL, 1985). Para a quantificação do nitrogênio utilizou-se o método Kjeldahl proposto por BREMNER & MULVANEY (1982). Os teores de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, zinco, manganês e ferro foram obtidos após a extração por digestão nítrico-perclórica (SILVA, 1999).

2.4. Análise dos nutrientes foliares

A amostragem das folhas dos cultivares de milho para análise do teor de nutrientes foi realizada no período do florescimento feminino, ou seja, aos 65 dias após o plantio. Na amostragem, colheu-se a folha imediatamente abaixo e oposta à espiga (MALAVOLTA, 1992). Foram coletadas 20 folhas de milho ao acaso na área útil de cada subparcela. O material vegetal foi lavado e seco em estufa de ventilação forçada a 70°C por 72 horas, até a obtenção de peso constante. Após a moagem do material, quantificou-se os teores de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, zinco e ferro, de maneira semelhante ao descrito para os compostos orgânicos.

2.5. Secagem e desinfestação dos grãos

Após a maturação fisiológica dos grãos, as espigas foram colhidas e debulhadas manualmente. A seguir, os grãos foram secos na sombra até as amostras atingirem 13,5% de umidade. Na determinação de umidade, utilizou-se o método padrão da estufa, a 105±5°C, durante 24h, conforme recomendações de análise em sementes (WAQUIM, 1992).

Após a secagem, os grãos foram armazenados em sacos plásticos, a -20°C, por 30 dias, a fim de eliminar os insetos provenientes do campo (FALEIRO *et al.*, 1995).

2.6. Criação dos insetos e infestação das amostras

Os adultos de *S. zeamais* utilizados nos bioensaios foram obtidos da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG. Os insetos foram criados em potes de 2 L contendo grãos de milho limpo e seco, previamente congelados para eliminar infestações, e mantidos em temperatura ambiente no Laboratório de Entomologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR – Curitiba, PR).

Cada amostra de 100 g de grãos foi infestada com 15 fêmeas e 5 machos de *S. zeamais*, com idade entre 7 e 14 dias, por 10 dias, para a cópula e oviposição (DOBIE, 1977). Após esse período, os insetos adultos foram descartados. A identificação da espécie foi feita pelas características da genitália (HALSTEAD, 1963a) e a sexagem

pelo aspecto do rostro, mais fosco, curto e largo nos machos (HALSTEAD, 1963b). Trinta dias após a infestação avaliou-se, a cada dois dias, o número de adultos emergidos, os quais eram descartados após a contagem. Cada amostra foi armazenada em recipiente plástico de 500 mL com tampa telada, em BOD, a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $75\pm 5\%$ e 12 horas de fotofase.

2.7. Avaliação da resistência

A resistência dos cultivares de milho foi avaliada pelo índice de suscetibilidade (IS) (DOBIE, 1977), que é baseado na análise do número de insetos emergidos por dia e no tempo médio de desenvolvimento, após infestação artificial de grãos por *S. zeamais*. Esse índice foi determinado pelas seguintes equações:

$$IS = (\ln(\sum x)/T) \times 100 \quad (\text{Equação 1}), \text{ onde:}$$

IS = Índice de suscetibilidade;

ln = logaritmo neperiano;

$\sum x$ = somatório do número de gorgulhos emergidos em cada cultivar e;

T = tempo médio gasto para os insetos completarem o ciclo biológico.

$$T = \sum(xy)/\sum x \quad (\text{Equação 2}) \quad \text{onde:}$$

x = número de insetos emergidos diariamente e;

y = número de dias da infestação à emergência.

Além do índice de suscetibilidade, também foram avaliados os seguintes parâmetros: peso dos gorgulhos adultos e perda de peso da matéria seca dos grãos provocada pelos adultos e sua progênie.

Para o cálculo do peso médio dos gorgulhos, pesou-se 5 amostras de 10 insetos vivos cada uma, para cada repetição de cada cultivar. A pesagem dos adultos foi realizada após 24 horas de emergência (TOSCANO *et al.*, 1999). A perda de peso da matéria seca dos grãos foi determinada pela diferença entre o peso da matéria seca inicial e o peso da matéria seca final.

2.8. Análise bromatológica

A análise foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná.

Amostras de 100 g de grãos de cada cultivar foram trituradas separadamente até à granulometria máxima de 48 *mesh*. A partir da farinha obtida avaliou-se: umidade, cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos, utilizando-se a metodologia proposta por LANE (2000) para todos os componentes. Os resultados foram expressos em base seca.

2.8.1. Umidade

As cápsulas de alumínio ficaram durante 1 hora em estufa a 105°C para padronização do peso. Posteriormente, em cada cápsula foram colocados 5 g da amostra de milho moído de cada cultivar, e todo o material foi colocado na estufa a 105°C por 1 hora. A seguir, o material foi retirado da estufa e resfriado em dessecador até atingir a temperatura ambiente, e pesado. Repetiram-se as operações de aquecimento e resfriamento até obter-se peso constante.

No cálculo da umidade utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Umidade (\%)} = (P_p/P_a) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

P_p = Perda de peso da amostra (g)

P_a = Peso da amostra (g)

2.8.2. Cinzas

Inicialmente, cadinhos de porcelana ficaram durante 1 hora em mufla a 550°C, para padronização do peso. Posteriormente, em cada cadinho foram colocados 5 g da amostra de milho moído de cada cultivar e, todo o material foi colocado na mufla a 550°C por 3 horas. O material foi retirado e resfriado em dessecador até à temperatura ambiente, e pesado. Repetiram-se as operações de aquecimento e resfriamento até obter-se peso constante (LANE, 2000).

No cálculo das cinzas utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Cinzas (\%)} = (P_c/P_a) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

P_c = Peso das cinzas (g)

P_a = Peso da amostra (g)

2.8.3. Lipídios

Os balões de fundo chato de 250 mL ficaram durante 1 hora em estufa a 105°C para padronização do peso. Posteriormente, em cada balão foram colocados 5 g da amostra de milho moído de cada cultivar em papel filtro que foi grampeado para evitar perda de material. Em seguida, o balão foi colocado no conjunto extrator de Soxlet com éter de petróleo suficiente para cobrir a amostra, procedendo-se à extração por 6 horas.

Após o período de extração, evaporou-se o solvente colocando-se o balão na estufa a 105°C por 30 minutos. A seguir, o material foi retirado da estufa e resfriado em dessecador até a temperatura ambiente, e pesado. Repetiram-se as operações de aquecimento e resfriamento até obter-se peso constante (LANE, 2000).

No cálculo de lipídios utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Lipídios (\%)} = (\text{Pl/Pa}) \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Pl = Peso de lipídios (g)

Pa = Peso da amostra (g)

2.8.4. Proteínas

Os teores de proteínas foram calculados baseando-se na determinação do nitrogênio total, que é expresso na forma de amônia, através do método de Kjeldahl (LANE, 2000).

Inicialmente, colocou-se 0,2 g da amostra de milho moído de cada cultivar embrulhada em papel filtro e adicionou-se 1,0 g de mistura catalítica (CuSO_4 e K_2SO_4) em um tubo de Kjeldahl. Em seguida, acrescentou-se 5,0 mL de H_2SO_4 concentrado e colocou-se o tubo num bloco digestor a 400°C até cessar o desprendimento de SO_2 .

Posteriormente, o tubo e um erlenmeyer de 250 mL foram conectados no destilador de Kjeldahl. Programaram-se no destilador os seguintes volumes de reagentes: água destilada (30 mL), H_3BO_3 (20 mL) e NaOH (40 mL); e o tempo de destilação de 3 minutos.

Após a destilação, adicionou-se ao erlenmeyer 5 gotas de indicador misto (vermelho de metila + verde de bromo cresol) e titulou-se com H_2SO_4 0,02N até a mudança de cor de verde para rosa.

Em seguida, anotou-se o volume de H₂SO₄ gasto na titulação, indicado na equação abaixo.

$$\text{Proteínas (\%)} = \frac{\text{Volume de ácido gasto (mL)} \times 100 \times 0,00028 \times \text{fc} \times \text{F}}{\text{Peso da amostra (g)}} \quad (\text{Equação 6})$$

fc = fator de correção da solução de ácido sulfúrico

F = fator de conversão de nitrogênio em proteína = 5,7

2.8.5. Carboidratos

O conteúdo de carboidratos nas amostras do milho moído de cada cultivar foi calculado através da seguinte equação, que representa a diferença percentual com relação aos demais teores dos componentes:

$$\text{Carboidratos (\%)} = 100 - [\text{Umidade (\%)} + \text{Cinzas (\%)} + \text{Lipídios (\%)} + \text{Proteínas (\%)}] \quad (\text{Equação 7})$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 4 são apresentados os resultados dos macronutrientes das folhas dos diferentes cultivares de milho.

Observa-se que o teor de nitrogênio não diferiu estatisticamente entre os sistemas de adubação e nem entre os cultivares. O de fósforo foi menor na ausência de adubação e não houve diferença entre os cultivares dentro dos sistemas. O teor de potássio não diferiu no Composto 2 e EMCAPA 202 com relação aos sistemas de adubação. No Composto 1, o teor deste nutriente foi menor na ausência de adubação e maior na adubação orgânica, enquanto o AG 405 e EMCAPA 201 apresentaram menores valores na ausência e maiores nas adubações orgânica e combinada. Ainda com relação ao potássio, não se verificou diferença entre os cultivares dentro dos sistemas de adubação.

Ainda na Tabela 4, verifica-se que o teor cálcio não diferiu estatisticamente entre os sistemas de adubação e nem entre os cultivares. O de magnésio diferiu e foi menor somente nos cultivares AG 405 e Composto 1, na ausência de adubação e quando comparado com os demais sistemas. Os teores de enxofre do AG 405, EMCAPA 201 e EMCAPA 202 foram maiores na adubação mineral, provavelmente devido à utilização do sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, e menores na ausência de adubação.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados dos micronutrientes das folhas dos diferentes cultivares de milho.

O teor de cobre não diferiu estatisticamente entre os sistemas de adubação e nem entre os cultivares. Com relação ao zinco, as maiores diferenças entre os sistemas de adubação ocorreram para os cultivares AG 405 e EMCAPA 201 que apresentaram as maiores médias na adubação mineral. As maiores médias nos teores de manganês, de maneira geral, ocorreram na adubação mineral. O teor de ferro não diferiu estatisticamente em relação aos sistemas de adubação, porém, houve diferenças entre cultivares, na ausência e na adubação combinada.

Tabela 4 – Teores médios (dag/kg) de macronutrientes presentes nas folhas de cultivares de milho submetidos a diferentes sistemas de adubação, em Domingos Martins (ES), 2001.

Cultivares	Sistemas de adubação			
	Ausência	Mineral	Orgânica	Combinada
Nitrogênio				
AG 405	2,86 Aa	3,13 Aa	2,70 Aa	2,90 Aa
EMCAPA 201	3,00 Aa	3,06 Aa	2,83 Aa	3,00 Aa
Composto 1	2,60 Aa	3,13 Aa	2,90 Aa	2,93 Aa
Composto 2	2,70 Aa	3,03 Aa	2,83 Aa	2,90 Aa
EMCAPA 202	2,66 Aa	3,13 Aa	2,80 Aa	3,06 Aa
Fósforo				
AG 405	0,19 Ba	0,27 Aa	0,31 Aa	0,33 Aa
EMCAPA 201	0,19 Ba	0,29 Aa	0,29 Aa	0,31 Aa
Composto 1	0,21 Ba	0,27 ABa	0,32 Aa	0,31 Aa
Composto 2	0,19 Ba	0,28 Aa	0,32 Aa	0,34 Aa
EMCAPA 202	0,17 Ca	0,27 Ba	0,32 ABa	0,34 Aa
Potássio				
AG 405	1,63 Ba	2,35 ABa	2,83 Aa	2,78 Aa
EMCAPA 201	1,71 Ba	2,28 ABa	2,53 Aa	2,68 Aa
Composto 1	1,93 Ba	2,18 ABa	2,70 Aa	2,50 ABa
Composto 2	1,76 Aa	2,18 Aa	2,40 Aa	2,45 Aa
EMCAPA 202	2,05 Aa	2,26 Aa	2,75 Aa	2,60 Aa
Cálcio				
AG 405	0,57 Aa	0,74 Aa	0,59 Aa	0,57 Aa
EMCAPA 201	0,60 Aa	0,75 Aa	0,64 Aa	0,66 Aa
Composto 1	0,66 Aa	0,64 Aa	0,59 Aa	0,58 Aa
Composto 2	0,62 Aa	0,64 Aa	0,60 Aa	0,59 Aa
EMCAPA 202	0,52 Aa	0,70 Aa	0,59 Aa	0,66 Aa
Magnésio				
AG 405	0,37 Aa	0,22 Ba	0,26 ABa	0,21 Ba
EMCAPA 201	0,28 Aa	0,24 Aa	0,28 Aa	0,25 Aa
Composto 1	0,38 Aa	0,23 Ba	0,23 Ba	0,24 Ba
Composto 2	0,29 Aa	0,25 Aa	0,27 Aa	0,28 Aa
EMCAPA 202	0,30 Aa	0,26 Aa	0,24 Aa	0,27 Aa
Enxofre				
AG 405	0,9 Ba	0,18 Aa	0,12 Ba	0,13 ABa
EMCAPA 201	0,9 Ca	0,17 Aa	0,11 BCa	0,15 ABa
Composto 1	0,11 Aa	0,14 Aa	0,11 Aa	0,14 Aa
Composto 2	0,11 Aa	0,16 Aa	0,15 Aa	0,15 Aa
EMCAPA 202	0,11 Ba	0,17 Aa	0,13 ABa	0,13 ABa

As médias de cada variável, oriundas de três repetições, seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 5 – Teores médios (dag/kg) de micronutrientes presentes nas folhas de cultivares de milho, submetidos a diferentes sistemas de adubação, em Domingos Martins (ES), 2001.

Cultivares	Sistemas de adubação			
	Ausência	Mineral	Orgânica	Combinada
Cobre				
AG 405	8,33 Aa	13,00 Aa	11,66 Aa	10,00 Aa
EMCAPA 201	8,33 Aa	11,33 Aa	11,33 Aa	13,33 Aa
Composto 1	11,66 Aa	9,66 Aa	10,00 Aa	11,33 Aa
Composto 2	8,33 Aa	10,33 Aa	11,33 Aa	13,00 Aa
EMCAPA 202	11,66 Aa	12,33 Aa	12,33 Aa	12,33 Aa
Zinco				
AG 405	13,33 Bab	21,00 Aa	13,66 Ba	13,00 Ba
EMCAPA 201	10,33 Bb	15,66 Ab	10,66 Ba	10,00 Ba
Composto 1	11,66 Ab	14,33 Ab	11,00 Aa	11,66 Aa
Composto 2	16,66 Aa	15,00 ABb	11,66 Ba	12,00 ABa
EMCAPA 202	13,33 Aab	14,00 Ab	13,33 Aa	11,00 Aa
Manganês				
AG 405	59,00 Ba	104,00 Aa	50,00 Ba	46,00 Bb
EMCAPA 201	51,66 Ba	111,33 Aa	50,66 Ba	74,00 Ba
Composto 1	70,00 ABa	97,33 Aa	51,66 Ba	59,66 Bab
Composto 2	69,66 Ba	111,33 Aa	65,33 Ba	61,00 Bab
EMCAPA 202	54,00 Ba	87,00 Aa	55,33 Ba	60,66 ABab
Ferro				
AG 405	126,33 Ab	130,33 Aa	120,66 Aa	132,66 Aab
EMCAPA 201	115,33 Ab	126,00 Aa	119,00 Aa	110,33 Ab
Composto 1	146,33 Aab	147,66 Aa	114,66 Aa	133,33 Aab
Composto 2	183,66 Aa	157,00 Aa	140,00 Aa	165,33 Aa
EMCAPA 202	125,66 Ab	128,33 Aa	115,00 Aa	141,66 Aab

As médias de cada variável, oriundas de três repetições, seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Interpretando os valores dos nutrientes foliares, obtidos nesta pesquisa, de acordo com a classificação proposta por MALAVOLTA (1992), conclui-se que, para o nitrogênio, os cultivares apresentaram valores médios na ausência de adubação e na adubação orgânica e, nas demais adubações, os valores foram considerados adequados. O teor de fósforo é considerado baixo na ausência e adequado nos demais sistemas. O teor de potássio foi médio na ausência e adequado nos demais sistemas. Os teores de cálcio, magnésio, cobre, manganês e ferro foram adequados em todos os sistemas. Os teores de enxofre foram médios tendendo a baixos na ausência, médios na orgânica e combinada, e na mineral, adequados. Os teores de zinco foram médios tendendo a adequados na adubação mineral e médios nos demais sistemas.

Todos os cultivares apresentaram os menores valores para produção, aproximadamente 3000 kg/ha, na ausência de adubação, e os maiores valores, aproximadamente 8000 kg/ha, na adubação combinada (Tabela 6). Nessa mesma tabela, observa-se que três dos cinco cultivares, EMCAPA 202, Composto 1 e 2, apresentaram maiores médias de produção na adubação orgânica quando comparados com a mineral, enquanto o AG 405 apresentou comportamento inverso. Os cultivares que apresentaram as maiores médias na adubação mineral foram o AG 405, EMCAPA 201 e Composto 1; na adubação orgânica o EMCAPA 202, e na combinada, AG 405 e Composto 1. Na ausência de adubação não houve diferença entre cultivares.

Tabela 6 – Produção de cultivares de milho (kg/ha) sob diferentes sistemas de adubação, em Domingos Martins (ES), 2001.

Cultivares	Sistemas de adubação			
	Ausência	Míneral	Orgânica	Combinada
AG 405	3258,85 Da	7072,43 Ba	6516,94 Cc	8150,37 Aa
EMCAPA 201	3085,50 Ca	7002,98 Ba	7292,19 Bb	7980,98 Aab
Composto 1	3228,05 Da	6980,78 Ca	7537,87 Bab	8197,90 Aa
Composto 2	2927,78 Ca	6050,55 Bb	7225,50 Ab	7303,05 Ac
EMCAPA 202	3158,82 Ca	6383,70 Bb	7892,09 Aa	7594,94 Abc

As médias, oriundas de três repetições, seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

As elevadas produções dos cultivares no sistema de adubação orgânica são semelhantes aos valores encontrados por SOUZA (1998), que também menciona que os custos de produção do milho orgânico não diferem do convencional.

A umidade do grão não diferiu entre os sistemas de adubação nem entre os cultivares (Tabela 7). Nessa mesma tabela observa-se que os maiores valores médios para a porcentagem de cinzas ocorreram nas adubações orgânica e combinada, indicando que nesses sistemas os grãos apresentaram um maior teor de minerais quando comparados aos grãos da adubação mineral e na ausência de adubação. SMITH (1993), ao avaliar o teor de minerais de alimentos orgânicos e convencionais, verificou que aqueles apresentaram valores mais altos que estes.

As menores porcentagens de cinzas, e provavelmente de minerais, ocorreram na ausência de adubação, devido à menor disponibilidade de minerais no solo, pois, segundo FERREIRA *et al.* (2001), a disponibilidade de minerais no solo influencia a composição mineral foliar e esta, por sua vez, a composição mineral dos grãos de milho.

Três dos cinco cultivares, AG 405, Composto 1 e EMCAPA 202, apresentaram as menores médias para porcentagem de lipídios na ausência de adubação (Tabela 7), indicando que a disponibilidade de minerais no solo pode influenciar na produção de lipídios.

Os cinco cultivares apresentaram as menores porcentagens de proteínas na ausência de adubação (Tabela 7). Com exceção do EMCAPA 202, todos os outros cultivares apresentaram as maiores médias para proteínas na adubação combinada, semelhante aos resultados encontrados por SINGARAM & KAMALAKUMARI (1999). Esses autores estudaram o efeito de diversas formas de adubações sobre as qualidades nutricionais de grãos de milho, e verificaram que o tratamento que combinou NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) com composto orgânico proporcionou os maiores teores de proteínas e açúcares totais.

Os cinco cultivares apresentaram as maiores porcentagens de carboidratos na ausência de adubação (Tabela 7). As menores médias para carboidratos foram nos cultivares AG 405 e Composto 2, na adubação combinada.

Tabela 7 – Componentes nutricionais (em porcentagem) dos grãos de cultivares de milho, produzidos sob diferentes sistemas de adubação, para a avaliação da resistência a *Sitophilus zeamais*, em Domingos Martins (ES), 2001.

Cultivares	Sistemas de adubação			
	Ausência	Mineral	Orgânica	Combinada
	Umidade			
AG 405	13,45 Aa	13,42 Aa	13,54 Aa	13,51 Aa
EMCAPA 201	13,32 Aa	13,35 Aa	13,54 Aa	13,24 Aa
Composto 1	13,55 Aa	13,99 Aa	13,40 Aa	13,44 Aa
Composto 2	13,54 Aa	13,77 Aa	13,68 Aa	13,47 Aa
EMCAPA 202	13,96 Aa	13,67 Aa	13,37 Aa	13,30 Aa
	Cinzas (bs) ¹			
AG 405	1,08 Ba	1,13 Bb	1,23 Aa	1,22 Aa
EMCAPA 201	1,07 Ba	1,20 Aa	1,25 Aa	1,24 Aa
Composto 1	1,04 Ca	1,11 Bb	1,22 Aa	1,22 Aa
Composto 2	1,07 Ca	1,15 Bab	1,27 Aa	1,25 Aa
EMCAPA 202	1,03 Ca	1,14 Bb	1,24 Aa	1,25 Aa
	Lipídios (bs)			
AG 405	4,66 Cc	5,02 Bc	4,67 Cd	5,62 Ab
EMCAPA 201	5,16 Ab	5,23 Ab	4,87 Bc	5,33 Ac
Composto 1	4,31 Cd	5,16 Bbc	5,82 Aa	5,21 Bcd
Composto 2	5,77 Ba	5,41 Ca	4,92 Dc	6,14 Aa
EMCAPA 202	3,81 Be	5,09 Abc	5,17 Ab	5,12 Ad
	Proteínas (bs)			
AG 405	8,76 Ca	9,97 Bc	9,69 Be	10,67 Ac
EMCAPA 201	7,88 Cc	11,68 Aa	11,23 Bb	11,56 ABa
Composto 1	8,24 Cb	10,59 Bb	10,56 Bc	11,33 Aab
Composto 2	8,31 Db	9,52 Cd	10,18 Bd	10,67 Ac
EMCAPA 202	7,17 Dd	10,24 Cc	11,62 Aa	11,12 Bb
	Carboidratos (bs)			
AG 405	72,03 Abc	70,44 Ba	70,85 Ba	68,96 Ca
EMCAPA 201	72,55 Ab	68,52 Bc	69,10 Bbc	68,61 Ba
Composto 1	72,84 Ab	69,14 Bbc	68,98 Bc	68,78 Ba
Composto 2	71,30 Ac	70,13 Ba	69,92 Bb	68,45 Ca
EMCAPA 202	74,01 Aa	69,85 Bab	68,59 Cc	69,19 BCa

As médias de cada variável, oriundas de três repetições, seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

¹ base seca

Os parâmetros biológicos de *S. zeamais* usados como referência para analisar a resistência dos cultivares são apresentados na Tabela 8. Observa-se que não houve diferença estatística entre os sistemas de adubação e nem entre os cultivares para a variável ciclo biológico. Isso indica que em nenhum dos cultivares as larvas tiveram seu desenvolvimento afetado por características intrínsecas do grão.

Com relação ao número de *S. zeamais* emergidos, verifica-se que as principais diferenças significativas ocorreram para o EMCAPA 201 que apresentou um número médio de 164 insetos na ausência e 104,6 na adubação mineral e para o Composto 1, 169,6 insetos na mineral e 112,6 na ausência de adubação (Tabela 8). Visto que somente esses dois cultivares, nesses dois sistemas, apresentaram diferenças significativas, conclui-se, que de maneira geral, o número de insetos emergidos dos cultivares não foi influenciado pelos sistemas de adubação.

BOIÇA JÚNIOR *et al.* (1996) estudaram o efeito de diferentes associações de adubação NPK, em diferentes genótipos de milho, com relação aos danos provocados por *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) em espigas e com a infestação dos grãos por *S. zeamais*, a campo. Os autores observaram que o comprimento da galeria provocada por *H. zea* não foi influenciado pelos sistemas de adubação e nem pelos genótipos. Além disso, verificaram que o número de *S. zeamais* emergidos dos grãos foi maior no tratamento com aplicação de fósforo quando comparado com a ausência de aplicação, porém, esse resultado foi observado em apenas um dos genótipos estudados.

OSUNA *et al.* (1989), ao avaliarem os danos provocados em espigas por *H. zea* em genótipos de milho submetidos a adubação orgânica e convencional, não encontraram diferença entre os genótipos e nem entre os sistemas de adubação. ZUCATO FILHO *et al.* (1986) avaliaram a infestação de *Caliothrips brasiliensis* (Morgan) (Thysanoptera: Thripidae), *Empoasca* sp. (Hemiptera: Cicadellidae) e *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em feijoeiros submetidos a adubação orgânica e mineral, e também não encontraram qualquer diferença na infestação dessas pragas com relação aos sistemas de adubação.

CREAMER *et al.* (1996), ao avaliarem a infestação de insetos pragas em quatro sistemas de produção de tomate, convencional, plantio direto, orgânico e ausência de adubação, concluíram que não houve diferença entre os tratamentos.

Tabela 8 – Ciclo biológico de *Sitophilus zeamais*, adultos emergidos, índice de suscetibilidade, peso dos adultos e perda de peso da matéria seca dos grãos, obtidos nos cultivares de milho, a 27±1°C, 75±5% UR e 12 horas de fotofase.

Cultivares	Sistemas de adubação			
	Ausência	Mineral	Orgânica	Combinada
	Ciclo biológico (dias)			
AG 405	50,76 Aa	52,97 Aa	54,90 Aa	52,23 Aa
EMCAPA 201	49,73 Aa	51,03 Aa	52,86 Aa	52,50 Aa
Composto 1	49,75 Aa	51,41 Aa	53,93 Aa	52,16 Aa
Composto 2	51,58 Aa	50,02 Aa	53,23 Aa	51,40 Aa
EMCAPA 202	50,57 Aa	51,89 Aa	51,43 Aa	50,73 Aa
Cultivares	Adultos emergidos			
AG 405	130,00 Aab	119,66 Ab	103,66 Aa	119,33 Aa
EMCAPA 201	164,00 Aa	104,66 Bb	118,00 ABa	123,00 ABa
Composto 1	112,66 Bb	169,66 Aa	129,00 ABa	137,00 ABa
Composto 2	148,66 Aab	145,33 Aab	113,66 Aa	126,00 Aa
EMCAPA 202	146,66 Aab	100,33 Ab	108,66 Aa	120,33 Aa
Cultivares	Índice de suscetibilidade			
AG 405	9,57 Aa	9,02 Aab	8,45 Aa	9,14 Aa
EMCAPA 201	10,23 Aa	9,12 ABab	9,02 Ba	9,15 ABa
Composto 1	9,48 Aa	9,97 Aa	9,01 Aa	9,42 Aa
Composto 2	9,70 Aa	9,96 Aa	8,87 Aa	9,40 Aa
EMCAPA 202	9,85 Aa	8,90 Ab	9,09 Aa	9,43 Aa
	Peso dos adultos (mg)			
AG 405	2,98 Aa	3,01 Aa	2,96 Aa	3,08 Aa
EMCAPA 201	3,09 Aa	2,95 Aa	3,08 Aa	2,94 Aa
Composto 1	3,01 Aa	3,01 Aa	3,04 Aa	2,98 Aa
Composto 2	2,78 Aa	2,96 Aa	2,98 Aa	2,98 Aa
EMCAPA 202	2,97 Aa	2,95 Aa	3,04 Aa	2,98 Aa
	Perda de peso da matéria seca dos grãos (g)			
AG 405	5,18 Aa	4,49 Ab	4,60 Aa	4,87 Aa
EMCAPA 201	5,51 Aa	4,41 Ab	4,69 Aa	4,82 Aa
Composto 1	4,50 Aa	5,59 Aa	5,24 Aa	5,10 Aa
Composto 2	4,63 Aa	5,34 Aab	5,09 Aa	4,76 Aa
EMCAPA 202	5,13 Aa	4,55 Aab	4,79 Aa	4,77 Aa

As médias de cada variável, oriundas de três repetições, seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Observando-se os índices de suscetibilidade apresentados na Tabela 8, verifica-se que, de maneira geral, a resistência dos cultivares a *S. zeamais* não foi influenciada pelos sistemas de adubação. A principal diferença foi observada para o cultivar EMCAPA 201 que se mostrou mais suscetível na ausência de adubação e mais resistente na adubação orgânica.

SINGARAM & KAMALAKUMARI (1999) mostraram que a aplicação de matéria orgânica aumentou o teor de fenólicos em grãos de milho. Os fenólicos são compostos de defesa das plantas contra o ataque de insetos, e diversos estudos já demonstraram que esses compostos têm um papel importante na resistência de grãos de milho ao ataque de *S. zeamais* (SERRATOS & BLANCO-LABRA, 1993; ARNASON *et al.*, 1994; RAMPUTH *et al.*, 1999). Nesse sentido, existe a possibilidade do cultivar EMCAPA 201 ter produzido maior teor de fenólicos na adubação orgânica do que na ausência e, dessa forma, manifestar uma maior resistência com relação ao *S. zeamais*. Porém, para validar essa hipótese, estudos mais profundos devem ser realizados, com diversos cultivares, no sentido de avaliar a influência da adubação orgânica na produção de fenólicos e na resistência dos grãos ao ataque de *S. zeamais*.

Com relação ao peso dos adultos, observa-se que não houve qualquer diferença estatística, nem entre os sistemas de adubação e nem entre os cultivares (Tabela 8). É provável que, mesmo na ausência de adubação, os grãos apresentem os requisitos nutricionais básicos e essenciais para o desenvolvimento de *S. zeamais*. TOSCANO *et al.* (1999) verificaram diferenças entre o peso de adultos de *S. zeamais* emergidos em genótipos de milho, porém, nesse estudo, os autores possuíam materiais de diferentes empresas, com bases genéticas mais amplas, o que permitiu a detecção de diferenças nas variáveis avaliadas e, conseqüentemente, na resistência.

Com relação à perda de peso de matéria seca dos grãos, as únicas diferenças estatísticas ocorreram na adubação mineral e, particularmente, entre o cultivar Composto 1 (5,59 g) e os cultivares AG 405 (4,49 g) e EMCAPA 201 (4,41 g) (Tabela 8). Essas diferenças ocorreram, provavelmente, devido ao número de insetos emergidos que foi maior no Composto 1 e menor nos outros dois cultivares.

Apesar das diferenças nutricionais apresentadas pelos cultivares nos sistemas de adubação não terem influenciado na resistência dos grãos secos ao ataque de *S. zeamais*, futuros estudos poderiam incluir cultivares com bases genéticas mais distintas das que

foram utilizadas no presente estudo, para que se possa compreender melhor a relação entre a nutrição da cultura do milho e sua resistência ao ataque por *S. zeamais*.

4. CONCLUSÕES

Com base nas análises efetuadas e nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- os índices de suscetibilidade evidenciam que os sistemas de adubação não influenciam na resistência ao ataque de *S. zeamais*, embora existam estudos que indiquem que a matéria orgânica aumenta o teor de fenólicos nos grãos de milho o que poderia aumentar a resistência dos grãos ao ataque deste gorgulho;

- a biologia de *S. zeamais* não é afetada pelas características nutricionais dos cultivares avaliados, evidenciando que a composição nutricional dos grãos não tem influência na resistência do grão a esta espécie de inseto de milho armazenado;

- os sistemas de adubação influenciam na produção dos cultivares de milho, sendo que, a ausência de adubação resulta em baixa produção, enquanto que a adubação combinada apresenta maior produção de grãos;

- os sistemas de adubação influenciam na composição nutricional dos grãos, com os teores de cinzas, lipídios e proteínas maiores no sistema de adubação combinada, enquanto que o teor de carboidratos é menor nesse sistema.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNASON, J.T., BAUM, B., GALE, J., LAMBERT, J.D.H., BERGVINSON, D., PHILOGENE, B.J.R., SERRATOS, J.A., MIHM, J., JEWELL, D.C. Variation in resistance of Mexican landraces of maize to maize weevil *Sitophilus zeamais*, in relation to taxonomic and biochemical parameters. **Euphytica**, v.74, p.227-236, 1994.

AZEREDO, E.H., CASSINO, P.C.R., LIMA, E. Avaliação da infestação de insetos-praga associados à batata (*Solanum tuberosum* L.) sob efeito de nutrientes nitrogenados e potássicos e teores acumulados de aminoácidos livres nos cultivares Achat e Monalisa. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.46, n.1, p.7-14, 2002.

BARBOSA, L.J., ROSSI, C.E., CALAFIORI, M.H., TEIXEIRA, N.T. Efeito de zinco, em milho (*Zea mays* L.) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). **Ecossistema**, v.14, p.142-149, 1989.

BETHKER, J.A., PARRELA, M.P., TRUMBLE, J.T., TOSCANO, N.C. Effect of tomato cultivar and fertilizer regime on survival of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). **Journal of Economic Entomology**, v.30, p.200-203, 1987.

BOIÇA JÚNIOR, A.L., LARA, F.M., LUCCIN, L.M., COSTA, G.M. Avaliação dos efeitos da adubação em genótipos de milho sobre a incidência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797), *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) e *Sitophilus zeamais* Mots., 1855. **Cultura Agrônômica**, v.5, n.1, p.39-50, 1996.

BREMNER, J.M., MULVANEY, C.S. Nitrogen-total. In: PAGE, A.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.595-624.

CARVALHO, R.B., TRISTÃO, M.M., GIACON, E., CALAFIORI, M.H., TEIXEIRA, N.T., BUENO, B.F. Estudo de diferentes dosagens de potássio em milho (*Zea mays* L.) influenciando sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). **Ecossistema**, v.9, p.95-100, 1984.

CHABOUSSOU, F. La trophobiose et la protection de la plante. **Revue des Questions Scientifiques**, 143, n.2, p.175-208, 1972.

CREAMER, N.G., BENNETT, M.A., STINNER, B.R., CARDINA, J. A comparison of four processing tomato production systems differing in cover crop and chemical inputs. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.121, n.3, p.559-568, 1996.

CUNHA, A.O., SILVA, V.F., SILVA, A.P., ALMEIDA, F.A., ARAÚJO, E., BRUNO, G.B. Intensidade de pragas e doenças em feijão massacar cultivado em sistemas orgânicos e convencionais. **Hortic. Bras.**, v.18, p.440-442, 2000.

DEFELIPO, B.V., RIBEIRO, A.C. **Análise química do solo: metodologia**. Viçosa: UFV, 1981. 17p.

DOBIE, P. The contribution of the tropical stored products centre to the study of insect resistance in stored maize. **Tropical Stored Products Information Great Britain.**, v.34, p.7-22, 1977.

FALEIRO, F.G., PIKANÇO, M., MIRANDA, M.M.M., ARAÚJO, J.M., SARAIVA, L.S. Resistência de 49 populações de milho a *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.20, p.17-21, 1995.

FERREIRA, A.C.B., ARAÚJO, G.A.A., PEREIRA, P.R.G., CARDOSO, A.A. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agrícola**, v.58, n.1, p.131-138, 2001.

HALSTEAD, D.G.H. The separation of *Sitophilus oryzae* (L.) and *S. zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), with a summary of their distribution. **Entomologist's Monthly Magazine**, v.99, p.72-74, 1963a.

HALSTEAD, D.G.H. External sex differences in stored products Coleoptera. **Bulletin of Entomological Research**, v.54, p.119-134, 1963b.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1985. 492p.

LANE, R.H. Cereal Foods. In: HORWITZ, W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. Gaithersburg, Maryland: AOAC INTERNATIONAL, 2000. V.2, 17th edition, p.1-58.

MALAVOLTA, E. **ABC da análise de solos e folhas: amostragem, interpretação e sugestões de adubação**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992. 132p.

MOREIRA, A.N., OLIVEIRA, J.V., HAJI, F.N.P., PEREIRA, J.R. Efeito de diferentes níveis de NPK na infestação de *Aculops lycopersici* (Masse) (Acari: Eriophyidae), em tomateiro no Submédio do Vale do São Francisco. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, n.2, p.275-284, 1999.

OLIVEIRA, L.J., PARRA, J.R.P., CRUZ, I. Biologia da lagarta-do-cartucho em milho cultivado em solo corrigido para três níveis de alumínio. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.25, n.2, p.157-166, 1990a.

OLIVEIRA, L.J., PARRA, J.R.P., CRUZ, I. Nutrição quantitativa de lagarta-do-cartucho em milho cultivado para três níveis de alumínio. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.25, n.2, p.235-241, 1990b.

OSUNA, J.A., ARAÚJO, J.A.C., ARAÚJO, S.M.C., BORTOLI, S.A., BANZATTO, D.A., MACEDO, E.C. Danos de *Heliothis zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) sob efeito de adubos orgânico e mineral, em três genótipos de milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.18, p.131-138, 1989.

PREZOTTI, L.C. **Recomendação de calagem e adubação para o Estado do Espírito Santo (3ª Aproximação)**. Vitória: EMCAPA, 1992. 73p.

RAMPUTH, A., TESHOME, A., BERGVINSON, D.J., NOZZOLILLO, C., ARNASON, J.T. Soluble phenolic content as an indicator of sorghum grain resistance to *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.35, p.57-64, 1999.

SERRATOS, J.A., BLANCO-LABRA, A., MIHM, J.A., PIETRZAK, L., ARNASON, J.T. Generation means analysis of phenolic compounds in maize grain and susceptibility to maize weevil *Sitophilus zeamais* infestation. **Can. J. Bot.**, v.71, p.1176-1181, 1993.

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 370p.

SINGARAM, P., KAMALAKUMARI, K. Effect of continuous manuring and fertilization on maize grain quality and nutrient soil enzyme relationship. **Madras Agric. J.**, v.86, n.1-3, p.51-54, 1999.

SMITH, B.L. Organic foods vs supermarket foods: element levels. **Journal of Applied Nutrition**, v.45, n.1, p.35-39, 1993.

SOUZA, J.L. **Agricultura orgânica: tecnologias para a produção de alimentos saudáveis**. Domingos Martins: EMCAPA, 1998. 179 p.

TOSCANO, L.C., BOIÇA JÚNIOR, A.L., LARA, F.M., WAQUIL, J.M. Resistência e mecanismos envolvidos em genótipos de milho em relação ao ataque do gorgulho, *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, n.1, p.141-146, 1999.

WAQUIM, J.S. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 1992. 365p.

ZUCATO FILHO, R., FONSECA, M., CALAFIORI, M.H., TEIXEIRA, N.T. Influência de adubação orgânica e mineral sobre a população de pragas do feijão, *Phaseolus vulgaris* L. (Fase II). **Ecosistema**, v.11, p.110-115, 1986.

CAPÍTULO 2

**INIBIDORES DE AMILASE EM HÍBRIDOS DE MILHO, *Zea mays* L. (Poaceae),
COMO FATOR DE RESISTÊNCIA AO ATAQUE DE
Sitophilus zeamais Motschulsky (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

RESUMO

O gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais*, é uma das principais pragas do milho armazenado, sendo controlado, principalmente, com inseticidas químicos. Porém, devido às consequências indesejáveis desses produtos, como, por exemplo, a contaminação dos alimentos e rações com resíduos de ingredientes ativos, outras táticas de controle menos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana e animal estão sendo investigadas, como a utilização de plantas resistentes. A presença de inibidores de α -amilase nos grãos de milho pode interferir na digestão do inseto, mas como esses estudos ainda são escassos, foi desenvolvida esta pesquisa, com o objetivo de avaliar a resistência de híbridos de milho ao ataque por *S. zeamais*, correlacionada com a presença de inibidores de amilase e com a composição nutricional dos grãos. Adultos de *S. zeamais* foram expostos a amostras de grãos de diferentes híbridos, sob temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $75\pm 5\%$, e avaliados quanto ao seu ciclo biológico, peso dos adultos, índice de suscetibilidade e consumo dos grãos. Os resultados foram correlacionados com a composição dos grãos (teores de umidade, cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos) e com a atividade de inibidores de amilase. A atividade inibidora de amilase foi determinada incubando-se o inibidor com 0,2 unidades de amilase durante 30 minutos a 25°C , medindo-se posteriormente a atividade amilásica residual, pelo método iodométrico. Dos parâmetros nutricionais avaliados, somente o conteúdo de lipídios dos híbridos correlacionou-se significativamente com o índice de suscetibilidade em 0,46. Os inibidores de amilase, contidos nos extratos de etanol e tampão, correlacionaram-se significativamente com o índice de suscetibilidade em -0,58, indicando que os inibidores de amilase contribuem para a resistência de híbridos de milho ao ataque de *S. zeamais*.

ABSTRACT

The maize weevil *Sitophilus zeamais* is one of the major pests of stored corn, and it is controlled, mainly, with chemical insecticides. However, due to the undesirable consequences of those products, such as, food and feed contamination with active ingredient residues, other safer control tactics are being investigated, especially the development of resistant plants. The presence of α -amylase inhibitors in corn kernels may interfere in insect digestive processes, but since such studies are still scarce, this research was developed in order to evaluate resistance in corn hybrid against the attack of *S. zeamais*, correlated with amylases inhibitors and nutritional composition of corn kernels. Adults of *S. zeamais* were exposed to grain samples of different corn hybrids, under temperature of $27\pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity of $75\pm 5\%$, and their biology, susceptibility index and grain consumption were evaluated. The results were correlated to the grain components (moisture content, ashes, lipids, proteins and carbohydrates) and with the amylases inhibitors activity. The amylase inhibitor activity was determined by incubating the amylase inhibitor with 0.2 units of amylase for 30 minutes at 25°C , and measuring the residual amylase activity determined by the iodine method. From the nutritional parameters evaluated, only the lipid content correlated significantly with the susceptibility index in 0.46. The amylase inhibitors in ethanol and buffer extracts were correlated significantly with the susceptibility index in -0.58 , indicating that the amylase inhibitors contribute to the resistance of corn hybrids to the attack of *S. zeamais*.

1. INTRODUÇÃO

O gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), é uma das pragas mais importantes do milho armazenado devido ao elevado potencial biótico, capacidade de atacar grãos tanto no campo quanto em armazéns ou silos e de sobreviver em grandes profundidades na massa de grãos (FARONI, 1992).

O controle dessa praga é feito, principalmente, através da utilização de inseticidas. Porém, o uso excessivo desses produtos tem contribuído para a seleção de populações resistentes, bem como, para a contaminação de grãos e seus derivados com resíduos dos ingredientes ativos.

A sociedade, por sua vez, cada vez mais exigente e preocupada com a saúde, deseja consumir alimentos livres de agrotóxicos; conseqüentemente, a indústria repassa a demanda da sociedade aos produtores, exigindo destes a redução ou, às vezes, o abandono do uso de agrotóxicos.

Diante desse quadro, os cientistas, na busca por táticas de controle de insetos que sejam menos danosas ao meio ambiente e ofereçam menos riscos para a saúde humana e animal, têm intensificado suas pesquisas no desenvolvimento de plantas transgênicas. Dentre essas plantas, destacam-se os grãos transgênicos que expressam inibidores de enzimas digestivas dos insetos, especialmente inibidores das α -amilases, que podem representar uma ferramenta promissora para o controle de pragas de grãos armazenados.

As α -amilases constituem uma família de endoamilases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos (FRANCO *et al.*, 2002). Essas enzimas são muito importantes para o desenvolvimento e a sobrevivência de larvas e/ou adultos, especialmente daqueles insetos que se alimentam de grãos ricos em amido como *S. zeamais*.

O mecanismo de interação e especificidade dos inibidores com as α -amilases é complexo e ainda não foi completamente elucidado. Nos inibidores do tipo não proteináceos, a atividade inibitória contra as α -amilases é devida em parte à sua estrutura cíclica que se assemelha aos substratos da α -amilase e se liga nos sítios catalíticos desta enzima (FRANCO *et al.*, 2002). Uma vez que a enzima é inibida, a

assimilação de nutrientes pelo inseto é reduzida, e conseqüentemente, seu desenvolvimento é afetado.

Os primeiros grãos transgênicos expressando inibidores de enzimas digestivas têm-se mostrado eficientes no controle de pragas, conforme evidenciado por SHADE *et al.* (1994). Esses autores demonstraram que ervilhas transgênicas expressando o inibidor de α -amilase α -AI1 (originário de *Phaseolus vulgaris*) foram altamente resistentes aos insetos *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) e *Callosobruchus chinensis* Linn. (Coleoptera: Bruchidae).

Dentre os inibidores mais estudados, destaca-se o α -AI1, encontrado nos grãos do feijão *P. vulgaris*, que inibe α -amilases de diversos insetos-praga, como: *Tribolium castaneum* (Herbst), *Tribolium confusum* Duval e *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) (PUEYO *et al.*, 1995); *C. maculatus*, *C. chinensis* e *Callosobruchus analis* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae) (ISHIMOTO *et al.*, 1996); *Diabrotica vergifera vergifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) (TITARENKO & CHRISPEELS, 2000) e *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) (VALENCIA *et al.*, 2000).

O primeiro estudo com inibidores de α -amilase em grãos de milho foi realizado por BLANCO-LABRA & ITURBE-CHIÑAS (1981). Os autores purificaram uma proteína de 29,6 kDa que inibiu as α -amilases de *S. zeamais*, *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) e *T. castaneum*.

Posteriormente, também no milho, um inibidor de protease/ α -amilase de 12 kDa inibiu as proteases de *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) e as α -amilases de *T. castaneum* e *C. maculatus* (BLANCO-LABRA *et al.*, 1995).

Recentemente, foram descobertos dois novos inibidores de α -amilase em milho. O de 23,8 kDa inibe as α -amilases de *Acanthoscelides obtectus* (Say) e *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae), *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) e *T. castaneum* (FIGUEIRA *et al.*, 2003a). O outro, de 19,7 kDa inibe as α -amilases de *S. zeamais*, *P. truncatus*, *A. obtectus* e *Z. subfasciatus* (FIGUEIRA *et al.*, 2003b).

Tão importante quanto caracterizar a presença desses inibidores em grãos de milho e avaliar seu efeito sobre as α -amilases, é o estudo da participação desses inibidores na resistência de genótipos de milho ao ataque de pragas associadas a esse

cereal. Além disso, outra questão relevante é avaliar até que ponto a composição nutricional dos grãos influencia nessa resistência.

Nesse sentido, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a resistência de genótipos de milho ao ataque de *S. zeamais* e correlacioná-la com inibidores de α -amilase contidos em extratos brutos de grãos de milho e com a composição nutricional destes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Híbridos de milho

Os híbridos de milho foram obtidos do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR-Londrina), produzidos na sua área experimental (altitude de 576 m e a 23°22'S e 51°10'W), no ano agrícola de 2001/02. As características físicas dos 11 materiais são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização dos grãos dos híbridos avaliados quanto à resistência a *Sitophilus zeamais*, produzidos na safra 2001/2002, no IAPAR-Londrina.

Híbridos	Grupo	Classe	Empresa
AG 1051	Mole	Amarelo	AGROCERES
CD 303	Semi-duro	Amarelo	COODETEC
CD 3121	Semi-duro	Amarelo	COODETEC
Dina 766	Semi-duro	Amarelo	DOW AGROSCIENCES
DOW 8480	Duro	Amarelo	DOW AGROSCIENCES
97 HT 129 QPM	Semi-duro	Amarelo	EMBRAPA
BRS 1001	Duro	Amarelo	EMBRAPA
IPT 9/202	Duro	Amarelo	IAPAR
IPS G/58	Semi-duro	Amarelo	IAPAR
Pioneer 30 F 98	Semi-duro	Amarelo	PIONEER
P 30 F 33	Duro	Amarelo	PIONEER

2.2. Secagem e desinfestação dos grãos

Os grãos foram secos à sombra até atingirem 13,5% de umidade, a qual foi determinada pelo método padrão da estufa, a 105±5°C, durante 24h, conforme recomendações de análise em sementes (WAQUIM, 1992).

Após a secagem, os grãos foram armazenados a -20°C por 30 dias, a fim de eliminar os insetos provenientes do campo (FALEIRO *et al.*, 1995).

2.3. Criação dos insetos e infestação das amostras

Os adultos de *S. zeamais* utilizados nos bioensaios foram obtidos da EMBRAPA Milho e Sorgo (Sete Lagoas – MG). Os insetos foram criados em frascos plásticos de 2 L contendo grãos de milho limpo e seco, previamente congelados para eliminar infestações, e mantidos em temperatura ambiente no Laboratório de Entomologia da Universidade Federal do Paraná.

Cada amostra de 100 g de grãos dos híbridos testados foi infestada com 15 fêmeas e 5 machos de *S. zeamais*, com idade entre 7 e 14 dias, por 10 dias, para cópula e oviposição (DOBIE, 1977). Após esse período, esses insetos foram descartados. A identificação da espécie foi realizada pela observação da genitália (HALSTEAD, 1963a) e a sexagem pelas características do rostro (HALSTEAD, 1963b). Trinta dias após a infestação, avaliou-se, a cada dois dias, o número de adultos emergidos, os quais eram descartados após a contagem. Cada amostra foi armazenada em recipiente plástico de 500 mL com tampa telada, em BOD com temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $75\pm 5\%$ e 12 h de fotofase.

2.4. Avaliação da resistência

A resistência dos híbridos de milho foi avaliada pelo índice de suscetibilidade (IS), segundo metodologia proposta por DOBIE (1977). Esta é baseada no número de insetos emergidos por dia e no tempo médio de desenvolvimento, após infestação artificial dos grãos por *S. zeamais*, sendo o índice determinado pelas seguintes equações:

$$\text{IS} = (\ln (\sum x)/T) \times 100 \quad (\text{Equação 1}), \quad \text{onde:}$$

IS = Índice de suscetibilidade;

ln = logaritmo neperiano;

$\sum x$ = somatório do número de gorgulhos emergidos em cada híbrido e;

T = tempo médio gasto para os insetos completarem o ciclo biológico.

$$T = \sum(xy)/\sum x \quad (\text{Equação 2}) \quad \text{onde:}$$

x = número de insetos emergidos diariamente e;

y = número de dias a partir da infestação à emergência.

Além do índice de suscetibilidade para avaliação da resistência dos híbridos, também foram utilizados os seguintes parâmetros: peso dos gorgulhos e perda de peso da matéria seca dos grãos provocada pelos gorgulhos e sua progênie.

Para o cálculo do peso médio dos gorgulhos, pesou-se cinco amostras de 10 indivíduos para cada repetição de cada híbrido. A pesagem dos adultos foi realizada após 24 horas de emergência (TOSCANO *et al.*, 1999). A perda de peso da matéria seca dos grãos foi determinada pela diferença entre o peso da matéria seca inicial e o peso da matéria seca final.

2.5 Análises bromatológicas

Essas análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição da UFPR, a fim de quantificar a composição nutricional dos grãos dos onze híbridos em estudo para correlacioná-la com os parâmetros utilizados na avaliação da resistência ao ataque de *S. zeamais*.

Amostras de 100 g de grãos de cada híbrido foram trituradas separadamente até a granulometria máxima de 48 *mesh*. A partir da farinha obtida avaliou-se: umidade, cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos, usando a metodologia proposta por LANE (2000). Os resultados foram expressos em base seca conforme metodologia descrita no Capítulo 1.

2.6. Avaliação dos inibidores de amilase

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em Londrina, PR.

2.6.1. Extração da amilase

As larvas de *S. zeamais* criadas em grãos de milho foram maceradas e homogeneizadas com tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5,0), na proporção 1:5 (p/v), durante 10 minutos em câmara fria a 4°C. As suspensões foram centrifugadas a 10.000g

durante 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante utilizado como fonte de amilase (BLANCO-LABRA *et al.*, 1995).

2.6.2. Extração do inibidor de amilase solúvel em etanol

A extração foi realizada segundo metodologia utilizada por FIGUEIRA *et al.* (2003a). A farinha dos grãos de milho dos híbridos, com granulometria máxima de 48 *mesh*, foi homogeneizada com etanol a 95% na proporção 1:5 (p/v), durante 2 horas a 25°C. A seguir, as suspensões foram centrifugadas a 10.000g durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado como fonte de inibidor de amilase.

2.6.3. Extração de inibidor de amilase solúvel em tampão

A extração foi realizada conforme metodologia utilizada por FIGUEIRA *et al.* (2003b). A farinha de milho, com granulometria de 48 *mesh*, foi desengordurada por homogeneização com acetona na proporção 1:1 (p/v), durante 15 minutos. Após decantação, a acetona foi descartada. Esse processo foi repetido por mais três vezes. A farinha desengordurada foi seca à temperatura ambiente e armazenada em freezer a -20°C.

Posteriormente, a farinha foi homogeneizada durante 2 horas a 4°C com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 na proporção 1:5 (p/v). Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10.000g por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi dialisado contra água destilada, em câmara fria a 4°C.

2.6.4. Atividade inibidora de amilase

A atividade amilásica foi determinada pelo método iodométrico segundo WILSON & INGLEDEW (1982). O inibidor de amilase foi incubado com 0,2 unidades de amilase durante 30 minutos a 25°C, medindo-se posteriormente a atividade amilásica residual (FIGUEIRA *et al.*, 2003a).

Uma unidade inibidora de amilase (UIA) foi definida como a quantidade de proteína necessária para inibir uma unidade de amilase (UA) nas condições de ensaio.

Uma UA foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido em 60 minutos a 25°C, na presença de 0,038 mg de amido (FIGUEIRA *et al.*, 2003a).

Os resultados obtidos foram calculados segundo as equações 3 e 4, sendo que a equação 3 foi utilizada para determinar a atividade amilásica inicial sem a interação com o inibidor de amilase e a equação 4 para determinar a atividade inibidora da amilase em unidades de inibição por mL de extrato contendo inibidor de amilase (IA).

Com o objetivo de se comparar os resultados entre os híbridos, os valores da equação 4 foram expressos em UIA/g de milho em base seca.

$$UA = \frac{\left\{ 0,038 - \left[\frac{A \times 0,038}{B} \right] \right\}}{0,1} \quad (\text{Equação 3})$$

$$UIA/ml = \left\{ UA - \left[\frac{\left\{ 0,038 - \left[\frac{C \times 0,038}{D} \right] \right\}}{0,1} \right] \right\} \times \frac{1000}{\text{Extrato de IA } (\mu l)} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

UA = Atividade amilásica sem interação com o IA (Controle da atividade amilásica);

A = Densidade óptica (DO) 650 nm correspondente ao controle da amilase;

B = DO a 650 nm correspondente ao controle do amido;

C = DO a 650 nm correspondente à interação entre amilase e IA;

D = DO a 650 nm correspondente ao controle de amido da interação entre amilase e IA.

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Realizou-se análise de correlação entre as variáveis que apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Para as variáveis que se correlacionaram negativa e significativamente com o índice de suscetibilidade foi feita análise de regressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os híbridos que apresentaram os maiores índices de suscetibilidade, ou seja, os menos resistentes ao ataque por *S. zeamais*, foram o Pioneer 30 F 98, Dina 766, CD 303, BRS 1001 e IPS G 58; enquanto que os mais resistentes foram o IPT 9/202, DOW 8480, CD 3121, 97 HT 129 QPM e P 30 F 33 (Tabela 2).

Tabela 2 – Índice de suscetibilidade, número de *Sitophilus zeamais* emergidos, ciclo biológico de ovo a adulto (dias), peso dos adultos (mg) e perda de peso de matéria seca dos grãos (g), obtidos para onze híbridos de milho, a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $75\pm 5\%$ UR e 12 horas de fotofase.

Híbridos	Índice de suscetibilidade	Número de <i>S. zeamais</i> emergidos	Ciclo biológico de ovo a adulto	Peso dos adultos	Perda de peso de matéria seca dos grãos
Pioneer 30 F 98	9,34 a	169,33 a	54,97 ab	2,89 a	6,94 b
Dina 766	9,21 a	153,66 a	54,72 ab	2,83 a	6,85 b
CD 303	9,04 a	107,00 b	51,58 b	2,92 a	3,12 ef
BRS 1001	9,03 ab	144,33 a	54,94 ab	2,91 a	8,67 a
IPS G/58	8,94 ab	103,66 b	51,77 b	2,77 a	4,47 c
AG 1051	8,11 bc	92,66 bc	55,75 ab	2,70 a	4,16 cd
IPT 9/202	7,68 cd	81,66 bc	57,24 a	2,86 a	4,25 c
DOW 8480	7,64 cd	88,00 bc	58,49 a	2,79 a	4,17 cd
CD 3121	7,48 cd	64,33 c	55,63 ab	2,80 a	2,44 f
97 HT 129 QPM	7,30 cd	61,33 c	56,36 a	2,88 a	3,93 cd
P 30 F 33	7,00 d	58,33 c	57,98 a	2,86 a	3,41 de

As médias de cada variável seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5%.

Os híbridos Pioneer 30 F 98, Dina 766 e BRS 1001 foram os que apresentaram as maiores médias para o número de *S. zeamais* emergidos e para perda de peso de matéria seca dos grãos, o que, mais uma vez, indica a maior suscetibilidade desses híbridos e evidencia, portanto, que eles foram os mais adequados para a oviposição e/ou desenvolvimento das larvas (Tabela 2). O bom desempenho das larvas nesses híbridos pode ser explicado pelos baixos níveis de inibição de amilase que os extratos solúveis em tampão propiciaram à enzima digestiva (Tabela 3).

Considerando o menor número de *S. zeamais* emergidos e as menores perdas de peso de matéria seca dos grãos, pode-se considerar os híbridos 97 HT 129 QPM, P 30 F 33 e CD 3121 como os mais resistentes (Tabela 2). Confirmando essa resistência, 97 HT 129 QPM e P 30 F 33 ainda apresentaram médias, para a variável ciclo biológico, significativamente maiores que as dos híbridos considerados suscetíveis: CD 303 e IPS G/58 (Tabela 2). Os híbridos 97 HT 129 QPM, P 30 F 33 e CD 3121, portanto, foram os menos adequados para a oviposição e/ou desenvolvimento das larvas. O baixo desempenho das larvas nesses híbridos pode ser explicado pelos altos níveis de inibição de amilase que os extratos solúveis em etanol e tampão propiciaram à enzima digestiva (Tabela 3).

Tabela 3 – Inibição de amilase de *Sitophilus zeamais*, pelo extrato solúvel em etanol e em tampão, para onze híbridos de milho, após 60 minutos da formação do complexo enzima-inibidor, a 25°C.

Híbridos	Inibição (UIA/g bs) ¹	
	Extrato solúvel em etanol	Extrato solúvel em tampão
97 HT 129 QPM	34,43 a	114,11 a
IPT 9/202	29,51 b	21,89 c
P 30 F 33	27,82 b	23,62 c
CD 3121	27,78 b	79,91 b
AG 1051	27,52 bc	5,83 de
Pioneer 30 F 98	26,56 bc	1,58 e
BRS 1001	26,27 bc	8,59 d
DOW 8480	24,41 cd	6,23 de
Dina 766	21,83 de	5,95 de
IPS G/58	19,26 e	1,76 e
CD 303	12,38 f	5,98 de

¹ Unidade inibidora de amilase por g de milho em base seca.

As médias de cada variável seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5%.

Com relação ao peso dos insetos, constatou-se que não houve diferença significativa para esta variável (Tabela 2). É bastante provável que todos os híbridos apresentem os requerimentos nutricionais básicos para o desenvolvimento de *S.*

zeamais. Essa hipótese é corroborada por ARNASON *et al.* (1993), que mencionam que diferentes níveis de triptofano nas proteínas de grãos de milho não afetam o desempenho de *S. zeamais*. Segundo os autores, o conteúdo de proteínas nos híbridos atuais já é alto e parece estar acima do ótimo para o desenvolvimento de *S. zeamais*. Concluem que maiores valores de triptofano e lisina nas proteínas dos grãos de milho podem ter pouco efeito benéfico para *S. zeamais* se seu requerimento de proteínas básico já foi suprido.

Com relação ao conteúdo de carboidratos, observa-se que as maiores médias foram apresentadas pelos híbridos IPS G/58, CD 3121, Dina 766 e Pioneer 30 F 98 e as menores por CD 303, BRS 1001 e IPT 9/202 (Tabela 4). Visto que híbridos com baixo ou alto conteúdo de carboidratos apresentam valores altos para o índice de suscetibilidade (Tabela 2), conclui-se, portanto, que o conteúdo de carboidratos não deva influenciar na resistência a *S. zeamais*. De acordo com TORRES *et al.* (1996), o conteúdo de carboidratos também não influenciou na resistência de variedades de sorgo ao ataque de *S. oryzae*.

Tabela 4 – Componentes nutricionais (em porcentagem) de grãos de onze híbridos de milho utilizados para a avaliação da resistência a *Sitophilus zeamais*.

Híbridos	Carboidratos bs ¹	Proteínas bs	Lípidios bs	Cinzas bs	Umidade
IPS G/58	72,71 a	8,11 def	4,47 d	1,10 a	13,59 a
CD 3121	72,45 ab	7,60 f	5,46 bc	1,15 a	13,31 a
Dina 766	71,80 abc	7,99 ef	5,72 abc	1,09 a	13,38 a
Pioneer 30 F 98	71,45 abc	8,48 cde	5,41 c	1,11 a	13,54 a
AG 1051	71,29 bc	8,52 cde	5,66 abc	1,07 a	13,45 a
97 HT 129 QPM	70,74 cd	8,69 cd	6,06 ab	1,11 a	13,38 a
P 30 F 33	70,69 cd	8,73 c	5,91 abc	1,11 a	13,54 a
DOW 8480	70,54 cd	8,44 cde	6,12 a	1,18 a	13,71 a
CD 303	69,81 d	9,98 ab	5,61 abc	1,17 a	13,42 a
BRS 1001	69,75 d	9,44 b	6,06 ab	1,10 a	13,63 a
IPT 9/202	69,58 d	10,33 a	5,65 abc	1,15 a	13,28 a

¹ base seca

As médias de cada variável seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5%.

Com relação ao conteúdo de proteínas, observa-se que as maiores médias foram apresentadas pelos híbridos IPT 9/202 e CD 303 e as menores por IPS G/58, Dina 766 e CD 3121 (Tabela 4). Visto que híbridos com baixos ou altos níveis de proteínas apresentam altos valores para o índice de suscetibilidade (Tabela 2), conclui-se que o conteúdo de proteínas não influenciou na resistência a *S. zeamais*. O conteúdo de proteínas, mesmo com diferentes níveis de lisina e triptofano, também não influenciou na resistência de genótipos de milho ao ataque por *S. zeamais* (GÓMEZ *et al.*, 1994). Porém, CLASSEN *et al.* (1990) constataram que o conteúdo de proteínas influenciou na resistência de grãos de milho ao ataque por *S. zeamais*.

O conteúdo de lipídios diferiu estatisticamente entre diversos híbridos, mais acentuadamente entre DOW 8480 e IPS G/58 com teor médio de, respectivamente, 6,12% e 4,47% (Tabela 4). Observa-se, também, que vários outros híbridos apresentaram médias que não diferiram estatisticamente da média do híbrido DOW 8480 e, por causa disso, fica difícil estabelecer uma relação entre o conteúdo de lipídios e as variáveis utilizadas para avaliar a resistência a *S. zeamais*.

Não houve diferença significativa para as variáveis umidade e cinzas (Tabela 4). A ausência de diferença estatística para a variável cinzas, indica que não há diferença entre o conteúdo de minerais dos híbridos.

O índice de suscetibilidade não se correlacionou significativamente com os parâmetros nutricionais avaliados - lipídios, proteínas e carboidratos (Tabela 5). Correlação não significativa entre o conteúdo de carboidratos e o índice de suscetibilidade também foi observada por TORRES *et al.* (1996), estudando a resistência de variedades de sorgo a *S. oryzae*.

Os resultados encontrados nesta pesquisa discordam dos encontrados por CLASSEN *et al.* (1990). Esses autores encontraram uma correlação negativa entre o conteúdo de proteínas e o índice de suscetibilidade, de 0,69 com $p < 0,05$. Possivelmente, essas divergências de resultados são devidas às diferenças dos materiais avaliados e das condições de ensaio entre as duas pesquisas.

Os resultados encontrados nesta pesquisa também discordam dos encontrados por ARNASON *et al.* (1993). Esses autores encontraram uma correlação negativa entre o conteúdo de lipídios e o índice de suscetibilidade, de 0,65, com $p = 0,05$. Porém, ressalta-se que um importante parâmetro de resistência dos grãos a *S. zeamais*, o ciclo

biológico, apresentou, nesta pesquisa, uma correlação positiva com o conteúdo de lipídios, 0,46 a $p < 0,05$ (Tabela 5). Portanto, quanto maior o conteúdo de lipídios, mais longo será o ciclo biológico e, conseqüentemente, menor será o número de gerações produzidas por *S. zeamais*.

Tabela 5 – Coeficientes de correlação entre nove variáveis, considerando a resistência de onze híbridos de milho a *Sitophilus zeamais*.

	Ni ¹	Cb ²	Is ³	Pp ⁴	UiaE ⁵	UiaT ⁶	Li ⁷	Pr ⁸	Ch ⁹
Ni									
Cb	-0,33 ^{ns}								
Is	0,89*	-0,71*							
Pp	0,84*	-0,09 ^{ns}	0,65*						
UiaE	-0,34 ^{ns}	0,61*	-0,58*	0,02 ^{ns}					
UiaT	-0,58*	0,22 ^{ns}	-0,58*	-0,41*	0,60*				
Li	-0,12 ^{ns}	0,46*	-0,32 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,39*	0,23 ^{ns}			
Pr	-0,03 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	0,24 ^{ns}		
Ch	0,05 ^{ns}	-0,24 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	0,11 ^{ns}	-0,62*	-0,86*	

^{ns} não significativo

* significativo pelo teste *t* ao nível de 5%

¹ Número de insetos emergidos

² Ciclo biológico

³ Índice de suscetibilidade

⁴ Perda de peso da matéria seca dos grãos

⁵ Unidade inibidora de amilase do extrato solúvel em etanol

⁶ Unidade inibidora de amilase do extrato solúvel em tampão

⁷ Lipídios

⁸ Proteínas

⁹ Carboidratos

O ciclo biológico também foi correlacionado positivamente com as unidades inibidoras de amilase contidas no extrato solúvel em etanol, 0,61 a $p < 0,05$ (Tabela 5). Isso evidencia que os híbridos com maior teor de UIAs em seus grãos retardaram mais o desenvolvimento das larvas, quando comparados com os híbridos com menor teor de UIAs e, conseqüentemente, prolongaram mais o ciclo biológico de *S. zeamais*.

O índice de suscetibilidade correlacionou-se negativamente com as UIA em etanol e em tampão, em ambos os casos, em 0,58 a $p < 0,05$ (Tabela 5). Esses resultados

indicam que à medida que o valor das unidades inibidoras de amilase aumenta também aumenta a resistência dos híbridos a *S. zeamais*.

A variação das UIA no extrato solúvel em etanol explicou 45% da variação do índice de suscetibilidade (Figura 1). Enquanto que a variação das UIA no extrato solúvel em tampão explicou 60% da variação desse mesmo índice (Figura 2). ARNASON *et al.* (1993) verificaram que a variação no conteúdo de fenólicos explicava 63% da variação do índice de suscetibilidade enquanto RAMPUTH *et al.* (1999) encontraram 55%. Assim, visto que nesta pesquisa os inibidores de amilase presentes nos híbridos de milho explicam as variações do índice de suscetibilidade com valores próximos aos que são explicados pelos compostos fenólicos, conclui-se, então, que os inibidores de amilase influenciaram no índice de suscetibilidade e, conseqüentemente, na resistência dos grãos ao ataque por *S. zeamais*.

BLANCO-LABRA & ITURBE-CHIÑAS (1981) e FIGUEIRA *et al.* (2003b) purificaram e caracterizaram, respectivamente, uma proteína de 29,6 kDa e outra de 19,7 kDa, ambas em grãos de milho, e demonstraram que as duas proteínas tem atividade inibitória contra as amilases de *S. zeamais*. Portanto, é bastante provável que essas proteínas estejam presentes nos extratos, solúveis em etanol e em tampão, e que sejam elas as responsáveis pela atividade inibitória das amilases de *S. zeamais*, demonstradas no presente estudo. Ressalta-se, porém, que estudos futuros devem ser realizados para confirmar, ou não, a presença dessas proteínas nos híbridos avaliados nesta pesquisa.

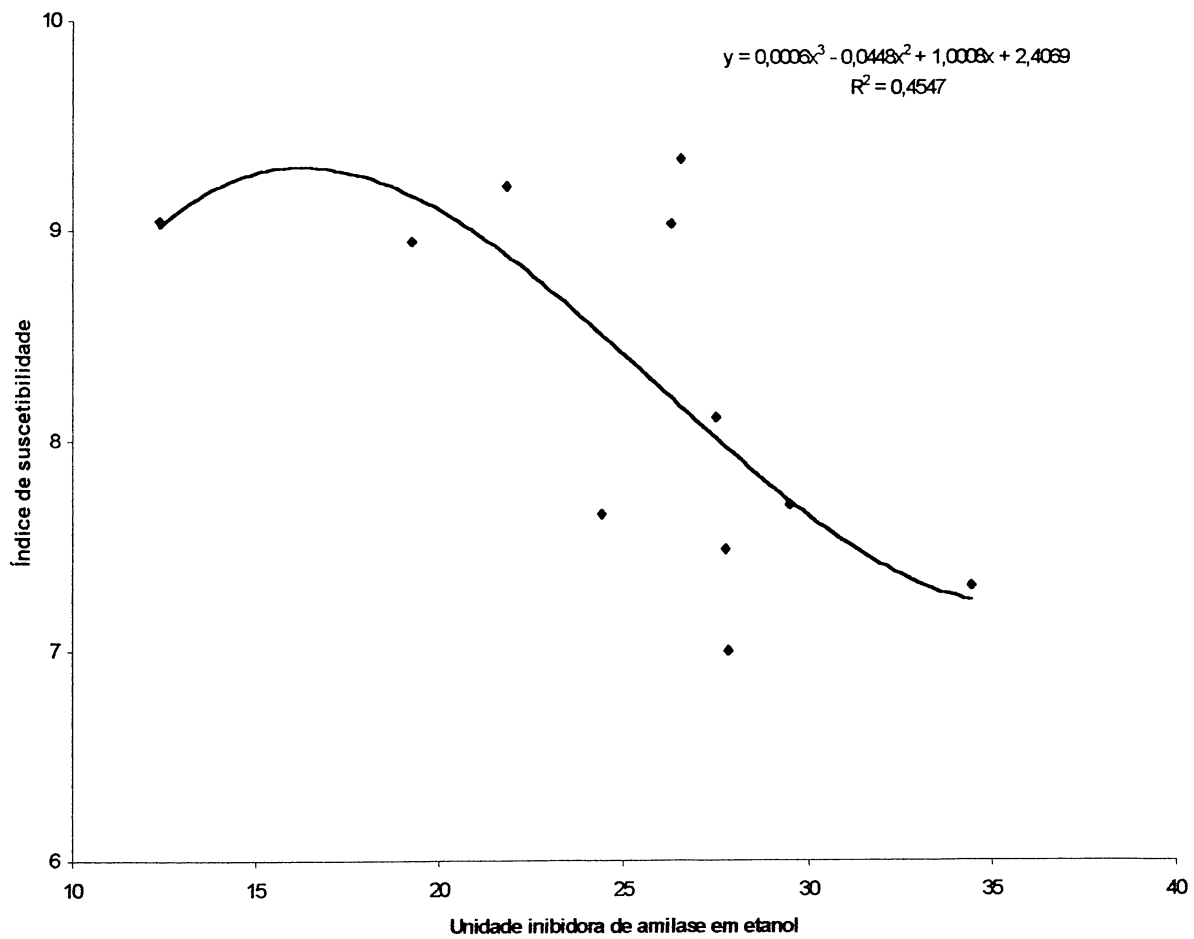


Figura 1 – Estimativa do índice de suscetibilidade em função dos valores de unidade inibidora de amilase em etanol, considerando onze híbridos de milho.

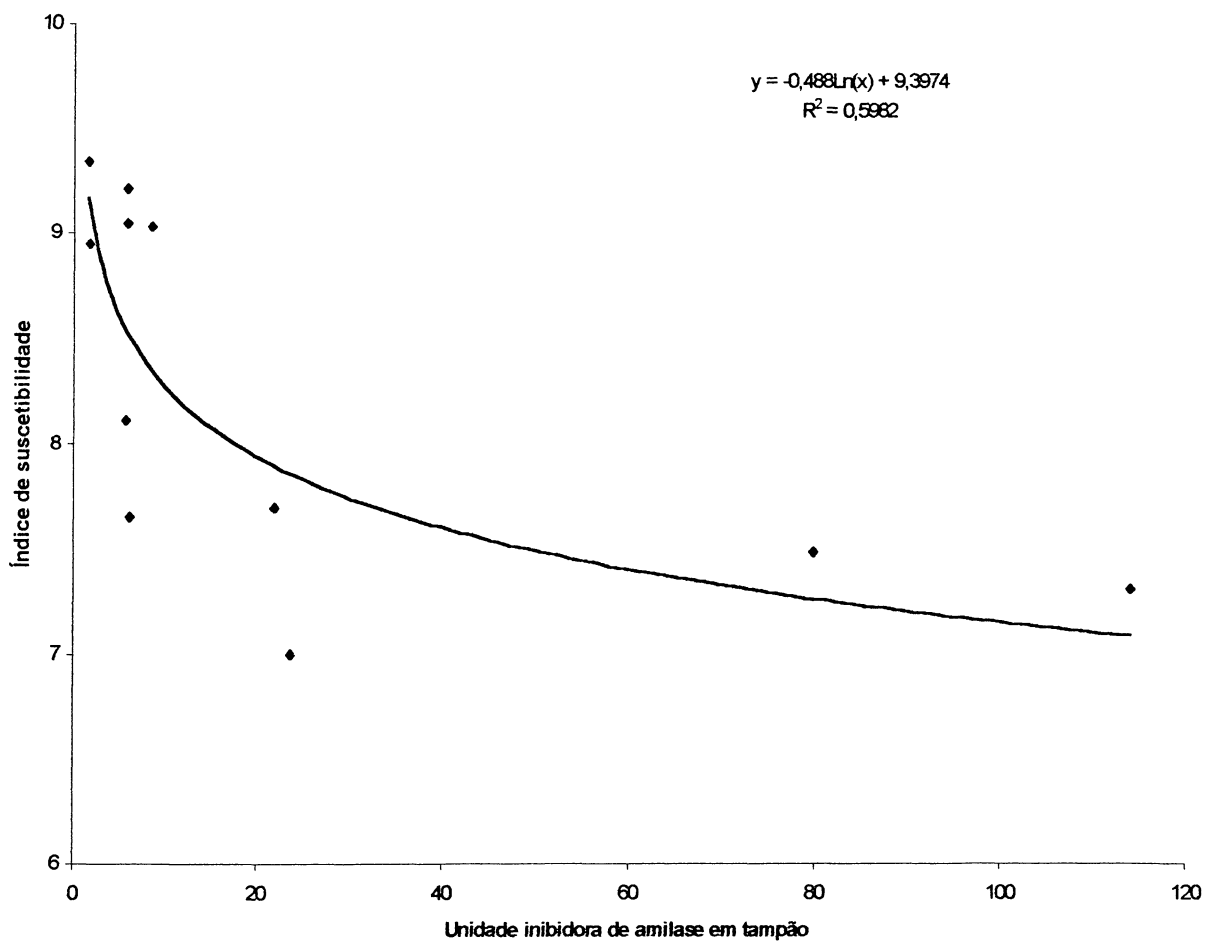


Figura 2 – Estimativa do índice de suscetibilidade em função dos valores de unidade inibidora de amilase em tampão, considerando onze híbridos de milho.

4. CONCLUSÕES

Com base nas análises efetuadas e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- o índice de suscetibilidade indicou que os híbridos de milho mais resistentes ao ataque de *S. zeamais* foram IPT 9/202, DOW 8480, CD 3121, 97 HT 129 QPM e P 30 F 33, enquanto que os mais suscetíveis foram Pioneer 30 F 98, Dina 766, CD 303, BRS 1001 e IPS G 58;
- a presença dos inibidores de amilase nos grãos é, pelo menos parcialmente, responsável pela resistência dos híbridos de milho ao ataque de *S. zeamais*;
- os conteúdos de proteínas e carboidratos nos grãos não influenciam na resistência dos híbridos ao *S. zeamais*;
- o ciclo biológico de *S. zeamais* prolonga-se à medida que aumenta o conteúdo de lipídios nos grãos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNASON, J.T., LAMBERT, J.D.H., GALE, J., MIHM, J., BJARNASON, M., JEWELL, D., SERRATOS, J.A., FREGEAU-REID, J., PIETRZAK, L. Is "quality protein" maize more susceptible than normal cultivars to attack by the maize weevil *Sitophilus zeamais*? **Postharvest Biology and Technology**, v.2, p.349-358, 1993.

BLANCO-LABRA, A., ITURBE-CHIÑAS, F.A. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). **Journal of Food Biochemistry**, v.5, p.1-17, 1981.

BLANCO-LABRA, A., CHAGOLLA-LOPEZ, A., MARTÍNEZ-GALLARDO, N., VALDES-RODRIGUES, S. Further characterization of the 12 kDa protease/alpha-amylase inhibitor present in maize seeds. **Journal of Food Biochemistry**, v.19, p.27-41, 1995.

CLASSEN, D., ARNASON, J.T., SERRATOS, J.A., LAMBERT, J.D.H., NOZZOLILLO, C., PHILOGÈNE, B.J.R. Correlation of phenolic acid content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the maize weevil, in CIMMYT'S collections. **Journal of Chemical Ecology**, v.16, n.2, 1990.

DOBIE, P. The contribution of the tropical stored products centre to the study of insect resistance in stored maize. **Tropical Stored Products Information Great Britain**, v.34, p.7-22, 1977.

FALEIRO, F.G., PIKANÇO, M., MIRANDA, M.M.M., ARAÚJO, J.M., SARAIVA, L.S. Resistência de 49 populações de milho a *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.20, p.17-21, 1995.

FARONI, L.R.A. Manejo das pragas de grãos armazenados e sua influência na qualidade do produto final. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.76, p.36-43, 1992.

FIGUEIRA, E.L.Z., BLANCO-LABRA, A., GERAGE, A.C., ONO, E.Y.S., MENDIOLA-OLAYA, E., UENO, Y., HIROOKA, E.Y. Amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant Disease**, v.87, n.3, p.233-240, 2003a.

FIGUEIRA, E.L.Z., HIROOKA, E.Y., MENDIOLA-OLAYA, E., BLANCO-LABRA, A. Characterization of an hydrophobic amylase inhibitor from corn (*Zea mays*) seeds with activity against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Phytopathology**, v.93, n.8, p.917-922, 2003b.

FRANCO, O.L., RIGDEN, D.J., MELO, F.R., GROSSI de SA, M.F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. **Eur. J. Biochem.**, v.269, p.397-412, 2002.

GÓMEZ, H.S., SANTOS, J.P., LIMA, J.O.G. Resistencia de genotipos de maíz con diferentes características físicas y químicas al ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v.20, n.1, p.37-42, 1994.

HALSTEAD, D.G.H. The separation of *Sitophilus oryzae* (L.) and *S. zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), with a summary of their distribution. **Entomologist's Monthly Magazine**, v.99, p.72-74, 1963a.

HALSTEAD, D.G.H. External sex differences in stored products Coleoptera. **Bulletin of Entomological Research**, v.54, p.119-134, 1963b.

ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPPEELS, M.J.; KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed alpha-amylase inhibitor of common bean. **Entomologia Experimentallis et Applicata**, v.79, n.3, p.309-315, 1996.

LANE, R.H. Cereal Foods. In: HORWITZ, W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. Gaithersburg, Maryland: AOAC INTERNATIONAL, 2000. V.2, 17th edition, p.1-58.

PUEYO, J.J., MORGAN, T.D., AMEENUDDIN, N., LIANG, C., REECK, G.R., CHRISPPEELS, M.J., KRAMER, K.J. Effects of bean and wheat α -amylase inhibitors on α -amylase activity and growth of stored product insect pests. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.74, p.237-244, 1995.

RAMPUTH, A., TESHOME, A., BERGVINSON, D.J., NOZZOLILLO, C., ARNASON, J.T. Soluble phenolic content as an indicator of sorghum grain resistance to *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.35, p.57-64, 1999.

SHADE, R.E., SCHROEDER, H.E., PUEYO, J.J., TABE, L.M., MURDOCK, L.L., HIGGINS, T.J.V., CHRISPPEELS, M.J. Transgenic pea seeds expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. **Bio/Technology**, v.12, n.8, p.793-796, 1994.

TITARENKO, E., CHRISPPEELS, M.J. cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.979-990, 2000.

TORRES, J.B., SAAVEDRA, J.L.D., ZANUNCIO, J.C., WAQUIL, J.M. Resistance of sorghum to *Sitophilus oryzae* (L.) and its association with varietal parameters. **International Journal of Pest Management**, v.42, n.4, p.277-280, 1996.

VALENCIA, A., BUSTILLO, A.E., OSSA, G.E., CHRISPPEELS, M.J. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.207-213, 2000.

WAQUIM, J.S. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 1992. 365p.

WILSON, J.J., INGLEDEW, W.M. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.2, p.301-307, 1982.

CAPÍTULO 3

**RESISTÊNCIA DE HÍBRIDOS DE MILHO, *Zea mays* L. (Poaceae),
ASSOCIADA A PROTETORES DE GRÃOS
NO CONTROLE DE *Sitophilus zeamais* Motschulsky
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

RESUMO

Devido aos problemas de resistência de insetos a inseticidas, a utilização de plantas resistentes representa uma ferramenta promissora em programas de manejo integrado de pragas de grãos armazenados, podendo ser associada a outras medidas de controle. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a associação de genótipos resistentes de milho com os protetores de grãos usados convencionalmente, terra de diatomácea e deltametrina, para o controle de *Sitophilus zeamais*. Seis híbridos de milho foram tratados com quatro dosagens de terra de diatomácea, 125, 250, 500 e 1000 g/t, e com quatro de deltametrina, 0,125, 0,25, 0,5 e 1,0 g i.a./t, além de uma testemunha sem tratamento. Cada parcela experimental, acondicionada em frasco plástico com tampa telada, continha 100 g de grãos de cada híbrido, infestada com 30 adultos de *S. zeamais*, de 7 a 14 dias de idade, não sexados. Os frascos foram acondicionados em BOD a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $75\pm 5\%$ de UR. Avaliou-se a mortalidade acumulada do 1° ao 28° dia, quando foram retirados os adultos. A avaliação da produção dos descendentes foi feita aos 56 dias. A deltametrina apresentou um controle mais rápido que a terra de diatomácea, na dosagem de 1,0 g i.a./t causou 100% de mortalidade aos três dias, e as de 0,25 e 0,5 g i.a./t aos cinco dias de exposição. Os tratamentos com 1000 e 500 g/t de terra de diatomácea foram 100% eficientes no controle de *S. zeamais* aos 7 e 14 dias de exposição, respectivamente. As dosagens mais baixas de deltametrina e de terra de diatomácea não atingiram 100% de eficiência no controle de *S. zeamais*, mesmo após 28 dias de exposição. Com exceção das três dosagens mais altas de deltametrina, todos os demais tratamentos apresentaram descendentes após 56 dias. Os híbridos mais resistentes, D 8480 e D 8420, mesmo na testemunha ou quando associados a baixas dosagens de deltametrina ou de terra de diatomácea, reduziram a produção de descendentes de *S. zeamais* quando comparados com os demais híbridos. Esses resultados indicam que há um efeito aditivo resultante da associação de características de resistência de determinados híbridos com outras medidas de controle, o que pode proporcionar uma melhor armazenabilidade dos grãos.

ABSTRACT

Due to insect resistance to insecticides, the use of resistant plants represents a promising tool in integrated pest management programs of stored grains, and it can be associated to other control measures. The objective of this research was to evaluate the association of resistant genotypes of corn with grain protectors conventionally used on stored grains, diatomaceous earth and deltamethrin, for the control of *Sitophilus zeamais*. Six corn hybrids were treated with four dosages of diatomaceous earth, 125, 250, 500 and 1000 g/t, and with four of deltamethrin, 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 g a.i./t, besides an untreated control. The treatments were kept in plastic vials covered with screen lid, containing 100 g of kernels of each hybrid, infested with 30 non-sexed adults of *S. zeamais*, 7 to 14 days old. The vials were maintained in BOD at $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ and $75\pm 5\%$ RU. The accumulated mortality was evaluated from the 1st to the 28th day, when the adults were removed. The progeny evaluation was done by the 56th day. Deltamethrin showed a faster control than diatomaceous earth; at 1.0 g a.i./t, causing 100% mortality by the third day, while at 0.25 and 0.5 g a.i./t it took five days to reach this control level. The treatments with 1000 and 500 g/t of diatomaceous earth exerted 100% control of *S. zeamais* by the 7th and 14th days of exposition, respectively. The lowest dosages of deltamethrin and of diatomaceous earth did not reach 100% efficiency against *S. zeamais*, even after 28 days. Except for the three highest dosages of deltamethrin, the insects reproduced and left their progenies in the other treatments. The most resistant hybrids, D 8480 and D 8420, either in the control or associated to the lowest dosages of deltamethrin and diatomaceous earth, caused reduction of progeny of *S. zeamais* when compared to the other hybrids. These results indicate that there is an additive effect resulting from the association of resistance characteristics of certain hybrids with other control measures providing better grain storage conditions.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, que é um dos maiores produtores de milho do mundo, produziu na safra 2002/2003, 47.384.000 t de grãos (CONAB, 2003). Essa produção poderia ser maior não fossem as perdas ocasionadas, principalmente, pelo ataque dos insetos e fungos. BENTO (1999) estimou que, em média, as perdas anuais ocasionadas por insetos na cultura do milho são de 7,0%.

Os grãos são atacados por insetos tanto no campo como durante o armazenamento, resultando em perda de peso e do poder germinativo das sementes, contaminação por fungos e desvalorização comercial dos grãos (LAZZARI, 1997).

Diante de tais perdas e com o intuito de preservar a qualidade física e nutricional dos grãos fazem-se necessárias medidas de controle dos insetos, com destaque para os inseticidas. Apesar da eficiência desses químicos no controle de pragas, falhas na aplicação desses produtos, desrespeito às recomendações técnicas dos fabricantes e o uso indiscriminado têm favorecido a seleção de populações de insetos resistentes aos inseticidas. LORINI (2001) apresenta uma revisão sobre os registros de resistência das principais pragas de grãos armazenados no Brasil aos inseticidas mais utilizados para o controle como, fosfina, deltametrina, pirimifós-metil, fenitrothion, clorpirifós-metil, malation e permetrina.

Além da resistência, outra desvantagem dos inseticidas é a contaminação com resíduos dos ingredientes ativos nos alimentos e no meio ambiente. Nesse sentido, uma outra técnica de controle que pode ser utilizada no manejo integrado de pragas (MIP) de grãos armazenados e que tem demonstrado resultados satisfatórios é a aplicação de pós inertes. Existem quatro tipos básicos de pós inertes: argilas e areias, terra de diatomáceas, sílica aerogel (silicato de sódio) e não derivados da sílica (rochas fosfatadas) (LORINI, 2001).

Dentre os pós inertes, a terra de diatomáceas destaca-se no controle de pragas de grãos armazenados. Diversos estudos já demonstraram o potencial de controle desse produto sobre os principais insetos de armazenamento, *Tribolium confusum* Duval (Coleoptera: Tenebrionidae) (ALDRYHIM, 1990); *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) (PINTO JÚNIOR, 1994); *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae), *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae),

Cryptolestes ferrugineus (Stephens) (Coleoptera: Cucujidae) e *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) (SUBRAMANYAM *et al.*, 1994); *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) (ARTHUR, 2001); *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) (COOK & ARMITAGE, 2002) e *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) (CERUTI, 2003).

A terra de diatomácea é obtida de depósitos de carapaças de algas diatomáceas oriundas da era Cenozóica, constituídas predominantemente de sílica amorfa (dióxido de sílica) (SUBRAMANYAM & ROESLI, 2000). Segundo esses autores, a morte dos insetos pela terra de diatomácea é atribuída à dessecação provocada pela adsorção e abrasividade deste pó inerte que rompe a camada de cera da epicutícula dos insetos, fazendo com que eles percam água do corpo até morrerem.

A atividade inseticida da terra de diatomácea é afetada pela mobilidade dos insetos, pelo número e distribuição de pelos na cutícula, pelas diferenças quantitativas e qualitativas nos lipídios cuticulares das diferentes espécies de insetos e pelo tempo de exposição, o que influencia na taxa de perda d'água (SUBRAMANYAM *et al.*, 1998).

Formulações comerciais à base de terra de diatomácea estão registradas nos Estados Unidos da América como aditivo alimentar (BANKS & FIELDS, 1995) e como agrotóxico da classe IV, no Brasil (LORINI, 2001). A terra de diatomácea apresenta baixa toxicidade aos mamíferos, não afeta a germinação e a qualidade de grãos para panificação (ALDRYHIM, 1990) e pode ser compatível com outros métodos de controle no manejo integrado de pragas de grãos armazenados (LORINI, 2001).

Diversos estudos já demonstraram a existência de genótipos de milho resistentes a uma das principais pragas de armazenamento, *S. zeamais* (SERRATOS *et al.*, 1987; ARNASON *et al.*, 1994; GÓMEZ *et al.*, 1994; BOIÇA JÚNIOR *et al.*, 1997; TOSCANO *et al.*, 1999; CANEPPELE *et al.*, 2003). Porém, a associação de genótipos resistentes de plantas a insetos-praga de grãos armazenados com outros métodos de controle, apesar de ser importante no MIP, tem sido pouco explorada no meio científico. Nesse sentido, esta pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito da associação de genótipos de milho com os protetores de grãos, terra de diatomácea e deltametrina, como uma ferramenta valiosa para o controle de *S. zeamais*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Híbridos de milho

Os híbridos de milho utilizados nesta pesquisa foram obtidos da DOW AGROSCIENCIES, sendo suas características físicas apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização física dos grãos dos híbridos de milho utilizados nos experimentos de resistência a *Sitophilus zeamais*.

Híbridos	Grupo	Classe
D 766	Semi-duro	Amarelo
D CO 32	Semi-duro	Amarelo
D 170	Semi-duro	Amarelo
D 8480	Duro	Amarelo
D 8420	Duro	Amarelo
D CE 03	Duro	Amarelo

Uma vez obtidos, os grãos foram secos à sombra até atingirem 13,5% de umidade. Na determinação de umidade, utilizou-se o método padrão da estufa, 105±5°C, durante 24h (WAQUIM, 1992). Após a secagem, os grãos foram armazenados a -20°C, por 30 dias, a fim de eliminar os insetos provenientes do campo (FALEIRO *et al.*, 1995).

2.2. Obtenção e criação dos insetos

Os adultos de *S. zeamais* utilizados nos bioensaios foram obtidos através da EMBRAPA – Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, e criados conforme descrito no Capítulo 1.

2.3. Caracterização dos protetores de grãos

A terra de diatomácea utilizada foi o produto comercial KEEPDRY[®], de origem marinha, cujas características, indicadas pelo fornecedor, são: mínimo de 88 a 90% de sílica amorfa (SiO₂); partículas de 10-15 µm; densidade aparente de 200-230 g/L; coloração bege para o branco, aspecto de pó seco, solto e leve, insolúvel em água e livre de materiais estranhos.

O inseticida químico utilizado foi a deltametrina (K-Obiol[®] – 2P) em pó.

2.4. Delineamento experimental e Bioensaios com os protetores de grãos

Nesta pesquisa adotou-se o delineamento em blocos ao acaso, em esquema fatorial, no qual cada um dos seis híbridos de milho foram submetidos a quatro dosagens de terra de diatomácea (125, 250, 500 e 1000 g/t), a quatro dosagens de deltametrina (0,125, 0,25, 0,5 e 1,0 g i.a./t) e uma testemunha, sem tratamento, com três repetições.

Cada parcela experimental consistiu de 100 g de grãos de cada híbrido, tratados com terra de diatomácea ou deltametrina, acondicionados em frascos plásticos de 250 mL com tampa telada. Após a aplicação dos produtos, cada parcela experimental foi infestada com 30 adultos de *S. zeamais* de 7 a 14 dias de idade, não sexados. A seguir, os potes foram acondicionados em BOD a 27±1°C, 75±5% de UR e 12h de fotofase.

Avaliou-se a mortalidade acumulada, peneirando-se os grãos, no 1°, 3°, 5°, 7°, 14°, 21° e 28° dias após a infestação com os adultos de *S. zeamais*. Foram considerados mortos os insetos que em 1 minuto não conseguiram desvirar-se quando colocados de costas (FAO, 1974). Quando a testemunha apresentou mortalidade, as médias dos tratamentos foram corrigidas pela fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925). Ao final da última avaliação, no 28° dia, todos os insetos vivos foram retirados e os frascos com os grãos mantidos na BOD até 56 dias após a infestação. Ao final desse período avaliou-se a presença de insetos adultos da geração subsequente.

Considerou-se eficiente o tratamento que causou 100% de mortalidade dos insetos. Este valor foi estabelecido em razão do grande potencial biótico dessa praga de grãos armazenados (FARONI, 1992) e à exigente legislação brasileira com relação ao

número de fragmentos de insetos que podem ser encontrados nas farinhas dos cereais (BRASIL, 1986).

2.5. Análise de resíduo de deltametrina

Após o período de carência de 30 dias, uma amostra de 300 g de grãos, do tratamento com 1,0 g i.a./t, foi enviada ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) da UFPR e submetida à análise de resíduos pelo método da extração com acetonitrila e quantificação por cromatografia gasosa, utilizando-se detector de captura de elétrons (ECD) (CALIFORNIA, DEPARTMENT OF FOOD AND AGRICULTURE, 1987).

2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Foram estimadas equações de regressão para a mortalidade acumulada do 1° ao 28° dia após a infestação.

3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mortalidade acumulada de *S. zeamais* nos tratamentos com deltametrina e terra de diatomácea apresentou um comportamento semelhante em todos os híbridos estudados, ou seja, foi maior nas maiores dosagens dos dois produtos (Tabelas 2 e 3), sendo que nenhum causou 100% de mortalidade já no primeiro dia após a exposição. Além disso, em todos os híbridos, também se observou uma tendência para o aumento da mortalidade à medida que aumentou o tempo de exposição aos protetores de grãos (Figuras 1 a 6).

A eficiência de 100% de controle com terra de diatomácea ocorreu na dosagem recomendada pelo fabricante, 1000 g/t, aos sete dias após a exposição; na dosagem de 500 g/t aos 14 dias; nas dosagens de 250 e 125 g/t, mesmo após 28 dias de exposição não atingiu 100% de mortalidade (Tabelas 2 e 3).

LORINI (1999) também verificou 100% de mortalidade para *Sitophilus* spp. nas dosagens de terra de diatomácea de 1000 g/t e 500 g/t, porém, após 20 e 30 dias de exposição, respectivamente. O autor também não constatou eficiência de controle na dosagem de 250 g/t, mesmo após 30 dias de exposição. Da mesma forma, SUBRAMANYAM *et al.* (1994) verificaram 100% de mortalidade, sete dias após a exposição à terra de diatomácea para as pragas *R. dominica* e *S. oryzae*, na dosagem de 1000 g/t, e para as pragas *O. surinamensis*, *C. ferrugineus* e *T. castaneum*, na dosagem de 500 g/t.

PINTO JÚNIOR (1994), ao estudar a mortalidade de *Sitophilus* spp. expostos à terra de diatomácea nas dosagens de 250, 500 e 750 g/t, observou um efeito interativo entre a dosagem e o período de exposição, ou seja, períodos maiores de exposição, nas dosagens mais elevadas, proporcionaram um melhor controle da população, resultados que se assemelham aos encontrados nesta pesquisa.

Tabela 2 – Mortalidade acumulada de adultos de *Sitophilus zeamais* (%) nos híbridos de milho, D 766, D 8480 e D CO 32, submetidos a nove tratamentos: testemunha (T1), terra de diatomácea nas dosagens de 125 g/t (T2), 250 g/t (T3), 500 g/t (T4) e 1000 g/t (T5) e deltametrina nas dosagens de 0,125 g i.a./t (T6), 0,25 g i.a./t (T7), 0,5 g i.a./t (T8) e 1,0 g i.a./t (T9), ao longo de 28 dias, a 27±1°C, 75±5% de UR e 12 horas de fotofase.

Dias	Tratamentos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
D 766									
1	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	20,00 D	40,00 C	61,11 B	85,56 A
3	0,00 F	0,00 F	0,00 F	18,89 E	35,56 D	42,22 D	61,11 C	88,89 B	100,00 A
5	0,00 E	0,00 E	8,89 D	58,89 C	85,56 B	57,78 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
7	0,00 F	8,89 E	36,67 D	71,11 B	100,00 A	62,22 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
14	0,00 E	23,33 D	83,33 B	100,00 A	100,00 A	65,56 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
21	0,00 D	38,89 C	93,33 A	100,00 A	100,00 A	65,56 B	100,00 A	100,00 A	100,00 A
28	3,33 D	45,98 C	94,25 A	100,00 A	100,00 A	64,37 B	100,00 A	100,00 A	100,00 A
D 8480									
1	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	22,22 D	43,33 C	58,89 B	85,56 A
3	0,00 G	0,00 G	0,00 G	25,56 F	37,78 E	50,00 D	63,33 C	87,78 B	100,00 A
5	0,00 D	0,00 D	10,00 C	66,67 B	91,11 A	65,56 B	100,00 A	100,00 A	100,00 A
7	0,00 E	12,22 D	38,89 C	78,89 B	100,00 A	72,22 B	100,00 A	100,00 A	100,00 A
14	0,00 D	25,56 C	72,22 B	100,00 A	100,00 A	73,33 B	100,00 A	100,00 A	100,00 A
21	0,00 E	40,00 D	85,56 B	100,00 A	100,00 A	73,33 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
28	3,33 D	47,13 C	90,80 A	100,00 A	100,00 A	72,41 B	100,00 A	100,00 A	100,00 A
D CO 32									
1	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	22,22 D	40,00 C	63,33 B	85,56 A
3	0,00 F	0,00 F	0,00 F	22,22 E	36,67 D	40,00 D	60,00 C	90,00 B	100,00 A
5	0,00 D	0,00 D	7,78 D	63,33 C	86,67 B	56,67 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
7	0,00 F	11,11 E	36,67 D	76,67 B	100,00 A	62,22 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
14	0,00 E	25,56 D	88,89 B	100,00 A	100,00 A	64,44 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
21	0,00 E	44,44 D	91,11 B	100,00 A	100,00 A	64,44 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
28	2,22 D	53,41 C	92,04 A	100,00 A	100,00 A	63,33 B	100,00 A	100,00 A	100,00 A

As médias seguidas pela mesma letra nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 3 – Mortalidade acumulada de adultos de *Sitophilus zeamais* (%) nos híbridos de milho, D 170, D 8420 e D CE 03, submetidos a nove tratamentos: testemunha (T1), terra de diatomácea nas dosagens de 125 g/t (T2), 250 g/t (T3), 500 g/t (T4) e 1000 g/t (T5) e deltametrina nas dosagens de 0,125 g i.a./t (T6), 0,25 g i.a./t (T7), 0,5 g i.a./t (T8) e 1,0 g i.a./t (T9), ao longo de 28 dias, a 27±1°C, 75±5% de UR e 12 horas de fotofase.

Dias	Tratamentos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
D 170									
1	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	21,11 D	38,89 C	60,00 B	81,11 A
3	0,00 G	0,00 G	0,00 G	17,78 F	35,56 E	44,44 D	63,33 C	88,89 B	100,00 A
5	0,00 E	0,00 E	8,89 D	60,00 C	80,00 B	64,44 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
7	0,00 E	8,89 D	32,22 C	74,44 B	100,00 A	72,22 B	100,00 A	100,00 A	100,00 A
14	0,00 E	24,44 D	87,78 B	100,00 A	100,00 A	73,33 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
21	0,00 E	44,44 D	90,00 B	100,00 A	100,00 A	73,33 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
28	2,22 D	53,41 C	92,04 A	100,00 A	100,00 A	72,72 B	100,00 A	100,00 A	100,00 A
D 8420									
1	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	17,78 D	45,56 C	65,56 B	85,56 A
3	0,00 E	0,00 E	0,00 E	22,22 D	40,00 C	40,00 C	67,78 B	92,22 A	100,00 A
5	0,00 D	0,00 D	10,00 D	61,11 C	83,33 B	55,56 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
7	0,00 E	10,00 E	40,00 D	75,56 B	100,00 A	61,11 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
14	0,00 D	25,56 C	72,22 B	100,00 A	100,00 A	64,44 B	100,00 A	100,00 A	100,00 A
21	0,00 E	41,11 D	85,56 B	100,00 A	100,00 A	64,44 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
28	3,33 C	51,72 B	88,51 A	100,00 A	100,00 A	63,22 B	100,00 A	100,00 A	100,00 A
CE 03									
1	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	0,00 E	16,67 D	44,44 C	62,22 B	84,44 A
3	0,00 F	0,00 F	0,00 F	18,89 E	40,00 D	40,00 D	65,56 C	90,00 B	100,00 A
5	0,00 E	0,00 E	8,89 D	56,67 C	83,33 B	53,33 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
7	0,00 F	7,78 E	32,22 D	73,33 B	100,00 A	61,11 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
14	0,00 E	23,33 D	76,67 B	100,00 A	100,00 A	63,33 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
21	0,00 E	42,22 D	87,78 B	100,00 A	100,00 A	63,33 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A
28	2,22 E	48,86 D	88,64 B	100,00 A	100,00 A	62,50 C	100,00 A	100,00 A	100,00 A

As médias seguidas pela mesma letra nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

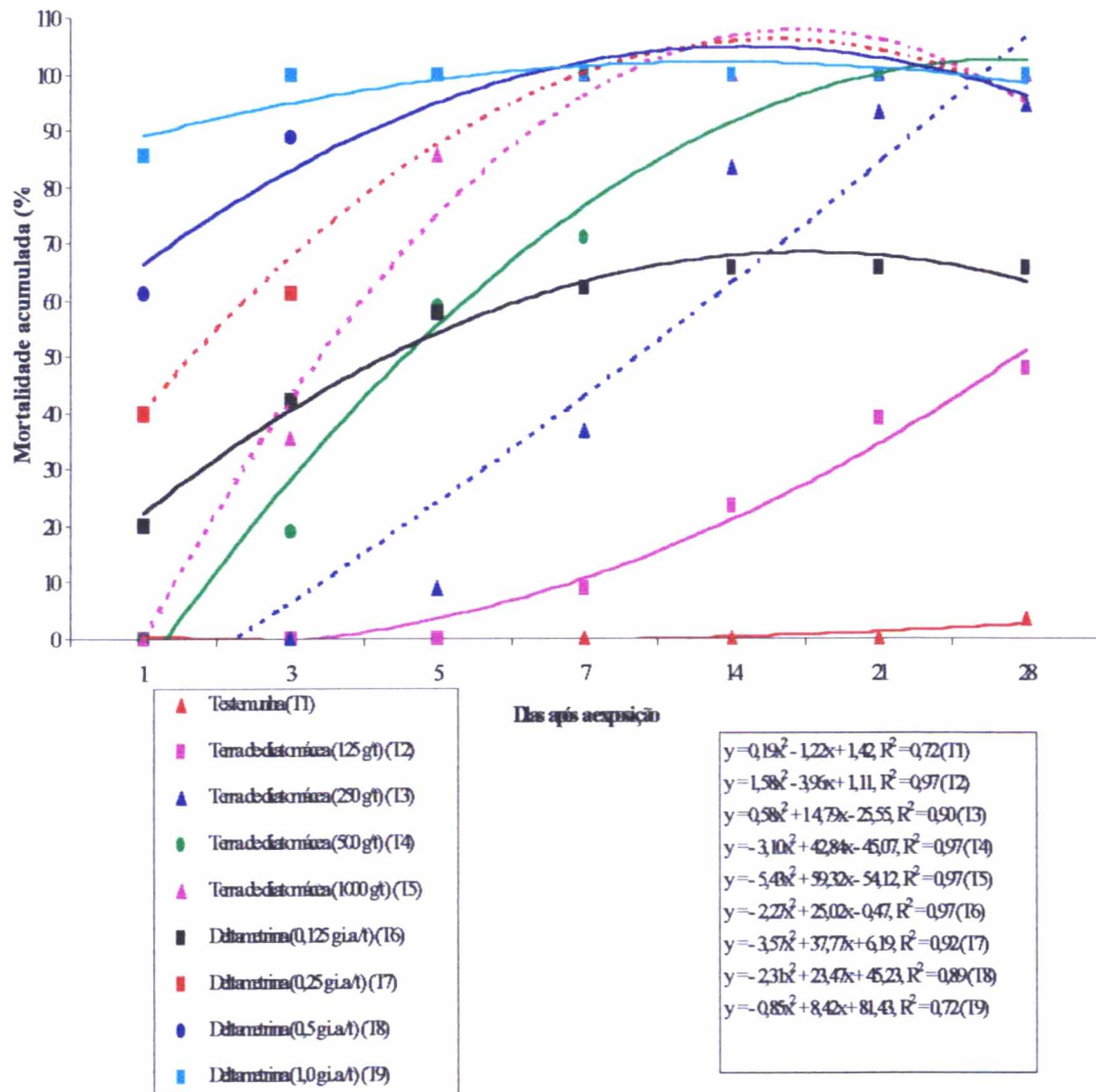


Figura 1 – Estimativa da mortalidade acumulada de *Sitophilus zeamais* (%) em função dos dias após a exposição dos grãos do híbrido D 766 a nove tratamentos, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de UR e 12 horas de fotofase.

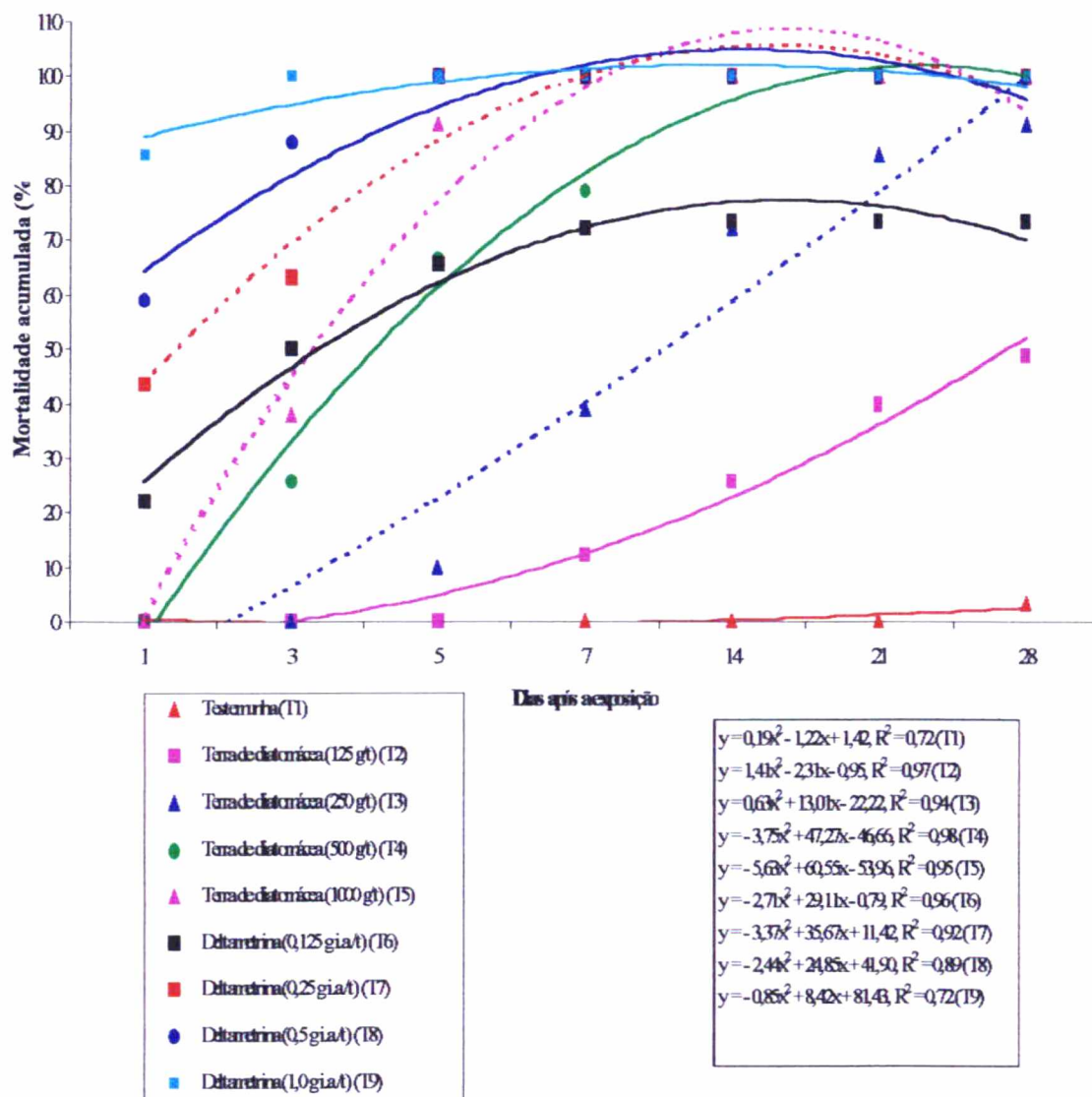


Figura 2 – Estimativa da mortalidade acumulada de *Sitophilus zeamais* (%) em função dos dias após a exposição dos grãos do híbrido D 8480 a nove tratamentos, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de UR e 12 horas de fotofase.

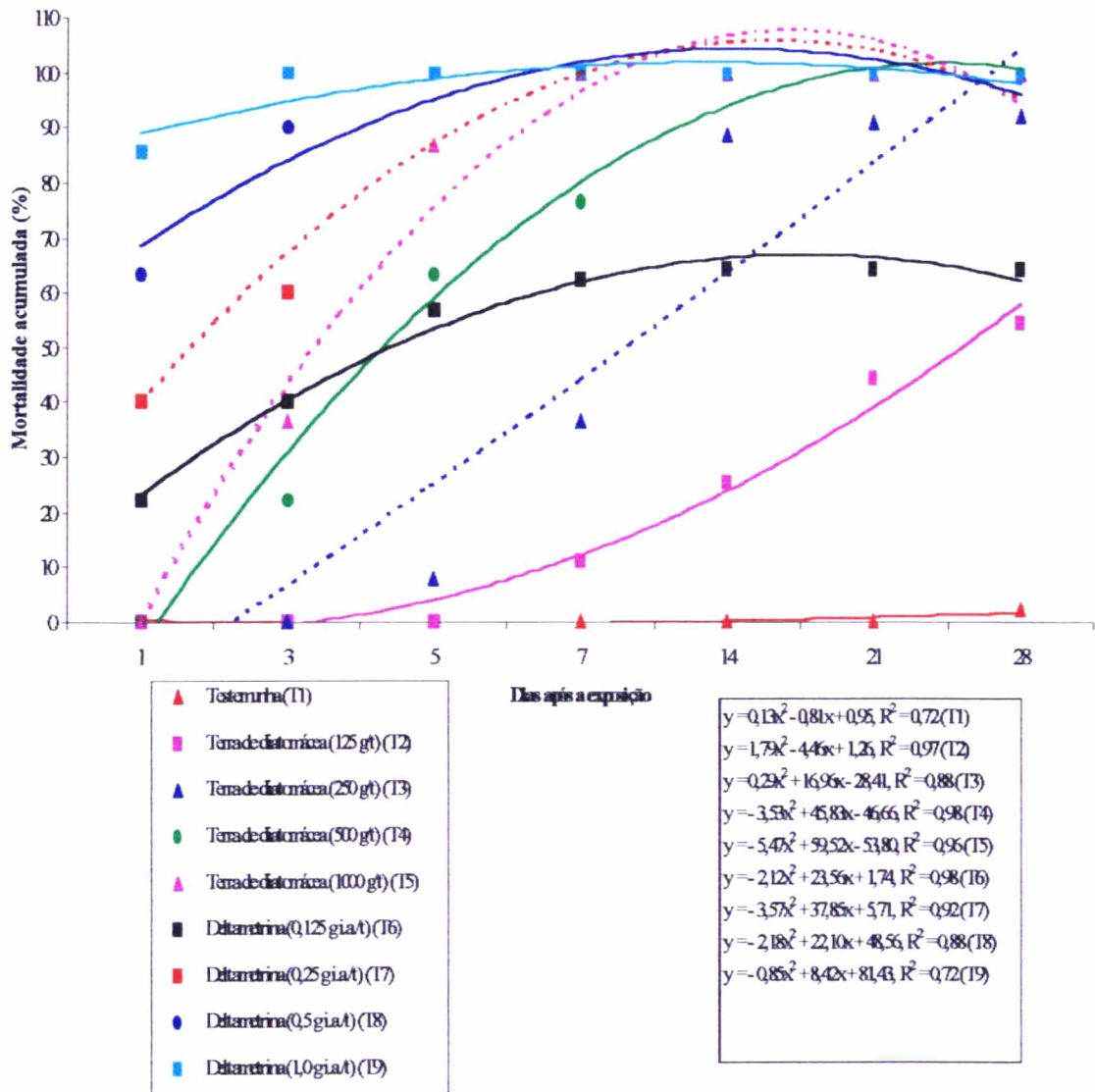


Figura 3 – Estimativa da mortalidade acumulada de *Sitophilus zeamais* (%) em função dos dias após a exposição dos grãos do híbrido D CO 32 a nove tratamentos, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de UR e 12 horas de fotofase.

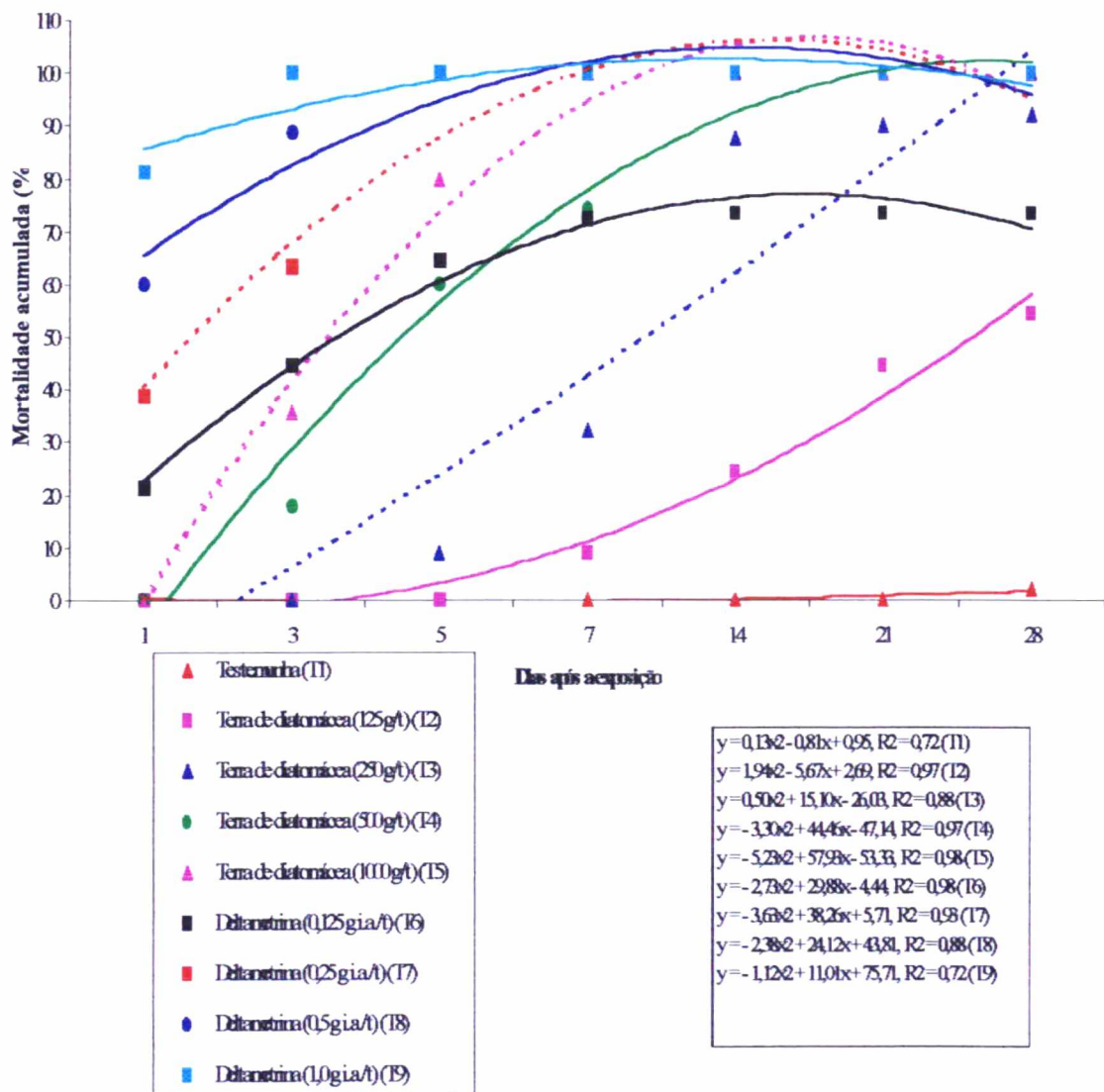


Figura 4 – Estimativa da mortalidade acumulada de *Sitophilus zeamais* (%) em função dos dias após a exposição dos grãos do híbrido D 170 a nove tratamentos, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de UR e 12 horas de fotofase.

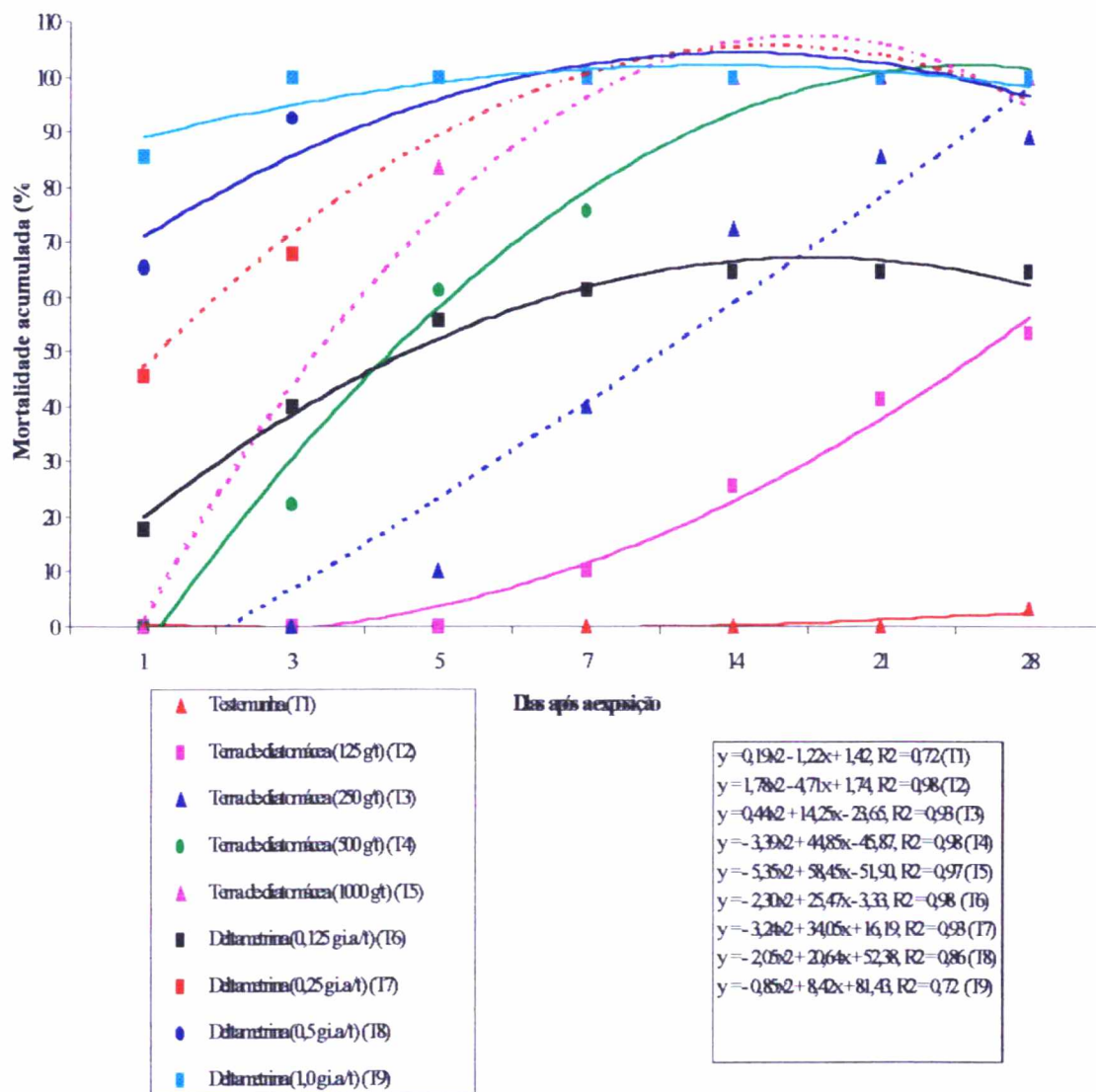


Figura 5 – Estimativa da mortalidade acumulada de *Sitophilus zeamais* (%) em função dos dias após a exposição dos grãos do híbrido D 8420 a nove tratamentos, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de UR e 12 horas de fotofase.

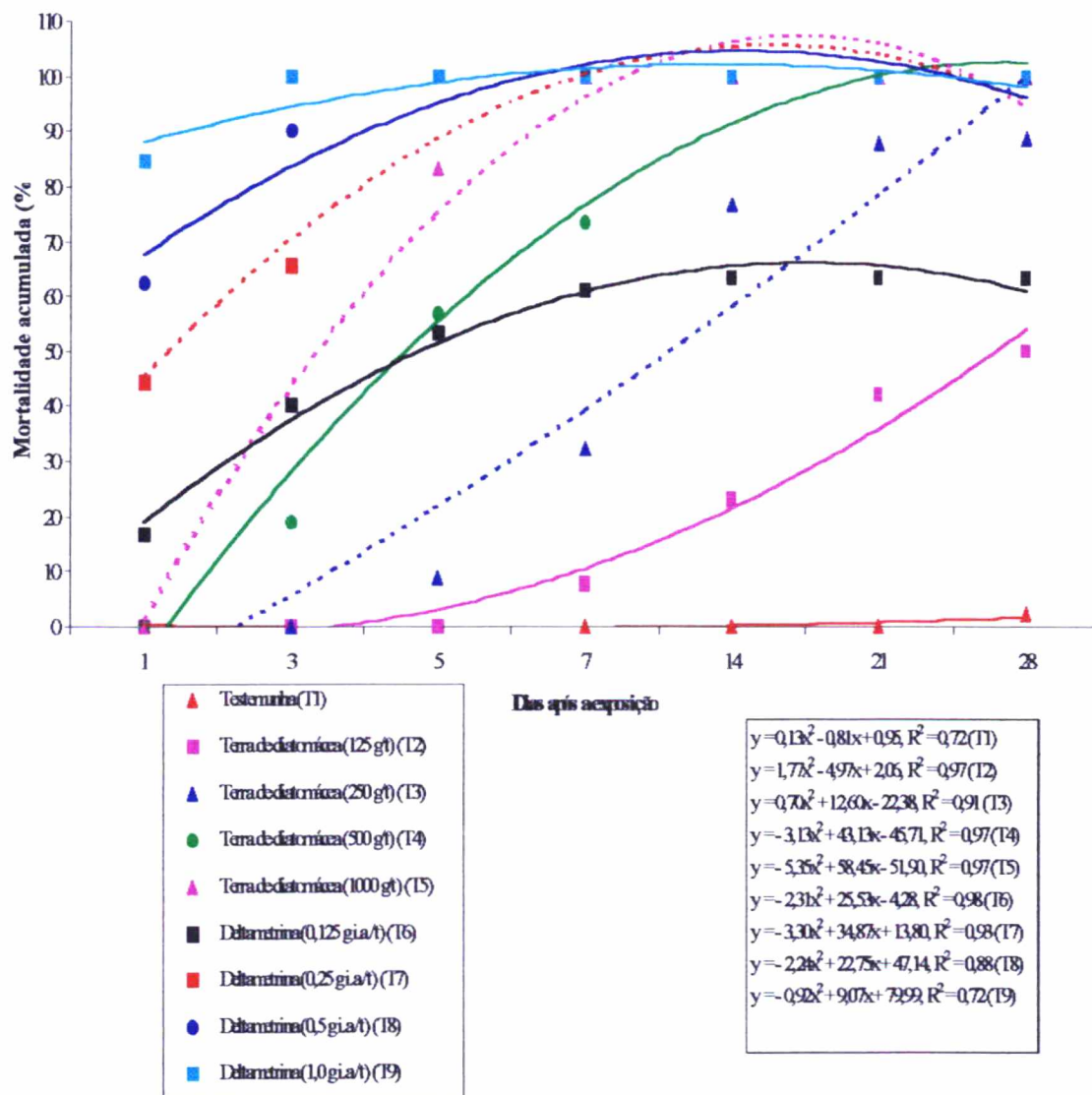


Figura 6 – Estimativa da mortalidade acumulada de *Sitophilus zeamais* (%) em função dos dias após a exposição dos grãos do híbrido D CE 03 a nove tratamentos, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de UR e 12 horas de fotofase.

A eficiência de 100% de controle da deltametrina ocorreu na dosagem recomendada pelo fabricante, 1,0 g i.a./t, aos três dias após a exposição, nas dosagens de 0,5 e 0,25 g i.a./t aos cinco dias e, não foi eficiente na dosagem de 0,125 g i.a./t, mesmo após 28 dias de exposição (Tabelas 2 e 3).

Os resultados encontrados nesta pesquisa assemelham-se aos encontrados por CERUTI (2003) que constatou 100% de mortalidade para *S. zeamais* submetido à aplicação de deltametrina nos grãos nas dosagens de 0,5 e 1,0 g i.a./t, após cinco dias de exposição, em laboratório.

A análise de resíduo de deltametrina indicou que, após o intervalo de segurança de 30 dias, nas condições do experimento, o nível de resíduo do i.a. era de 0,38 mg/kg, o qual ficou abaixo do Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido de 1,0 mg/kg (DOU, 2002).

Na segunda geração de insetos, foram registrados descendentes de *S. zeamais* em todas as dosagens de terra de diatomácea e na menor dosagem de deltametrina, em todos os híbridos estudados, porém, os valores foram sempre menores que a testemunha (Tabela 4).

MEWIS & REICHMUTH (1998) observaram resultados semelhantes quando *S. granarius* foi exposto a grãos de trigo tratados com terra de diatomácea. Os autores constataram que os adultos desta espécie morreram em poucos dias, mas esse tempo foi suficiente para que ocorresse a reprodução e um aumento populacional considerável após 42 dias do início do experimento.

A rápida mortalidade de pragas sob a ação de inseticidas de contato e ausência de descendentes quando se utilizam as dosagens recomendadas, também foram observadas por PAULA (2001). A autora submeteu *R. dominica* e *S. oryzae* a grãos de arroz tratados com pirimiphos-methyl na dosagem de 12 mL/t e verificou que além da elevada mortalidade, num período nunca superior a sete dias de exposição ao inseticida, não foi observada a presença de descendentes. Por outro lado, seus testes com as dosagens de terra de diatomácea, 500, 750 e 1000 g/t, não suprimiram a produção de descendentes dessas espécies. Este fato também foi constatado por CERUTI (2003), usando as mesmas dosagens para o controle de *S. zeamais*.

ARTHUR (1994) aplicou deltametrina nas dosagens de 0,5, 0,75 e 1,0 ppm, o que correspondem a 0,5, 0,75 e 1 g i.a./t, respectivamente, em grãos de milho e avaliou

a sobrevivência dos adultos e a progênie F1 de *S. zeamais*, durante 10 meses após a aplicação do inseticida e constatou um aumento na mortalidade, à medida que se aumentou a dosagem, e um aumento da sobrevivência, à medida que o tempo aumentava, porém, esse último efeito foi mais significativo na menor dosagem. Além disso, constatou que a sobrevivência foi positivamente correlacionada com a progênie F1, ou seja, à medida que a sobrevivência aumentava também aumentava o número de descendentes gerados. Essa tendência também foi verificada nesta pesquisa. Analisando as tabelas 2 e 3, deduz-se que a sobrevivência aumentou do tratamento 5 (terra de diatomácea 1000 g/t) para o tratamento 1 (testemunha) e que também nessa mesma ordem aumentou o número de descendentes (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de descendentes de *Sitophilus zeamais* nos híbridos de milho, D 666, D 8480, D CO 32, D 170, D 8420 e D CE 03, submetidos a nove tratamentos: testemunha (T1), terra de diatomácea nas dosagens de 125 g/t (T2), 250 g/t (T3), 500 g/t (T4) e 1000 g/t (T5) e deltametrina nas dosagens de 0,125 g i.a./t (T6), 0,25 g i.a./t (T7), 0,5 g i.a./t (T8) e 1,0 g i.a./t (T9), em 56 dias, a 27±1°C, 75±5% de UR e 12 horas de fotofase.

Híbridos	Tratamentos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
D 766	200,0 Ab	107,3 Bb	56,0 Cb	21,6 DEab	11,3 DEa	33,3 CDb	0,0 Ea	0,0 Ea	0,0 Ea
D 8480	145,3 Ac	47,6 Bc	13,6 Cd	2,6 Cb	2,0 Ca	15,0Cbc	0,0 Ca	0,0 Ca	0,0Ca
D CO 32	203,6 Ab	112,3 Bb	57,6 Cb	22,3 DEab	10,0 Ea	36,0 CDb	0,0 Ea	0,0 Ea	0,0 Ea
D 170	204,6 Ab	111,3 Bb	36,6 Cbc	16,3 CDab	12,3 Da	4,3 Dc	0,0 Da	0,0 Da	0,0 Da
D 8420	151,3 Ac	55,3 Bc	25,3 Ccd	5,6 CDb	1,3 Da	3,6 CDc	0,0 Da	0,0 Da	0,0 Da
D CE 03	236,3 Aa	152,6 Ba	79,6 Ca	27,3 Da	14,3 DEa	67,0 Ca	0,0 Ea	0,0 Ea	0,0 Ea

As médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

O híbrido com o maior número de descendentes na testemunha, D CE 03, também o foi nas dosagens de terra de diatomácea, 125 e 250 g/t, e na dosagem de deltametrina 0,125 g i.a./t (Tabela 4). Esses resultados indicam que esse híbrido é o mais suscetível em relação aos demais. Por outro lado, os híbridos com os menores números de descendentes na testemunha, D 8420 e D 8480, também o foram nas dosagens de terra de diatomácea 125 e 250 g/t, e na menor dosagem de deltametrina, 0,125 g i.a./t (Tabela 4). Esses resultados indicam que esses híbridos são os mais resistentes quando comparados com os demais.

A suscetibilidade do híbrido D CE 03 e a resistência dos híbridos D 8420 e D 8480, manifestadas na testemunha e na combinação com as baixas dosagens de terra de diatomácea e de deltametrina, indicam um efeito aditivo para a associação dos híbridos com os protetores de grãos.

Resultados semelhantes foram obtidos por MAZZONETTO (2002), em estudos sobre a preferência para a oviposição e a biologia de *A. obtectus* e *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae), submetidos a genótipos de feijão associados a pós vegetais. O autor constatou que os efeitos dos referidos tratamentos, de modo geral, foram mantidos em relação à situação em que as duas técnicas foram empregadas isoladamente. Finaliza o estudo, concluindo que para ambas as espécies o efeito constatado foi aditivo.

GIUSTOLIN *et al.* (2001) estudaram o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) criada em genótipos de tomateiro associados a *Bacillus thuringiensis*. Os autores verificaram maior duração, em dias, e menor sobrevivência larval, em porcentagem, para as larvas de 1º e 2º instar que haviam sido alimentadas com o genótipo resistente, quando comparado com o suscetível, independente do tratamento com o *B. thuringiensis*. O entomopatógeno também prolongou a fase larval e reduziu a sobrevivência, independente do genótipo em que o inseto foi criado. Os autores concluem que na associação dos genótipos com a bactéria o efeito observado também foi aditivo.

Observando a tabela 4, verifica-se que nos tratamentos com as maiores dosagens dos inseticidas, T5 (1000 g/t, terra de diatomácea) e T9 (1,0 g i.a./t, deltametrina), não foi detectada diferença significativa entre os híbridos, ou seja, quando insetos suscetíveis são expostos a dosagens recomendadas, o efeito do inseticida é tão rápido que não permite a manifestação da resistência dos híbridos. Por outro lado, nessa mesma tabela, observa-se que os híbridos resistentes, D 8480 e D 8420, associados a baixas dosagens de terra de diatomácea, T2 e T3, e de deltametrina, T6, apresentaram as menores médias de descendentes quando comparados com os demais híbridos. Esses resultados evidenciam que híbridos resistentes, mesmo associados a baixas dosagens de inseticidas podem, pelo menos em parte, contribuir para a redução do crescimento populacional.

4. CONCLUSÕES

Com base nas análises efetuadas e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- o inseticida deltametrina apresenta eficiência de 100% de controle de *S. zeamais* mais rápida que a terra de diatomácea, sendo que com 1,0 g i.a./t este nível é atingido até o terceiro dia e nas dosagens de 0,25 e 0,5 g i.a./t, aos cinco dias;
- as dosagens de terra de diatomácea, 1000 e 500 g/t, são eficientes no controle de *S. zeamais*, sendo a primeira após sete dias de exposição e a segunda aos 14 dias;
- baixas dosagens de deltametrina, 0,125 g i.a./t, e de terra de diatomácea, 125 e 250 g/t, não são eficientes no controle de *S. zeamais*, mesmo após 28 dias de exposição;
- com exceção das dosagens de deltametrina, 0,25, 0,5 e 1,0 g i.a./t, todos os demais tratamentos possibilitaram a produção de descendentes do inseto após 56 dias;
- os híbridos mais resistentes, D 8480 e D 8420, associados a baixas dosagens de deltametrina e terra de diatomácea, apresentam menor número de descendentes quando comparados com os demais híbridos, indicando que nessa associação o efeito é aditivo.

* Os produtos químicos comerciais e as dosagens utilizadas nesta pesquisa não refletem em recomendação do autor, sendo, portanto, parte integrante da metodologia utilizada para obtenção dos resultados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ. Entomol.**, v.18, p.265-267, 1925.

ALDRYHIM, Y.N. Efficacy of the amorphous silica dust, dryacide, against *Tribolium confusum* Duv. and *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae e Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.26, n.4, p.207-210, 1990.

ARNASON, J.T., BAUM, B., GALE, J., LAMBERT, J.D.H., BERGVINSON, D., PHILOGENE, B.J.R., SERRATOS, J.A., MIHM, J., JEWELL, D.C. Variation in resistance of Mexican landraces of maize to maize weevil *Sitophilus zeamais*, in relation to taxonomic and biochemical parameters. **Euphytica**, v.74, p.227-236, 1994.

ARTHUR, F.H. Efficacy of unsynergised deltamethrin and deltamethrin + chlorpyrifos-methyl combinations as protectants as stored wheat and stored corn (Maize). **Journal of Stored Products Research**, v.30, p.87-94, 1994.

ARTHUR, F.H. Immediate and delayed mortality of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) exposed on wheat treated with diatomaceous earth: effects of temperature, relative humidity, and exposure interval. **Journal of Stored Products Research**, v.37, p.13-21, 2001.

BANKS, H.J., FIELDS, P.G. Physical methods for insect control in stored-grain ecosystems. In: JAYAS, D.S., WHITE, N.D.G., MUIR, W.E. **Stored-grain ecosystems**. New York: Marcell Dekker, 1995. p.353-409.

BENTO, J.M.S. Perdas por insetos na agricultura. **Revista Ação Ambiental**, n.4, p-19-21, 1999.

BOIÇA JÚNIOR, A.L., LARA, F.M., GUIDI, F.P. Resistência de genótipos de milho ao ataque de *Sitophilus zeamais* (Mots.) (Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.3, 1997.

BRASIL. Leis, Decretos etc. Portaria nº1, de 4 de abril de 1986, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos do Ministério da Saúde. **Diário Oficial**, Brasília, 8 de abril de 1986, Seção 1, p.5039, revisão da Resolução nº 12/78 – CNNPA, 1986.

CALIFORNIA, DEPARTMENT OF FOOD AND AGRICULTURE. **Multi-residue pesticide screens**, 3 ed., California, 1987.

CANEPPELE, C., CANEPPELE, M.A.B., LAZZARI, S.M.N. Resistência de híbridos de milho, *Zea mays* (L.) ao ataque de *Sitophilus zeamais* (Mots.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.28, n.1, 2003.

CERUTI, F.C. **Técnicas de monitoramento e de controle de insetos em milho armazenado**. Dissertação de Mestrado em Entomologia, UFPR, Curitiba, 95p, 2003.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra 2002/2003, 6º Levantamento, agosto de 2003.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 05 de dezembro de 2003.

COOK, D.A., ARMITAGE, D.M. Laboratory bioassay and dose variation of diatomaceous earth surface treatments. In: CREDLAND, P.F., ARMITAGE, D.M., BELL, C.H., COGAN, P.M., HIGHLEY, E. (Eds.). **Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection.** York, 2002, p.671-674.

DOU, **Diário Oficial da União**, seção 1, n. 252, p.107, 31 de dezembro de 2002.

FALEIRO, F.G., PICANÇO, M., MIRANDA, M.M.M., ARAÚJO, J.M., SARAIVA, L.S. Resistência de 49 populações de milho a *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.20, p.17-21, 1995.

FAO. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pest to pesticides. Method for adults of some major pests of stored cereals with malathion or lindane. FAO Method 15. **FAO Plant Protection**, v.22, p.127-137, 1974.

FARONI, L.R.A. Manejo das pragas de grãos armazenados e sua influência na qualidade do produto final. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.76, p.36-43, 1992.

GIUSTOLIN, T.A., VENDRAMIM, J.D., ALVES, S.B., VIEIRA, S.A. Efeito associado de genótipo de tomateiro resistente e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* Meyrick (Lep., Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.3, p.461-465, 2001.

GÓMEZ, H.S., SANTOS, J.P., LIMA, J.O.G. Resistencia de genotipos de maíz con diferentes características físicas y químicas al ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v.20, n.1, p.37-42, 1994.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações.** Curitiba: Paranaset, 1997. 148p.

LORINI, I. Avaliação do pó inerte à base de terra de diatomáceas no controle de *Sitophilus* spp. em trigo armazenado, em laboratório. In: CONFERÊNCIA BRASILEIRA DE PÓS-COLHEITA, 1., 1999, Porto Alegre. **Anais...** Passo Fundo: Abrapós/Cesa/Embrapa Trigo, 1999. p.128-132.

LORINI, I. **Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 80p.

MAZZONETTO, F. Efeito de genótipos de feijoeiro e de pós de origem vegetal sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) e *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Col.: Bruchidae). Tese de Doutorado em Entomologia, ESALQ/USP, Piracicaba, 134p, 2002.

MEWIS, I., REICHMUTH, C. Diatomaceous earths against the coleoptera granary weevil *Sitophilus granarius* (Curculionidae), the confused flour beetle *Tribolium confusum* (Tenebrionidae), the mealworm *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae). In: ZUXUN, J., QUAN, L., YONGSHENG, L., XIANCHANG, T., LIANGHUA, G. (Eds.). **Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-product Protection**. Beijing, v.1, 1998, p.765-780.

PAULA, M.C.Z. **Manutenção da qualidade do arroz armazenado: monitoramento e controle de insetos**. Tese de Doutorado em Entomologia, UFPR, Curitiba, 74p, 2001.

PINTO JÚNIOR, A.R. **Uso de pós inertes no controle de insetos de grãos armazenados**. Dissertação de Mestrado em Entomologia, UFPR, Curitiba, 80p, 1994.

SERRATOS, A., ARNASON, J.T., NOZZOLILLO, C., LAMBERT, J.D.H., PHILOGÈNE, B.J.R., FULCHER, G., DAVIDSON, K., PEACOCK, L., ATKINSON, J., MORAND, P. Factors contributing to resistance of exotic maize populations to maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Chemical Ecology**, v.13, n.4, 1987.

SUBRAMANYAM, B., SWANSON, C.L., MADAMANCHI, N., NORWOOD, S. Effectiveness of Insecto®, a new diatomaceous earth formulation, in suppressing several stored-grain insect species. In: HIGHLEY, E., WRIGHT, E.J., BANKS, H.J., CHAMP, B.R. (Eds.). **Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection**. Canberra, v.2, 1994, p.650-659.

SUBRAMANYAM, B., MADAMANCHI, N., NORWOOD, S. Effectiveness of Insecto applied to shelled maize against stored-product insect larvae. **J. Econ. Entomol.**, v.91, p.280-286, 1998.

SUBRAMANYAM, B., ROELSI, R. Inert dusts. In: SUBRAMANYAM, B., HAGSTRUM, D.W. (Eds.). **Alternatives to pesticides in stored-product IPM**. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.321-380.

TOSCANO, L.C., BOIÇA JÚNIOR, A.L., LARA, F.M., WAQUIL, J.M. Resistência e mecanismos envolvidos em genótipos de milho em relação ao ataque de *Sitophilus zeamais* (Mots.) (Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, n.1, 1999.

WAQUIM, J.S. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 1992. 365p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nesta pesquisa, constatou-se que os diferentes sistemas de adubação afetam a produção dos cultivares e a composição nutricional dos grãos de milho, mas isso, todavia, não influencia na resistência dos grãos ao ataque do gorgulho-do-milho, *S. zeamais*.

Apesar de não se ter constatado relação entre a composição nutricional dos grãos e a resistência a *S. zeamais*, a avaliação de cultivares com base genética mais distinta das que foram utilizadas no presente estudo, produzidos em solos com níveis crescentes de minerais, pode fornecer mais informações sobre a influência da nutrição de plantas sobre a resistência do grão ao ataque de insetos, particularmente depois da maturação fisiológica e no armazenamento.

Os extratos de grãos de milho contendo inibidores de amilase, conforme demonstrado nesta pesquisa, mostraram um efeito significativo na resistência dos híbridos ao ataque de *S. zeamais*, porém, a utilização de proteínas puras poderia apresentar resultados ainda mais relevantes e, nesse sentido, futuros trabalhos poderiam purificar, caracterizar e correlacionar as proteínas inibidoras de amilase com a resistência de híbridos de milho.

No milho, já foram caracterizadas quatro proteínas que inibem amilases de importantes pragas de grãos armazenados, incluindo *S. zeamais*. A engenharia genética poderá, num futuro próximo, desenvolver plantas que expressem essas proteínas em níveis tão altos que poderão contribuir, significativamente, para a redução dos danos provocados pelas pragas de grãos armazenados e, conseqüentemente, para a redução do uso dos inseticidas, o que já ocorre com o milho transgênico que expressa toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis*, o milho Bt.

Apesar das baixas dosagens dos produtos inseticidas usados nesta pesquisa, terra de diatomácea e deltametrina, mostrarem eficiência de controle iguais às dosagens recomendadas pelos fabricantes, reduções da dosagem não justificam o risco da seleção de populações resistentes a esses produtos, visto que o maior período de exposição requerido para que as dosagens baixas atinjam 100% de eficiência de controle, é uma condição favorável para essa seleção.

Freqüentemente, os insetos são expostos a baixas dosagens de inseticidas provocados, principalmente, por falhas nos equipamentos de aplicação e humanas,

então, a utilização de híbridos resistentes a insetos pode ser uma tática complementar de controle promissora. Essa tática não onera os custos de produção, não causa problemas ambientais, é compatível com outras táticas de controle e pode, pelo menos em parte, contribuir na redução do crescimento populacional, quando os insetos são expostos a baixas dosagens de inseticidas.

Portanto, a utilização de genótipos resistentes de milho dentro de um programa de Manejo Integrado de Pragas de grãos armazenados representa uma estratégia muito promissora, que deve ser incentivada e recomendada aos melhoristas e profissionais responsáveis pelo controle das pragas de grãos armazenados.