



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS - GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PÓS - GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/PRODUÇÃO
VEGETAL**

CARLOS AYDANO VIRGINIO FRAZÃO

**AVALIAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHO EM RELAÇÃO AO ATAQUE
DE *Sitophilus zeamais* MOTSCHULSKY 1885 (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE).**

**TERESINA – PIAUÍ
2016**

CARLOS AYDANO VIRGINIO FRAZÃO
Engenheiro Agrônomo

AVALIAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHO EM RELAÇÃO AO ATAQUE DE
***Sitophilus zeamais* MOTSCHULSKY 1885 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva

Co-orientadora: Dra. Solange Maria França

TERESINA – PIAUÍ
2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

F848a

Frazão, Carlos Aydano Virginio.

Avaliação de cultivares de milho em relação ao ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidae) / Carlos Aydano Virginio Frazão - 2016.
39 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agrônoma) -
Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva

1. Inibidor de tripsina 2. Lectina 3 Resistência genética I. Título.

CDD 547.758

**AVALIAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHO EM RELAÇÃO AO ATAQUEE
DE *Sitophilus zeamais* MOTSCH. (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE).**

CARLOS AYDANO VIRGINIO FRAZÃO

Engenheiro Agrônomo

Aprovado em 29 / 02 / 2016

Comissão Julgadora:

Paulo Roberto Ramalho Silva
Prof. Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva - Presidente
CCA/UFPI

Lúcia da Silva Fontes
Profa. Dra. Lúcia da Silva Fontes – Membro Interno
CCN/UFPI

Solange Maria de França
Profa. Dra. Solange Maria de França – Membro Externo
UFRPE/UFPI

Tadeu Barbosa Martins Silva
Prof. Dr. Tadeu Barbosa Martins Silva – Membro Externo
UESPI

A Deus, pela força e sabedoria.

A minha avó e tio, Antonia

Virginia Frazão e Artur Augusto

Frazão Neto (*in memoriam*) pelo

carinho e afeto a mim

consagrados.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente á Deus, por mais essa vitória na minha vida.

A meu orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto Ramalho, que me orientou e sempre me apoiou no que fiz, agradeço.

A minha coorientadora, Dra. Solange Maria França, pelo apoio e disponibilidade sempre que necessário, pelo carinho e pelo seu discernimento que sempre me motivou e tornou possível este sonho.

A minha família a minha mãe Gislene Virginia Frazão, as minhas tias e tios Neuza Lavinia Virginia Frazão, Maria dos Remedios Virginia Frazão, Maria do Amparo, Francisco Airton Virginio Frazão e José Leal, aos meus primos e primas Francisco Lucas Virginio Frazão, Artur Silvestre Virginio Frazão, Cicero Danilo Frazão Araújo, Debora Frazão Leal, Barbara Frazão Leal, Lorena Frazão Silva, Juliane Frazão. E a minha irmã e sobrinha Antonia Georgia e Peróla Lavinia.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA).

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos. À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Semi-árido), por conceder as cultivares estudadas.

Á Doutoranda Jayara Silva, pelo apoio e pelos momentos que passamos no laboratório de entomologia.

Aos mestrandos da minha turma Pedro Guimarães, Vicente Neto, Benicio, João Pedro Aquino, Monteiro, Enayra, Vanusa Suelma, Samia Natácia, Janaina Mendes, Maristela, Bruno, Johnston, Artur, Valdecir, Antonio Gomes Neto, Glenda Silveira, Samara, por sempre estarem presentes quando preciso e por serem prestativos, e pela amizade e aqui deixo claro a minha gratidão.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número médio (\pm EP) de <i>Sitophilus zeamais</i> emergidos, duração da fase imatura, índice de suscetibilidade e Proteínas em <i>S. zeamais</i> , obtidos em cultivares de milho, em teste sem chance de escolha.....	21
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perda de peso de diferentes cultivares de milho submetidos ao ataque de *Sitophilus zeamais*. Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....22
- Figura 2.** Preferência de adultos de *S. zeamais* (n = 435) por cultivares comerciais de sementes de milho. Significância (P) através do teste de χ^2 a 5% de probabilidade..... 23
- Figura 3.** Atividades hemaglutinante e inibidora de tripsina de diferentes cultivares de milho.....24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Cultura do milho	12
2.2. Características Gerais de <i>S. zeamais</i> Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae)	13
2.3. Métodos de controle de <i>S. zeamais</i>	14
2.4. Resistência do milho a <i>S. zeamais</i>	15
2.5. Atividade de proteínas inseticidas (lectina e inibidor de tripsina).	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÕES	28
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	29

AVALIAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHO EM RELAÇÃO AO ATAQUE DE *Sitophilus zeamais* MOTSCHULSKY 1885 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE).

RESUMO - O *Sitophilus zeamais* é a principal praga do milho armazenado no Brasil, causando perdas significativas tanto em sementes quanto em grãos. Deste modo, objetivou selecionar cultivares de milho resistente a *S. zeamais* e avaliar a atividade de lectina e inibidor de tripsina presentes nestas cultivares. Foram avaliadas 5 cultivares de milho, através de testes com e sem chance de escolha. As cultivares utilizadas foram BRS Caatingueiro, BRS Gorutuba, BRS Sertanejo e BRS Asa branca e BR 106. Adultos de *S. zeamais* foram expostos aos grãos de milhos através de testes “com chance de escolha”, avaliando a atração das cultivares a esses insetos. No teste “sem chance de escolha” adultos de *S. zeamais* ficaram confinados durante 10 dias. Foram avaliados o número de insetos emergidos, a duração da fase imatura, a quantificação de proteína no inseto e a perda de massa seca dos grãos, bem como foi determinado o índice de suscetibilidade (IS) das cultivares. Atividade hemaglutinante de lectina e inibidora de tripsina foram analisadas nas cinco cultivares. Não houve diferença estatística quanto a duração da fase imatura de *S. zeamais*, nas cultivares estudadas, variando entre 54,65 (BRS Caatingueiro) e 58,79 (BRS Gorutuba) dias. No entanto, houve diferença quanto a presença de proteínas em adultos de *S. zeamais*. Os adultos que se alimentaram de BRS Caatingueiro teve a maior quantidade de proteína total, os insetos que se alimentaram das cultivares BR 106 e BRS Asa Branca as menores quantidades de proteínas. Houve diferença estatística entre as cultivares para o número de adultos emergidos de *S. zeamais*, sendo maior na BRS Caatingueiro e menor na BR 106, bem como a BR106 apresentou uma perda de massa menor que as demais, seguida de BRS Caatingueiro, BRS gorutuba, BRS Asa Branca e BRS Sertanejo com as maiores perdas de massa, respectivamente. A atividade de lectina foi maior nas cultivares BR 106, BRS Asa Branca, BRS sertanejo e BRS Gorutuba correspondendo a 4,86; 2,59; 1,84 e 1,29 (U/mg), respectivamente. Na cultivar BRS Caatingueiro não houve atividade da lectina. As cultivares BRS Sertanejo, BRS Asa branca, BR 106 e BRS Gorutuba reduziram totalmente a atividade de tripsina, mostrando extremamente eficiente, eliminando a atividade desta proteína. A BRS caatingueiro apresentou atividade inibidora de cerca de 40,3%. Desta forma, podemos afirmar que a presença das lectinas e de inibidores de tripsina influenciaram na resistência das cultivares de milho ao ataque de *S. zeamais*.

PAVRAS-CHAVE: Inibidor de tripsina. Lectina. Resistência genética.

CULTIVARS EVALUATION OF CORN IN RELATION TO THE *Sitophilus zeamais* MOTSCHULSKY 1885 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE).

ABSTRACT – *Sitophilus zeamais* is the major pest of stored maize in Brazil, causing significant losses in both seeds and grains. Thus, it was aimed to select corn cultivars resistant to *S. zeamais* and evaluate the activity of both the lectin and the trypsin inhibitor present in these cultivars. 5 maize cultivars were evaluated through tests with and without choice. The cultivars were BRS Caatingueiro, Gorutuba BRS, BRS Sertanejo, BRS Asa Branca and BR 106. Adults of *S. zeamais* were exposed to corn grains through choice tests, being evaluated the attractiveness of the cultivars to these insects. In the no-choice test, *S. zeamais* adults were confined for 10 days. It were evaluated the number of emerged insects, the length of the immature stage, the amount of protein in the insects and the grain dry weight loss, it was also determined the susceptibility index (SI) of the cultivars. Hemagglutinating activity of lectin and trypsin-inhibiting activity were analyzed in the five cultivars. There was no statistical difference in the length of the immature stage of *S. zeamais* in the studied cultivars, ranging between 54.65 (BRS Caatingueiro) and 58.79 (BRS Gorutuba) days. Notwithstanding, there was difference for the presence of proteins in adults of *S. zeamais*. Adults who fed on BRS Caatingueiro had the highest amount of total protein, the insects that fed on cultivars BR 106 and BRS Asa Branca had the smallest amounts of protein. There was statistical difference between cultivars for the number of emerged adults of *S. zeamais*, being higher in BRS Caatingueiro and lower in BR 106, and the BR106 showed less weight loss than the others, followed by BRS Caatingueiro, BRS Gorutuba, BRS Asa Branca and BRS Sertanejo, with the largest weight losses, respectively. The lectin activity was higher in the cultivars BR 106, BRS Asa Branca, BRS Sertanejo and BRS Gorutuba, corresponding to 4.86; 2.59; 1.84 and 1.29 (U/mg), respectively. In BRS Caatingueiro, there was no lectin activity. The cultivars BRS Sertanejo, BRS Asa Branca, BR 106 and BRS Gorutuba totally reduced the trypsin activity, showing to be extremely efficient, eliminating the activity of this protein. BRS Caatingueiro showed inhibitory activity of about 40.3%. Therefore, one can say that the presence of lectins and trypsin inhibitors had influence on the resistance of corn cultivars to the attack of *S. zeamais*.

KEYWORDS: Trypsin-inhibitor. Lectin. Genetic resistance.

1. INTRODUÇÃO

O *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1885 (Coleoptera, Curculionidae) é uma das principais pragas do milho no Brasil, causando danos de ordem econômica onde os grãos atacados perdem valor comercial e o mesmo ocorre com sementes pois reduzem o seu poder germinativo (SOUZA; SILVA; SANTOS, 2010). Características biológicas como a infestação cruzada e alto potencial biótico (FERRARI FILHO et al., 2011) tem dificultado o controle dessa praga nos armazéns.

A utilização de inseticidas químicos sintéticos é o método de controle de pragas de grãos armazenados mais empregado na atualidade, mas vem sendo apresentadas restrições de uso do mesmo, à medida que problemas de resistência das pragas à inseticidas surgem (LORINI, 2008). A resistência a inseticidas é um sério problema ao manejo de *S. zeamais* no Brasil e no mundo (PEREIRA et al., 2009; CORRÊA et al., 2011). Para minimização desses problemas, deve-se buscar o uso de outros métodos de controle alternativos aos químicos, como o uso de variedades resistentes às pragas. A procura por métodos de menor impacto ambiental e menos onerosos para o controle desta praga é imprescindível. Dentre eles, a busca por fontes de resistência, visando o melhoramento genético dos cultivares, tem sido objeto de várias pesquisas (MARSARO JÚNIOR et al., 2008; SIWALE et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2014).

A resistência é um dos diversos mecanismos de defesa da planta contra o ataque de pragas. Deste modo, vem crescendo o interesse em estudos que objetivam detectar proteínas como a arcelina, lectina e inibidores de proteases, que fazem parte desses mecanismos. Esses estudos servem de suporte para uma melhor seleção de cultivares resistentes (MARSARO JÚNIOR et al., 2005; RIBEIRO-COSTA et al., 2007; NAPOLEÃO et al., 2013). As proteínas são essenciais para a sobrevivência, crescimento e fecundidade dos insetos. A maioria dos insetos utilizam a tripsina para quebrar as proteínas, deste modo a tripsina fica difundida no trato digestivo dos insetos de diversas ordens e com vários hábitos alimentares. Os inibidores de tripsina são responsáveis por inibir as enzimas proteolíticas específicas e, conseqüentemente, reduzem a digestão proteica dos alimentos, acarretar reduções no ganho de peso e no crescimento dos insetos, podendo ainda atuar em diversos processos fisiológicos como na má formação de indivíduos e por conseqüência levando-os a morte. Deste modo, estratégia de controle de pragas que se baseiam nos inibidores de tripsina estão sendo pesquisadas (LAZAREVIC; JANKOVIC-TOMANIC, 2015). As lectinas também são

proteínas é podem ser encontradas em diversas partes das plantas, podendo ser isoladas de sementes, cascas, cladódio, flores, folhas, rizomas, raízes e sementes (PAIVA et al., 2012). Elas têm papel importante no sistema de defesa de plantas contra insetos praga. Diversos estudos estão sendo realizados para a constatação do mecanismo de ação das lectinas na busca de métodos eficazes no controle através do uso dessas proteínas que interagem com enzimas importantes na nutrição de insetos (NAPOLEÃO et al., 2011; NAPOLEÃO et al., 2013; WALSKI et al., 2014). Diante da importância do milho e da falta de informações sobre sua resistência a *S. zeamais*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de cultivares de milho à *S. zeamais*, bem como associar essa resistência a presença de lectinas e de inibidores de tripsina nos grãos de milho e sua influencia alimentar na absorção de proteínas neste inseto-praga.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta da família gramíneas, com origem na América Central, sendo cultivada em praticamente todas as regiões do mundo, em climas úmidos e regiões secas. Trata-se de um alimento rico em carboidratos, com alto teor energético; é também fonte de óleo, fibras, vitaminas e ácido pantotênico, além de alguns minerais, como o fósforo e o potássio (MATOS et al., 2006). O milho destaca-se por ser uma das mais importantes culturas, por apresentar uma grande área cultivada entre os principais grãos (CONAB, 2015). É utilizado como fonte energética na alimentação humana e animal, na indústria para a produção de amido, álcool, adoçantes, óleos e como fonte de biocombustíveis. A safra mundial de milho 2015/16, teve uma previsão de produção global estimada em 967,9 milhões de toneladas. Com os EUA com a maior produção mundial de 345,5 milhões de toneladas, seguido de China e Brasil com 224,6 e 81,5 respectivamente (USDA, 2015).

Altas temperaturas são necessárias para a cultura do milho ter um bom desenvolvimento desde a germinação até outras fases de crescimento, e em certos casos existe a exigência de dias curtos para o desenvolvimento da fase de reprodução com florescimento, proporcionando assim os seus rendimentos compensadores. Os nutrientes mais exigidos pelo milho são o nitrogênio (N) e o potássio (K), vindo em seguida o fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) de eficiência de nutrientes, principalmente do N, proporcionará redução na produtividade do milho, uma vez que este está diretamente ligado no metabolismo das plantas de milho. Assim, se torna de grande importância o aumento da sua disponibilidade e uso eficiente do nutriente para as plantas no sistema de produção agrícola (OLIVEIRA et al., 2009).

Em baixas temperaturas, há o alongamento do ciclo da cultura, enquanto que o ciclo tem uma redução com temperaturas elevadas. Temperaturas ideais para o crescimento do milho se encontram na faixa de 26 e 32°C. Com a temperatura do solo no limite inferior a 10°C ou superior a 40°C a germinação é influenciada negativamente, a faixa de 26 a 32°C, sendo a mais adequada para a germinação e emergência da cultura (FRANCELLI, 2001).

Após a colheita do milho o armazenamento é feito em granel ou em sacarias. Porém, quando armazenado sem os devidos cuidados, sofre grandes perdas causadas por alguns agentes biológicos como bactérias, ácaros, fungos e roedores são

importantes causadores de deterioração, mas os insetos são considerados as pragas principais. A perda da produção pode ocorrer antes, durante e após a colheita. As perdas após colheita ocorrem principalmente durante o armazenamento afetando o produto final pronto para comercialização (TAVARES; VENDRAMIM, 2005).

2.2. Características Gerais de *S. zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae)

O *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), conhecido como gorgulho-do-milho, é a principal praga do milho causando danos de natureza física e qualitativa na massa de grãos de milho armazenados (LORINI, 2003). O *S. zeamais* é uma praga primária, interna, que ocorre principalmente nas regiões tropicais e tem grande importância econômica, danificando, também, outros cereais, devido a abundância de alimento e outros fatores favoráveis para seu crescimento e desenvolvimento. Apresenta infestação cruzada, ou seja, tem a capacidade de infestar os grãos tanto no campo quanto nos armazéns. É uma praga polífaga, atacando trigo, arroz, milho, cevada, produtos beneficiados, como biscoito e macarrão e até mesmo fruteiras típicas de clima temperado, como uva, maçã e pêssigo (NORNBERG et al., 2013; LORINI, 2008). Causando perdas de qualidade nos grãos, como a perda de peso, perda de poder germinativo e conseqüentemente de valor comercial (ALMEIDA et al., 2005).

As perdas nos grãos de milho armazenados causadas por *S. zeamais* podem atingir até 30% em alguns casos, das quais 10% causadas diretamente pelo ataque de pragas durante o armazenamento (SCHOLLER et al., 1997). Quanto maior o período de contato dos insetos com os grãos maiores são os danos causados e os prejuízos para os produtores (ANTUNES et al., 2011).

Os adultos de *S. zeamais* apresentam coloração castanho escuro, com quatro manchas avermelhadas nos élitros (asas anteriores), medem aproximadamente 3 a 5 mm e apresentam a cabeça projetada a frente em forma de rostro sendo nos machos curto e grosso e nas fêmeas longo e afilado (GALLO et al., 2002; LOECK, 2002). O aparelho bucal é do tipo mastigador, pois a capacidade de perfurarem os grãos como arroz e milho se deve as suas mandíbulas fortes possibilitando a alimentação do conteúdo interno (SANTOS, 1993). O ciclo de vida de *S. zeamais* é de aproximadamente 34 dias na temperatura de 28 °C e umidade relativa de 60%

(ROSSETO, 1972). Tem um período médio de pré-oviposição de 6 dias, sendo o período de oviposição de 104 dias e o número médio de ovos de 280. Os ovos são depositados dentro dos grãos, através de um orifício feito pela mandíbula das fêmeas, onde cada uma coloca em média 3 ovos por dia, o período de desenvolvimento do mesmo oscila entre 3 e 6 dias, em média 26,90% dos ovos se desenvolvem até a emergência dos adultos. Na fase larval passam por quatro instares larvais. Elas se alimentam da parte interna do grão, dois a três dias após a saída dos grãos os insetos cruzam novamente, iniciando-se assim um novo ciclo. Já na fase adulta, as fêmeas podem viver até 140 dias, no entanto os machos têm uma longevidade em média 142 dias (SANTOS, 1993; GALLO et al., 2002).

2.3. Métodos de controle de *S. zeamais*

A importância econômica do controle de pragas de grãos armazenados é realçada com uma perda de mais de um bilhão de dólares por ano em todo o mundo. Os métodos utilizados no controle de pragas de grãos armazenados são divididos em: físicos (resfriamento artificial, umidade, temperatura, radiação, terra diatomácea, atmosfera controlada) e químicos (inseticidas preventivos e curativos). No Brasil os métodos utilizados no controle são geralmente feitos através de expurgo ou fumigação (fosfeto de alumínio e de magnésio) e uso de inseticidas protetores (piretroides e organofosforados) (LORINI, 1999; SANTOS et al., 2009; BOYER, ZHANG, LEMPÉRIERE, 2012).

O *S. zeamais* é normalmente controlado por inseticidas fumigantes (fosfeto de alumínio e de magnésio) e com residuais protetores (piretroides e organofosforados). Os inseticidas protetores são utilizados como principal método de controle preventivo, que tem o objetivo de controlar e proteger os armazéns dos ataques de pragas. Mas apesar de eficazes, podem causar intoxicações aos aplicadores, presença de resíduos tóxicos nos grãos e surgimento de populações de insetos resistentes a utilização de inseticidas sintéticos são de grande importância, pois é o principal método de controle da ocorrência de eventuais pragas na massa de sementes (LORINI, 2003).

Além do problema residual e de toxidez, o uso intensivo de inseticida tem sido apontado como o principal fator de resistência das populações do gorgulho do milho aos produtos químicos, o que acaba comprometendo o controle desta praga (RIBEIRO

et al., 2003). A busca por métodos menos agressivos e onerosos para o controle desta praga, o estudo de possíveis linhagens resistentes, visando o melhoramento genético dos cultivares, tem sido objeto de várias pesquisas, não apenas no Brasil (MARSARO JÚNIOR et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2014), como em outros países (SIWALE et al., 2009), buscando à detecção de proteínas como (arcelina, lectina e inibidores de proteases) que fazem parte dos mecanismos de defesa da planta para uma melhor seleção de cultivares resistentes em relação a essas características (SCHOEDER et al., 1995; MARSARO JÚNIOR et al., 2005).

2.4. Resistência do milho a *S. zeamais*

A cultura do milho apresenta uma alta variabilidade genética, característica importante para a criação de programa de pesquisa, visando selecionar através do melhoramento, cultivares resistentes a *S. zeamais* (WIDSTROM et al., 1992).

A utilização de plantas resistentes a insetos tem sido um método de controle eficiente contra *S. zeamais* e apresenta uma série de vantagens com relação ao uso de inseticidas químicos, dentre elas: não onera o custo de produção, não oferece risco a saúde humana e animal, reduz perdas quantitativas e qualitativas dos grãos e alguns estudos têm demonstrado a existência de genótipos de milho resistentes ao ataque de insetos praga durante o armazenamento (MAZZONETO; BOIÇA JÚNIOR, 1999; MARSARO JÚNIOR et al., 2005).

Os grãos não dispõem apenas da resistência física do pericarpo, mais também de compostos químicos nele presentes, compostos esses responsáveis por afetar o ciclo biológico do *S. zeamais*. Os caracteres associados aos tecidos de grãos são ácidos fenólicos encontrados no pericarpo e embrião, inibidores de proteinases são o endosperma e embrião, outro fator é a dureza do grão que ficam no pericarpo, endosperma e embrião (MORAIS, 2012).

Classen et al. (1990) verificaram que o teor de proteínas no grão de milho correlaciona-se negativamente com o número de ovos colocados pela fêmea de *S. zeamais* nos grãos. Arnason et al. (1993) constataram que o teor de lipídeos correlaciona-se negativamente com a suscetibilidade de genótipos de milho ao ataque de *S. zeamais*.

Estudos realizados por Rosseto (1972) e Santos; Foster (1981) relatam que o gorgulho do milho tem a capacidade de distinguir o grão susceptível e o resistente,

mesmo estando estes misturados, em teste de “livre escolha”. Segundo eles, este inseto pode ser usado para selecionar variedades resistentes, numa população de milho onde existe variabilidade genética.

2.5. Atividade de proteínas inseticidas (lectina e inibidor de tripsina).

As lectinas são glicoproteínas presentes em muitos seres vivos dos reinos vegetal e animais. Nas plantas tem sido detectada principalmente nos cotilédones e no endosperma das sementes, constituindo de 10 a 12% das proteínas totais (DIAZ et al., 1999). Essas proteínas formam ligações reversíveis com carboidratos, apresentando especificidade com diferentes carboidratos ligantes. Lectinas estão ligadas as atividades e mecanismos de defesa de plantas e animais. As lectinas, encontradas em plantas têm sido descritas como participantes da defesa contra insetos e outros agentes patógenos há esses vegetais (AGRA NETO, 2014).

Segundo Vendramim e Guzzo (2009) diversos autores afirmam que o mecanismo de ação tóxica da lectina contra insetos ainda não está completamente esclarecido, mas os parâmetros mais utilizados para medir seus efeitos (sobrevivência, consumo alimentar, período de desenvolvimento entre outros) em insetos alimentados experimentalmente com hospedeiros naturais, ou em dietas artificiais contendo lectinas, fornecem indícios de má alimentação.

As lectinas isoladas da entrecasca e do cerne da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*) foram agentes inseticidas contra operários e soldados de *Nasutitermes corniger* e larvas de *Aedes aegypti*, devido a resistência das lectinas ao ambiente proteolítico do intestino de *N. corniger*, *A. aegypti* e de *S. zeamais* (NAPOLEÃO et al., 2011a; NAPOLEÃO et al., 2011b) O extrato de folhas de *M. urundeuva* foi tóxico quando ingerido por adultos de *S. zeamais*. A toxicidade do extrato de folhas pode estar ligada a efeitos sobre a parede do lúmen intestinal, causando assim efeitos anti-nutricionais sobre *S. zeamais* (NAPOLEÃO et al., 2013).

Os insetos obtêm muitos dos aminoácidos essenciais utilizando proteinases extracelulares que atuam no lúmen do intestino dos mesmos. Muitas famílias de plantas possuem inibidores de proteinases encontradas em seus órgãos reprodutivos, órgãos de reserva e tecidos vegetativos. O mecanismo pelo qual os inibidores de proteinases interferem no processo digestivo dos insetos se deve à diminuição da

assimilação de nutrientes. O número de inibidores de proteinases de plantas identificados e isolados é grande, sendo os inibidores de proteinases serínicas e cisteínicas que são as principais enzimas digestivas encontradas nos insetos causadores de danos econômicos (FRANCO et al., 2002). Os inibidores proteases estão amplamente distribuídos no reino vegetal, pois, são proteínas capazes de inibir as atividades de tripsina, quimiotripsina, amilase, carboxipetidase, entre outras (GOMES, 2014).

Os inibidores de tripsina podem ser utilizados em métodos de controle de insetos e, sendo assim, a caracterização desses inibidores são de grande importância para que novas formas de controle de pragas sejam desenvolvidas. Os inibidores de tripsina atuam na digestão primária de proteínas e comprometem o processo digestivo por completo, reduzindo a disponibilidade de aminoácidos ao inseto, esses inibidores já foram observados em uma pequena diversidade de plantas como mamona, maracujá, gergelim, mamão, abacaxi, jurema branca, que foram utilizadas em testes em diversas ordens de insetos pragas como coleópteros, lepidópteros e dípteros (GOMES, 2014; OLIVEIRA, 2007; ROSSI et al., 2010).

Anthonomus grandis, *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*, assim como outros insetos pragas de outras ordens apresentaram uma deficiência em relação a absorção de nutrientes, após a utilização de materiais vegetais com a presença de inibidores de tripsina o pode acarretar um maior tempo necessário para o desenvolvimento de fases juvenis e um menor ganho de peso pelos adultos, sendo estes inibidores fortes candidatos para a criação de programas de melhoramento (CRUZ, 2008).

Uma classe muito conhecida de compostos secundários presentes em plantas são os inibidores de tripsina, uma serinoproteinase relacionada com a digestão de proteínas. Que tem função de Inibir as enzimas relacionadas com a digestão proteica e impedem que o organismo que os ingere tenha seu desenvolvimento adequado, interferindo no ciclo de vida da espécie em questão (ROSSI et al., 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Piauí (UFPI), com temperatura e umidade relativa, monitoradas e fotofase de 12 h. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco e Análise de proteína em *S. zeamais*. foi realizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os adultos de *S. zeamais* utilizados foram provenientes da criação pertencente ao laboratório de entomologia da Universidade Federal do Piauí, esses foram criados por várias gerações de grãos de milho pipoca.

Origem das cultivares. Utilizaram-se as cultivares BRS Caatingueiro, BRS Gortuba, BRS Sertanejo e BRS Asa branca adquirida junto à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Petrolina/PE, e a BR 106 adquirida de uma propriedade localizada em Timon/MA, sendo esta licenciada pela Embrapa Meio Norte.

Teste sem chance de escolha. Para cada cultivar foram utilizadas parcelas com 200 g de milho, infestado com 20 insetos adultos não sexados de *Sitophilus zeamais*, com idade de 10 a 20 dias, acondicionadas em recipiente plástico com capacidade para 500 mL fechados com tampas plásticas perfuradas, a fim de facilitar as trocas gasosas. Decorridos trinta (30) dias após a infestação (DAI) avaliou-se, diariamente, o número de adultos emergidos, cessando a contagem após cinco dias consecutivos sem emergência. A duração da fase imatura, foi calculada através da seguinte fórmula: $[\sum(\text{número diário de insetos emergidos} \times \text{número de dias após a emergência})/\text{total de insetos emergidos}]$ (LIMA et al., 2001). Também foi avaliada a perda de massa seca dos grãos, provocada pelos *S. zeamais* adultos e sua progênie. A perda de massa seca dos grãos foi observada a cada 15 dias após a infestação dos grãos por um período de 60 dias, a qual foi determinada pela diferença entre a massa seca inicial e a massa seca final (Adaptado de MARSARO JÚNIOR et al., 2006).

A resistência das cultivares de milho foi avaliada pelo índice de suscetibilidade (IS) (DOBIE, 1977 Apud MASSARO JÚNIOR et al., 2008), que relaciona o número de gorgulhos emergidos e o tempo médio de desenvolvimento, após infestação artificial de grãos por *S. zeamais*. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, contando de cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância

ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do SAS (SAS Institute, 2001).

Teste com chance de escolha. Os bioensaios foram conduzidos em arenas formadas por cinco recipientes plásticos com capacidade para 150 mL, contendo 10 g de cada cultivar, interligados a uma caixa plástica central por tubos plásticos. Na arena central foram liberados 50 adultos de *S. zeamais* com 0-20 dias de idade não sexados. Após 24 horas as interligações entre os compartimentos foram fechadas com algodão e foi contabilizado os números de insetos por cultivar. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constando de cinco cultivares, sendo cinco tratamentos e seis repetições. Com o número de insetos atraídos fez-se a análise de frequência de escolha, adotando-se o PROC FREQ do SAS (SAS Institute., 2001) e a interpretação, mediante o teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade.

Análise de proteína totais em *S. zeamais*. Adultos não sexados de *S. zeamais* foram alimentados com as cultivares, cv. BR 106, cv. BRS Caatingueiro, cv. BRS Gorutuba, cv. BRS Sertanejo e cv. BRS Asa branca, foram separados para a quantificação de proteínas. Para cada cultivar foram utilizadas 10 amostras e cada amostra constou de 5 insetos adultos, totalizando 50 insetos por tratamento. Esses insetos foram macerados com o auxílio de um cadinho e a estes foram adicionados 5mL do tampão, fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,1M). Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, foi retirado 1mL da mistura (inseto + tampão), colocado em um eppendorf devidamente etiquetado. Todo esse procedimento foi realizado em baixa temperatura objetivando evitar a oxidação da amostra. Essas amostras foram centrifugadas por 3 min. a 3.000rpm. Após a centrifugação foram retirados 100 µL de cada amostra e colocado em novos eppendorfs devidamente etiquetados. Essas amostras foram então transferidas para tubos de vidro graduado para centrifugação e a este foi adicionado o corante Bradford avolumando até 5mL. Os tubos foram colocados em um agitador para homogeneização das amostras e em seguida permaneceram em repouso por 2 min. (tempo necessário para as amostras interagirem com o corante). Em seguida foi feita a leitura das proteínas no espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. A unidade utilizada foi de micrograma/mL. As análises foram submetidas a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Atividade de proteínas inseticidas (lectina e inibidor de tripsina). Atividade hemaglutinante de lectina e inibidora de tripsina foram analisadas nas cinco cultivares utilizadas.

Atividade hemaglutinante nos cultivares de milho. Esta atividade foi avaliada em placas de microtitulação (TPP-Techno Produtos Plásticos, Trasadingen, Suíça) de acordo com a metodologia descrita por Napoleão et al. (2011). Uma diluição seriada dos extratos das sementes das cultivares de milho foi realizada as amostras incubadas com uma suspensão de eritrócitos de coelho tratados com o glutaraldeído 2,5% (v/v), de acordo com Bing et al. (1967). A atividade hemaglutinante foi definida como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu total hemaglutinação. A atividade hemaglutinante específica foi definida como a razão entre o título e a concentração da proteína (mg/mL). Os resultados foram observados após 45 min da adição da suspensão de eritrócitos.

Atividade inibidora de tripsina. Esta atividade foi determinada em microplacas, sendo adicionados 5 μ L de tripsina bovina a 0,1 mg/mL (em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo CaCl_2 0,02 M) a 5 μ L do substrato N- α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BApNA) e incubados com os extratos (5-15 μ L) de sementes das cultivares de milho. O volume de cada poço foi ajustado para 200 μ L com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M. Controles do substrato (ausência da enzima e inibidor), da amostra (ausência de enzima e substrato) e controle 100% (ausência do inibidor) foram realizados. Após 30 min de incubação, a hidrólise do BApNA foi determinada pela medida da absorbância a 405 nm. Uma unidade de atividade inibidora de tripsina foi definida como a quantidade de inibidor que reduz a absorbância em 0,01 após 30 min a 37 °C em relação ao controle (PONTUAL et al., 2014).

4. RESULTADOS

Teste sem chance de escolha. A duração da fase imatura de *S. zeamais* não foi afetada, sendo o ciclo ovo a adulto semelhante para todas as cultivares. Entretanto, número menor de insetos emergidos foi observado na cultivar BR 106. Considerando o número de adultos emergidos e o tempo médio de desenvolvido das larvas, as variedades BRS Caatingueiro e BRS Asa Branca foram as mais suscetíveis ao ataque de *S. zeamais*. Essas variedades apresentaram os maiores índices de suscetibilidade; 9,80 e 9,34; respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Número médio (\pm EP) de *Sitophilus zeamais* emergidos, duração da fase imatura, índice de suscetibilidade e Proteínas em *S. zeamais*, obtidos em cultivares de milho, em teste sem chance de escolha.

Cultivares	Número de adultos emergidos ¹	Duração da fase imatura (dias) ¹	Índice de suscetibilidade ¹	Proteínas totais em <i>S. zeamais</i> ($\mu\text{g/mL}$) ¹
BRS Caatingueiro	213,17 \pm 17,38 a	54,65 \pm 1,09 a	9,80 \pm 0,27 a	33,08 \pm 1,89 a
BRS Asa Branca	174,83 \pm 23,54 ab	55,31 \pm 1,74 a	9,34 \pm 0,54 ab	18,35 \pm 1,27 c
BRS Sertaneja	136,50 \pm 17,22 bc	55,52 \pm 0,51 a	8,79 \pm 8,79 bc	29,75 \pm 1,64 ba
BRS Gorutuba	130,50 \pm 24,93 bc	58,79 \pm 1,19 a	8,17 \pm 0,43 bc	28,50 \pm 2,10 ba
BR 106	74,00 \pm 11,92 c	55,54 \pm 1,54 a	7,66 \pm 0,34 c	23,03 \pm 1,66 bc

¹Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Após os primeiros 15 dias de confinamento os *S. zeamais* não apresentaram diferença estatística entre as variedades testadas em relação a perda de massa seca, apenas após 30 dias pode-se observar diferenças entre as cultivares estudadas. A BR 106 foi a mais resistente apresentando o menor índice (7,66), bem como apresentou a menor perda de massa seca (3,27 g) 60 dias após a infestação por adultos de *S. zeamais*, enquanto as demais variedades perderam entre 9,28 g (BRS Asa Branca) e 7,36 g (BRS Gorutuba) (Figura 1).

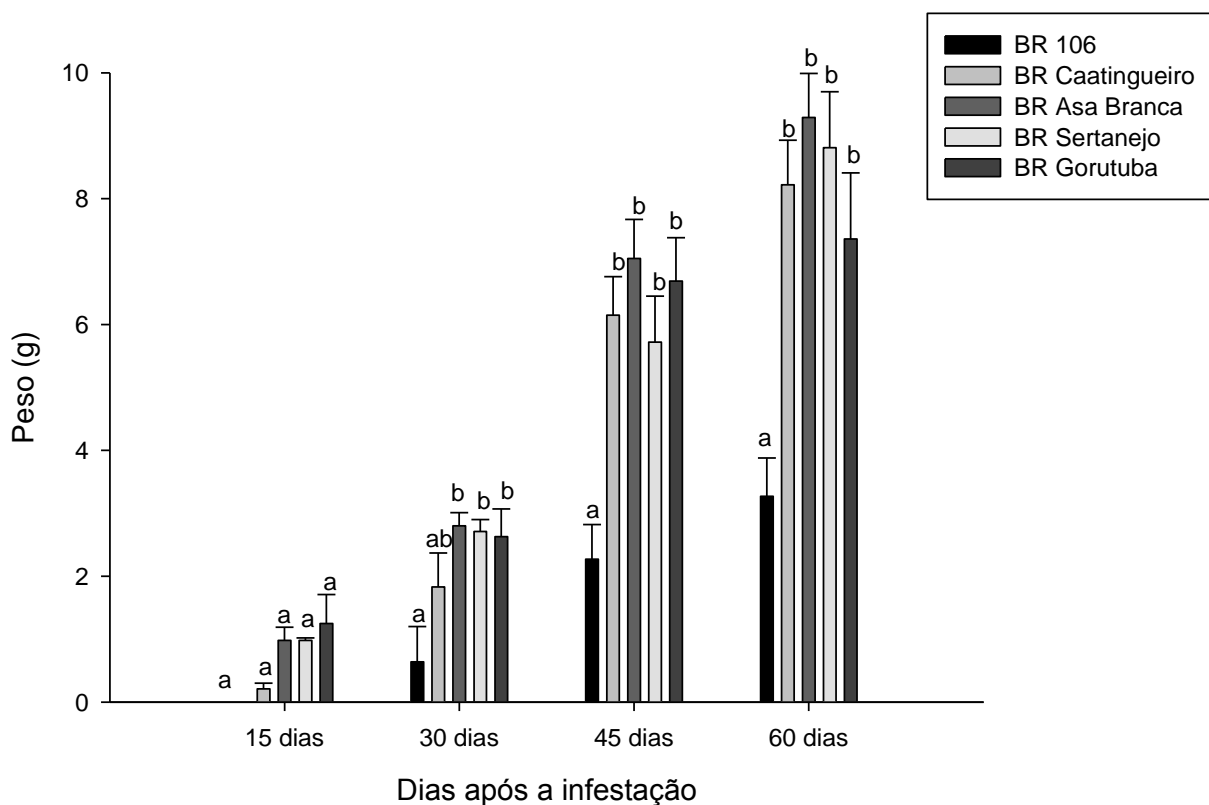


Figura 1. Perda de peso de diferentes cultivares de milho submetidos ao ataque de *Sitophilus zeamais*. Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Teste com chance de escolha. Observou-se que o número de insetos presentes no milho BR 106 foi significativamente menor que os encontrados nas variedades BRS caatingueiro, BRS asa branca e BRS sertanejo e BRS gorutuba sendo estes últimos, portanto, os mais atrativos nas condições do experimento (Figura 2).

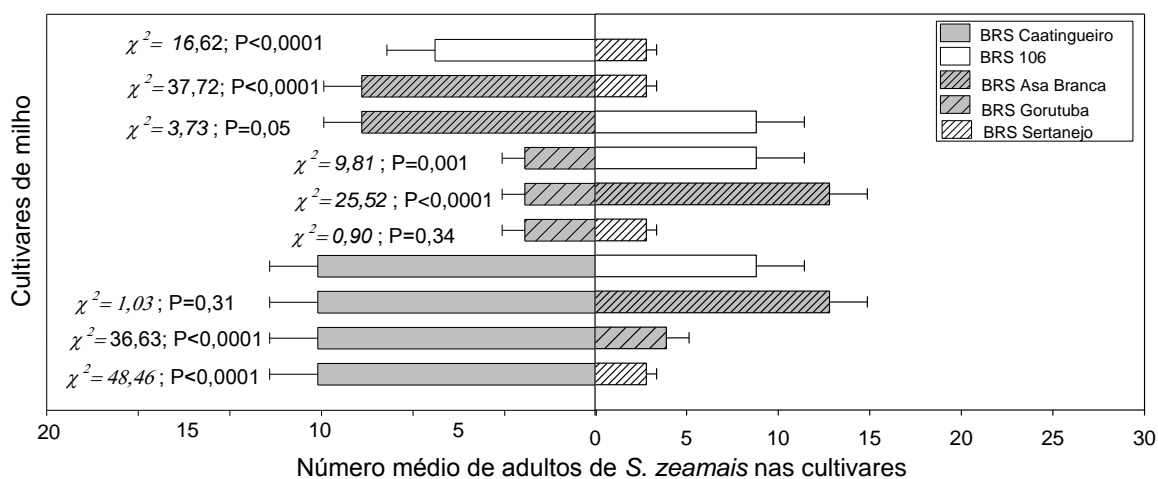


Figura 2. Preferência de adultos de *S. zeamais* (n = 435) por cultivares comerciais de sementes de milho. Significância (P) através do teste de χ^2 a 5% de probabilidade.

Análise de proteína totais em *S. zeamais*. As variedades BRS catingueiro (33,08), BRS sertaneja (29,75) e BRS gorutuba (28,50) não diferiram entre si quanto a sua influência na redução na aquisição de proteínas totais nos adultos de *S. zeamais*. As Variedades de milho que mais influenciaram nesta aquisição nutricional foram a BRS asa branca (18,35) e a BR 106 (23,03) ocasionando uma diminuição na quantificação proteica nos insetos bastante significativa quando comparadas as demais. Contudo a variedade BR 106 não diferiu estatisticamente das variedades BRS sertaneja e BRS Gorutuba.

Atividade de proteínas inseticidas (Atividade hemaglutinante – lectina). A atividade de lectina obtida nas cultivares BR 106, BRS Asa Branca, BRS sertanejo e BRS Gorutuba correspondendo a 4,86; 2,59; 1,84 e 1,29 (U/mg), respectivamente. Na cultivar BRS Caatingueiro não houve atividade da lectina. As cultivares com maior concentração de lectina como a BR 106 e BRS gorutuba apresentaram um menor número de *S. zeamais* adultos apresentando também uma menor perda de massa seca nos grãos. Enquanto a BRS catingueiro que não apresentou atividade hemaglutinante, ou seja não possui lectina na sua constituição, o número de emergência de adultos de *S. zeamais* foi maior, bem como sua perda de massa de massa seca. A lectina está ligada com o processo de consumo de massa seca, quanto maior o teor de lectina menor o consumo de massa seca e conseqüentemente menor número de insetos

emergidos, como observado na BR 106 que apresentou maior atividade hemaglutinante, menor consumo de massa seca e menor emergência de adultos (Figura 3 e Tabelas 1 e 2).

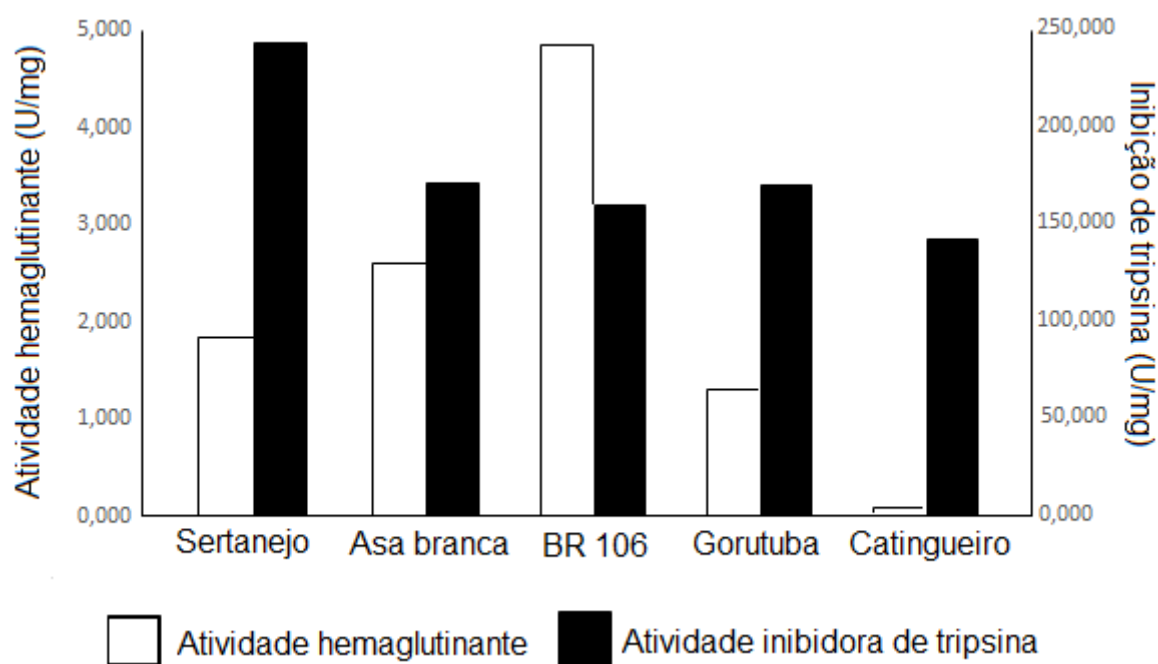


Figura 3. Atividades hemaglutinante e inibidora de tripsina de diferentes cultivares de milho.

Atividade Inibidora de Tripsina. As cultivares BRS Sertanejo, BRS Asa branca, BR 106, BRS Gorutuba e BRS Catingueiro exibiram alta atividade inibidora de tripsina, com os valores de 243,05; 171,048; 160,16; 170,71 e 142,62 (U/mg), respectivamente (Figura 3). A atividade inibitória de tripsina, podem ter influenciado no desenvolvimento da fase imatura, pois com a inibição da tripsina não há a quebra de proteínas incapacitando assim a absorção de componentes importantes para o desenvolvimento do *S. zeamais*, o que pode ter influenciado no ciclo biológico com um pequeno alongamento.

5. DISCUSSÃO

O ato da alimentação de um inseto herbívoro envolve ganhos energéticos com a metabolização dos constituintes do tecido vegetal e perdas relacionadas a defesa e resistência da planta. Quando se trata de uma resposta a resistência da planta hospedeira esse gasto energético é elevado e existe comprometimento de componentes importantes da história de vida do inseto (CORRÊIA; SALGADO, 2011). A exemplo do trabalho realizado por Marsaro Júnior et al. (2008) com variedades de grãos de milho resistentes ao ataque de *S. zeamais*. Onde os resultados demonstraram um aumento significativo na população de insetos durante 30 dias de armazenamento e os híbridos mais resistentes apresentaram os menores valores de emergência.

Nunes; Rizental (2015) também submeteram o *S. zeamais* a variedades resistentes de milho e seus resultados demonstram que o aumento da resistência foi inversamente proporcional a sobrevivência dos adultos. Esses resultados corroboram com os encontrados na presente pesquisa onde as variedades mais resistentes BR 106, seguida de BRS Sertanejo e BRS Gortuba apresentaram uma redução na emergência de adultos, e também indicam uma resistência do tipo antibiose sobre as larvas desta praga. Uma planta que expressa antibiose pode afetar o potencial reprodutivo do inseto devido à mortalidade da fase imatura, baixa emergência de adultos, além de redução no tamanho e peso dos indivíduos. Este mecanismo também pode alterar a longevidade, oviposição, mortalidade, fecundidade e promover o alongamento do ciclo do inseto, entre outros (MIKAMI et al., 2012). Ainda segundo Farinelli (2006) esse efeito subletal na biologia dos insetos-praga, ocasiona, ao longo das gerações, populações com indivíduos menos vigorosos e mais suscetíveis a ação de inseticidas.

Outra característica de variedades resistentes a insetos praga é a redução na perda da massa seca dos grãos quando infestados (MARSARO JÚNIOR et al., 2005). Este fato pode ser observado na cultivar BR 106, onde foi conferida a maior resistência e menor perda dos grãos quando atacadas por *S. zeamais*. Essa redução na massa seca dos grãos deve-se também ao fato de que essa variedade foi a menos preferida por esses insetos, quando comparadas as demais cultivares. Essa não preferência da variedade BR 106 pelos insetos, sugere uma resistência do tipo não-preferência para

oviposição ou alimentação conhecida como antixenose. Segundo Thompson (1991) a planta não representa para o inseto apenas uma fonte de alimento, mas um local de reprodução e abrigo, com isso algumas características tornam uma planta preferencial ou não para um determinado inseto. Dessa forma, a espécie do hospedeiro pode determinar o potencial de infestação de insetos-praga nas culturas, modulando seu ritmo, e podem ajudar a explicar o sucesso da colonização de uma cultura (CAMPOS et al., 2003).

Outro fator que interfere no desenvolvimento de insetos praga é a ingestão de lectinas vegetais. Segundo Sá et al. (2009) as lectinas vegetais são proteínas que interferem na alimentação, desenvolvimento, reprodução e sobrevivência de insetos em diferentes estágios de vida e são comumente encontradas em variedades resistentes. A variedades mais suscetível (BRS catingueiro) apresentou uma menor concentração de lectinas quando comparadas as demais variedades. Portanto a redução na quantidade dessas substâncias na variedade suscetível pode explicar a preferência de *S. zeamais* por essa cultivar. Embora Mikami et al. (2012) afirmem que os níveis de proteínas não afetam a resistência de milho a *S. zeamais*, nossos resultados demonstram que maiores concentrações de lectinas estão correlacionadas com a resistência. Trabalhos realizados por Napoleão et al. (2013) com lectinas extraídas de folhas de *Myracrodruon urundeuva* (Sapindale: Anacardiaceae) demonstram uma ação inibitória dessa proteína no sistema digestivo de *S. zeamais* atuando nas enzimas digestivas. Este efeito nutricional ocasiona alterações em parâmetros biológicos que afetam diretamente a sobrevivência desses organismos. Esse efeito nutricional ocasionado pelas lectinas segundo Pereira De Albuquerque et al. (2012) esta relacionado a ação inibitória ocasionada por proteína na glucosidase, uma enzima importante no processo de digestão da celulose.

A quantidade de proteínas totais presentes nos adultos de *S. zeamais* alimentados com as variedades de milho foi inversamente proporcional a quantidade de inibidor de tripsina encontrada nos grãos testados. A tripsina é uma enzima cuja função é digestão proteolítica durante o processo de alimentação e a aumento do seu inibidor ocasiona uma redução na absorção proteica no lúmen do intestino dos insetos (PILON et al., 2009). Um dos mecanismos de inibição da tripsina ocorre através das proteínas serínicas (KOIWA et al., 1997), tendo importante potencial inibitório contra enzimas digestivas de insetos herbívoros de plantas economicamente importantes. Estes inibidores formam um importante componente na estratégia do mecanismo de

resistência de plantas. Em geral, a taxa de síntese destes inibidores atinge o ápice em 12 horas e resulta em níveis máximos de acumulação por volta de 24 a 48 horas após o ataque de um inseto (BHATTACHARYYA et al., 2007).

Pesquisadas realizadas por Lira et al. (2015) demonstram que adultos de *S. zeamais* tratados com o óleo de *Alpinia purpurata* (Zingiberales: Zingiberaceae) apresentaram uma redução na absorção de nutrientes, interferindo, por consequência, no quantitativo proteico. Os autores atribuem esta ação ao inibidor de tripsina, que ocasionou uma redução na absorção de resíduos de aminoácidos essenciais pelo inseto.

As proteínas são constituídas de aminoácidos cuja função pode ser estrutural, enzimática, transporte e armazenamento de moléculas, receptores entre outras (CHAPMAN, 2013). A redução proteica afeta diretamente a vitelogênese, já que proteínas como vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica, catepsina B e lipoforina são produzidas e secretadas pelo corpo gorduroso e incorporadas aos ovócitos em desenvolvimento, e sua redução acarreta efeitos negativos na reprodução (GUIZZO et al., 2012).

Com isso, a utilização de cultivares transgênicos que expressam lectinas e genes de inibidores de tripsina, como as cultivares BR 106, BRS caatingueiro, BRS asa branca, BRS sertanejo e BRS gorutuba, tornando assim essas plantas resistentes a insetos herbívoros como *S. zeamais*, pode ser uma alternativa viável, por ocasionar efeitos adversos nesses organismos, afetando não apenas a aquisição de nutrientes mais também a sobrevivência desses organismos, além de ocasionar menor impacto ambiental, adequando-se assim aos princípios do manejo integrado de pragas.

5. CONCLUSÕES

A cultivar BR 106 apresentou maior resistência ao ataque de *S. zeamais*.

A presença de lectinas e de inibidores de tripsina influenciaram na resistência das cultivares BR 106, BRS caatingueiro, BRS asa branca, BRS sertanejo e BRS gorutuba, ao ataque de *S. zeamais*.

A alta atividade inibidora de tripsina prolongou o ciclo biológico do gorgulho e, conseqüentemente, aumentou a resistência das cultivares, bem como podem ter influenciado no consumo de matéria seca de grãos de milho.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGRA NETO, A.C.; PONTUAL, E.V.; COELHO, L. C. B. B.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P.M.G. Evaluation of insecticidal activity of aqueous extract and water soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds against *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Pest Science**. v. 87, p.379-550, 2015.

ALMEIDA, F.A.C.; PESSOA, E.B.; GOMES, J.P.; SILVA, A.S. Emprego de extratos vegetais no controle das fases imatura e adulta do *Sitophilus zeamais*. **Agropecuaria Técnica**. v. 26, p.46-53, 2005.

ANTUNES, L.E.G.; VIEBRANTZ, P.C.; GOTTARDI, R.; DIONELLO, R.G. Características físico-químicas de grãos de milho atacados por *Sitophilus zeamais* durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.6, p.615–620, 2011.

ARNASON, U; GULLBERG, A. Comparison between the complete mtDNA sequences of the blue and the fin whale, two species that can hybridize in nature. **Journal of Molecular Evolution**. v. 37:3, p. 12-322. 1993.

BHATTACHARYYA, A.; LEIGHTON, S. M.; BADU, C. R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.145,: 666-677, 2007.

BING, D. H.; WEYAND, J. G. M.; STAVISTSKY, A. B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v.124, p.1166-1170, 1967.

BOYER, S.; ZHANG, H.; LEMPÉRIÈRE, G. A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. **Bulletin of Entomological Research**, v.102, p.213–229, 2012.

CAMPOS, R. L.; LOPES, C. T.; WAGNER C. S.; MAGALHÃES; VASCONCELOS, H.L. Estratificação vertical de formigas em Cerrado *strictu sensu* no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, Goiás, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, Goiás, v.98, p.311-316, 2003.

CHAPMAN, R.F. **The insects : structures and function**. Cambridge, Cambridge University Press, 929p, 2013.

CLASSEN, D.; ARNASON, J.T.; SERRATOS, J.A.; LAMBERT, J.D.H.; NOZZOLILLO, C.; PHIOGENE, B.J.R. Correlation of phenolic acid content of maize to resistance of *Sitophilus zeamais*, the maize weevil in CIMMYT's collections. **Journal of chemical ecology**, Dordrecht, v.16, p. 301-315, 1990.

CONAB 2015. (Companhia Nacional de Abastecimento). Safra nacional de Milho. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/boletim_graos_setembro_2015> Acesso em Novembro de 2015.

CORRÊA, A.S.; PEREIRA, E.J.G.; E.M.G. CORDEIRO; BRAGA, L.S.; GUEDES, R.N.C. Insecticide resistance, mixture potentiation and fitness in populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). **Crop Protection**, v.30, p.1655–1666, 2011.

CORREIA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Atividade inseticida de plantas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, p.500-506, 2011.

CRUZ, A. C. B. **PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOINSETICIDA, DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA EM SEMENTES DE CATANDUVA (*Piptadenia moniliformis*)** Universidade Federal do Rio Grande do norte NATAL/RN Dissertação 2008.

DIAZ, S.; CABIDO, M. Casanoves F. Functional implications of trait-environment linkages in plant communities. In: Weiher E, Keddy P (eds) **Ecological assembly rules - Perspectives**, advances, retreats. Cambridge University Press, Cambridge, p 338-362 1999.

DOBIE, P. The contribution of the tropical stored products centre to the study of insect resistance in stored maize. **Tropical Stored Product**. Inf. 34: 7-22. 1977.

FARINELLI, R.; FORNASIERI, F. Avaliação de dano de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de milho. **Revista Científica**, v.34, n.2, p. 197-202, 2006.

FERRARI FILHO E., ANTUNES L. E. G., TIECKER A., DIONELLO R. G., SPOLTI P. Controle de Gorgulho-do-milho Submetido ao tratamento térmico. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, n.3, p. 196-204, 2011.

FERRARI FILHO, E.; ANTUNES L.E.G.; TIECKER, A.; DIONELLO, R.G.; SPOLTI P. Controle de Gorgulho-do-milho Submetido ao tratamento térmico. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, n.3, p. 196-204, 2011.

FRANCELLI, A. L. Ecofisiologia de plantas de lavouras. In: CARLESSO, R. (Ed.). **Irrigação por aspersão no Rio Grande do Sul. Santa Maria**: Reimar Carlesso, p. 59-73. 2001.

FRANCO, O. L., RIGDEN, D. J., MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their inter action with insect α -amylases. Structure, function and potential for crop protection. **Europe an Journal Biochemistry**, v.269, p. 397-412, 2002.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVAIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN J. D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. FEALQ. 920p. 2002.

GOMES, G. L. B. **Detecção de inibidores de tripsina em genótipos de gergelim visando controle de *Plodia interpunctella***. Embrapa Algodão. Biotecnologia. 59P. 2014.

GUIZZO, M.G.; ABREU, L.; MASUDA, A.; LOGULLO, C.; JUNIOR, I.S.V. Metabolism of Biomolecules in the Embryogenesis of the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, p.1010-1022, 2012.

KOIWA, H., BRESSAN, R. A., HASEGAWA, P. M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, v.2. p.379-384, 1997.

LAZAREVIC, J.; JANKOVIC-TOMANIC, M. Dietary and phylogenetic correlates of digestive trypsin activity in insect pests. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.157, p.123–151, 2015.

LIMA, M.P.L.; OLIVEIRA, J.V.; BARROS, R.; TORRES, J.B, Identificação de Genótipos de *Caupi Vigna unguiculata* (L.) Walp. Resistentes a *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.2 p. 289-295, 2001.

LIRA, C. S.; PONTUAL, E. V.; ALBUQUERQUE, L. P.; PAIVA, L. M.; PAIVA, P. M. G. P.; OLIVEIRA, ; NAPOLEÃO, T. H.; NAVARRO, D. M. A. F. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil) **Crop Protection**, v.71, p.95–100, 2015.

LOECK, A. E. **Pragas de Produtos Armazenados**. Pelotas: EGUFPEL, 113 p. 2002.
LORINI, I. **Controle Integrado de Pragas de grãos armazenados**. Passo Fundo: Embrapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, p. 521. 1998.

LORINI, I. **Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 72p. 2008.

LORINI, I. **Manual Técnico para o Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados**. Embrapa Trigo. 2ª impressão. Passo Fundo-RS. 2003.

LORINI, I. **Pragas de grãos de cereais armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 60p.

MARSARO JÚNIOR, A. L.; LAZARRI, S.M.N.; FIGUEIRA, E.L.Z.; HIROOKA, E.Y. Inibidores de amilase em híbridos de milho como fator de resistência a *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, p. 443-450, 2005.

MARSARO JÚNIOR, A. L.; LAZZARI S. M. N.; PINTO JÚNIOR A. R, Inibidores de enzimas digestivas de insetos-praga. **Revista Acadêmica de Curitiba**, v.4, n.1, p. 57-61, jan./mar. 2006.

MARSARO JÚNIOR, A. L.; VILARINHO, A. A.; PAIVA, W. R. S. C.; BARRETO, H. C. S. Resistência de híbridos de milho ao ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) em condições de armazenamento. **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e Ambientais**, v.6, p.45-50, 2008.

MATOS, M. J.L. F.; TAVARES, S. A.; SANTOS, F. F.; MELO, M. F.; LANA, M. M. **Milho verde. 2006**. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/dicas_ao_consumidor/milho_verde.htm>. Acesso em: Novembro de 2015.

MAZZONETO, F.; BOIÇA, JÚNIOR, A. L. Determinação dos tipos de resistências de genótipos de feijoeiro ao ataque de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 307-311, 1999.

MIKAMI, A.Y.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; VENTURA, M.U. Resistance of Maize Landraces to the Maize Weevil *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p.404–408, 2012.

MORAIS, A. A. **Epistasia na herança da resistência do milho ao gorgulho *Sitophilus zeamais* (coleóptera: curculionidae)**. Tese, ESALQ, Piracicaba, 2012.

NAPOLEÃO T. H., A, BELMONTE B. R; PONTUAL E. V; ALBUQUERQUE L. P; SÁ R. A; PAIVA L. M; COELHO L. C. B. B; PAIVA P. M. G. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae) **Journal of Stored Products Research** v. 54 p. 26-33. 2013.

NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; LIMA, T.A.; SANTOS, N.D.L.; SÁ, R.A.; ALBURQUERQUE, A.C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Termiticidal activity of

lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 65, p. 52-59. 2011a.

NAPOLEÃO, T.H.; PONTUAL, E.V.; LIMA, T.A.; SANTOS, N.D.L.; SÁ, R.A.; COELHO, L.C.B.B.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA, P.M.G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v.110, p.609-616, 2011b.

NAPOLEÃO., T., H. PEREIRA DE ALBUQUERQUE., L. BARROSO COELHO., L., C., B., BELMONTE., R., B., SÁ., R., A., PONTUAL E., V., PAIVA., L., M., PAIVA., P., M., G. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research** V. 54 P 26 e 33. 2013.

NASCIMENTO, R.J.; PAVAN, B.E.; SILVA, L.B.; CARVALHO, G.S.; SILVA, A.F. MAGGION, K. Resistance of Two Maize Landraces in Breeding Stage to the Attack of *Sitophilus zeamais*. **American Journal of Plant Sciences**, v.5, p.2929-2934, 2014.

NORNBERG, S.D.; NAVA; D.E.; GRUTZMACHER; A.D.; BENTO; J.M.S.; OZELAMEHUBNER; A.L.; HÜBNER, L.K. Flutuação populacional e distribuição de *Sitophilus zeamais* em pomares de pessegueiro e macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p. 358-364, 2013.

NUNES, M.P.; RIZENTAL, M. Preferência alimentar de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) em variedades de milho transgênico. **Conectonline**, n.12, p. 84-89, 2015.

OLIVEIRA, D.G.P.; ALVES, L.F.A.; MARCHESE, L.P.C.; THOMAZONI, D. Persistência da ação inseticida e repelência da terra de diatomácea para o cascudinho-dos-aviários *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.1, p.201-210, jan./mar. 2009.

OLIVEIRA, A. S. **Purificação e Caracterização de Inibidores de Tripsina da Família Kunitz de Sementes de *Pithecellobium dumosum* e Seus Efeitos In Vitro Sobre Insetos Pragas**. Universidade Federal do Ceará Fortaleza – CEARÁ TESE 2007.

PEREIRA DE ALBUQUERQUE. L; SANTANA G. M. S; PONTUAL E. V; NAPOLEÃO T. H; COELHO L. C. B. B; PAIVA P. M. G. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 75 p. 158-166. 2012.

PEREIRA, C.J.; PEREIRA, E.J.C.; CORDEIRO, E.M.G.; DELLA LUCIA, T.M.C.; TÓTOLA, M.R.; GUEDES, R.N.C. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: Magnitude and behavior. **Crop Protection**, v.28, p. 168-173, 2009.

PILON, A.M., OLIVEIRA, M.G.A., PILON, M. F., GUEDES, C. R.N., OLIVEIRA, J.A., FAZOLLOS, A. 2009. Adaptação da lagarta de soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. **Revista Ceres**, v. 56, n.6, p. 744-748.

PONTUAL, E.V.; SANTOS, N.D.L.; MOURA, M.C.; COELHO, L.C.B.B.; NAVARRO, D.M.A.F.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. **Parasitology Research**. v. 113, p.727–733. 2014.

RIBEIRO, B.M.; GUEDES R.N.C., OLIVEIRA, E.E.; SANTOS, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamays* (Coleoptera:Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**. Vol.39, p. 21-31, 2003.

RIBEIRO-COSTA, C.S.; PEREIRA, P.R.V.S.; ZUKOVSKI, L. Desenvolvimento de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae) em Genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) Cultivados no Estado do Paraná e Contendo Arcelina. **Neotropical Entomology**, v.36, n.4, p.560-564, 2007.

ROSSETO, C.J. Resistência do milho às pragas da espiga, *Helicoverpa zea* (Boddii), *Sitophilus zeamais* (Mots.) e *Sitotroga cerealella* (Olivier). Tese (Doutorado), ESALQ, Piracicaba, 11p. 1972.

ROSSI, G. D.; DOS SANTOS, C. D.; CARDOSO, M. G.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; PAIVA, L. V. Inibição da tripsina de bicho-mineiro do cafeeiro por um fator não-protéico presente em extratos de folhas de mamona. **Ciência agrotecnica de lavras**, v. 34, n. 2, p. 361-366, mar./abr., 2010.

SÁ, R.A., SANTOS, N.D., SILVA, C.S., NAPOLEÃO, N.T., GOMES, F.S., CAVADA, B.S., COLEHO, L.C., NAVARRO, D.M., BIEBER, L.W. AND PAIVA P.M. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 149, p. 300-306, 2009.

SANTOS, J.P.; FOSTER, J.E. Identificação de grãos de milho resistentes ao gorgulho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.16, n.1, p.39-3, 1981.

SAS INSTITUTE INC. **System for Microsoft Windows**, Release 8.2, Cary, NC, USA, 1999-2001.

SANTOS, J.C. ; FARONI, L.R.D.; SIMÕES, R.O.; PIMENTEL, M.A.G.; SOUSA, A.H. Toxicity of pyrethroids and organophosphorus insecticides to Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Bioscience Journal*, v.25, n.6, p.75-81, 2009.

SANTOS, J. P. **Embrapa Milho e Sorgo. Pragas de grãos armazenados**. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/colpragas.htm>>. Acesso em 10 nov. 2015.

SANTOS, J.P. **Perdas causadas por insetos em grãos armazenados**. In: **SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMazenados**, Passo Fundo, 1993. Anais. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, p.9-22. 1993.

SCHOEDER, H.E., S. GOLLASCH, A. MOORE, L.M. TABE, S. CRAIG, D. HARDIE, M.J. CHRISPEELS, D. SPENCER, T.V.J. HIGGINS. Bean α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. **Biotechnology**, 12: 793-796. 1995.

SCHOLLER, M.; PROSELL, S.; AL-KIRSHI, A.G.; REICHUMUTH, C.H. Towards biological control as a major component of integrated pest management in stored product protection. **Journal of Stored Products Research**, v.33,p.81-97, 1997.

SIWALE, J.; MBATA, K.; MCROBERT, J.; LUNGU, D. Comparative resistance of improved maize genotypes and landraces to maize weevil. **African Crop Science Journal**, v.17, n.1, p.1-16, 2009.

SOUZA, A.R.; SILVA, T.M.; SANTOS, J.F.L. Seleção e desenvolvimento de *Sitophilus oryzae* (Linné, 1763) em três substratos. **Magistra**, v. 24, p. 160-163, 2012.

TAVARES M.A.G.C.; VENDRAMIM D.J. Atividade inseticida da erva-de-santa-maria *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col.: Curculionidae). **Arquivo do Instituto Biológico**, v.72, n.1, p.51-55, 2005.

THOMPSON, J. N.; PELLMYR, O. Evolution of oviposition behavior and host preference in Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, Washington, v.36, p. 65-89, 1991.

USDA. United States Department of Agriculture . **Levantamento da safra de milho 2015/2016**. Disponível em: < <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahomehtm>>. Acesso em: fevereiro de 2016.

VENDRAMIM, D.J.; GUZZO, E.C. Resistência de plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R. (Ed.). **Bioecologia e nutrição de insetos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.1.055-1.105 2009.

WALSKI, T.; VAN DAME, E.J.M; SMAGGHE, G. Penetration through the peritrophic matrix is a key to lectin toxicity against *Tribolium castaneum*. **Journal of Insect Physiology**,v.70, p.92-101, 2014.

WIDSTROM, N.W.; BONDARI, K.; MCMILIAN, W.W. Hybrid performance among maize populations selected for resistance to insects. **Crop Science**. v.32, p.85-89, 1992.