

CROP PROTECTION

Inibidores de Amilase em Híbridos de Milho Como Fator de Resistência a *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)

ALBERTO L. MARSARO JÚNIOR¹, SONIA M.N. LAZZARI², EDSON L.Z. FIGUEIRA³ E ELISA Y. HIROOKA⁴

¹Embrapa Roraima, Br 174, km 8, Distrito Industrial, C. postal 133, 69301-970, Boa Vista, RR
alberto@cpafrr.embrapa.br

²Depto. Zoologia, Universidade Federal do Paraná, C. postal 19020, 81531-990, Curitiba, PR, lazzari@ufpr.br

³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 70770-900, Brasília, DF, luiz@cenargen.embrapa.br

⁴Depto. Tecnologia Alimentos e Medicamentos, Univ. Estadual de Londrina, C. postal 6001, 86051-990, Londrina, PR
hirooka@uel.br

Neotropical Entomology 34(3):443-450 (2005)

Amylase Inhibitors in Corn Hybrids as a Resistance Factor to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)

ABSTRACT - *Sitophilus zeamais* Motschulsky is one of the major pests of stored corn and it is mainly controlled by insecticides. However, due to the undesirable consequences of chemicals on the environment and human health other control measures have been investigated, especially the development of resistant plants. The presence of amylase inhibitors in corn kernels may interfere with the insect digestive process. This research was developed in order to evaluate resistance of corn hybrids to the attack of *S. zeamais* correlated with amylase inhibitors and nutritional composition of corn kernels. Adults of the maize weevil were exposed to grain samples of different corn hybrids at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ R.H. 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 amylase inhibitor activity. The amylase inhibitor activity was determined by incubating the amylase inhibitor with 0.2 units of amylase for 30 min 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 ($r = 0.46$). The amylase inhibitors obtained by the extraction with either ethanol or buffer were significantly and negatively correlated with the susceptibility index ($r = -0.58$), indicating that the inhibitors contribute to the resistance of corn hybrids to the attack of *S. zeamais*.

KEY WORDS: Insecta, maize weevil, plant resistance, stored corn

RESUMO - *Sitophilus zeamais* Motschulsky é uma das principais pragas do milho armazenado, sendo controlado, principalmente, com inseticidas. Porém, devido às consequências indesejáveis desses químicos sobre o meio ambiente e a saúde humana, outras táticas de controle têm sido investigadas, especialmente o desenvolvimento de plantas resistentes. A presença de inibidores de amilase nos grãos de milho pode interferir na digestão do inseto. Esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar a resistência de híbridos de milho ao ataque de *S. zeamais*, correlacionada com a presença de inibidores de amilase e com a composição nutricional dos grãos. Adultos do gorgulho-do-milho foram expostos a amostras de grãos de diferentes híbridos a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de UR. Avaliou-se o 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 min. a 25°C , medindo-se posteriormente a atividade amilásica residual pelo método iodométrico. Dos parâmetros nutricionais avaliados, somente o conteúdo de lipídios correlacionou-se significativamente com o índice de suscetibilidade ($r = 0,46$). Os inibidores de amilase obtidos pela extração com etanol ou tampão correlacionaram-se negativa e significativamente com o índice de suscetibilidade ($r = -0,58$), sugerindo que esses inibidores contribuem para a resistência de híbridos de milho ao ataque de *S. zeamais*.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, gorgulho-do-milho, resistência de plantas, milho armazenado

O gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), é uma das pragas mais importantes do milho armazenado devido ao seu 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 realizado, principalmente, através da utilização de inseticidas (Miranda et al. 1995). Porém, o uso excessivo desses produtos tem contribuído para a seleção de populações de insetos resistentes a esses químicos, assim como, para a contaminação de grãos e seus subprodutos com resíduos dos ingredientes ativos (Lorini 2001).

Os consumidores têm exigido, dos produtores e das indústrias, grãos e produtos livres de pesticidas. Assim, diante desse quadro, os cientistas, na busca por métodos de controle de insetos que sejam menos danosos ao meio ambiente e ofereçam menos riscos para a saúde humana e animal, têm intensificado suas pesquisas no desenvolvimento de plantas resistentes a insetos. Grãos que expressam inibidores de enzimas digestivas dos insetos, especialmente inibidores das α -amilases, representam uma ferramenta promissora para o controle de pragas de grãos armazenados (Pueyo et al. 1995, Ishimoto et al. 1996).

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*.

Os mecanismos de interação e especificidade dos inibidores com as α -amilases são complexos e ainda não foram completamente elucidados. Nos inibidores do tipo não proteináceos, a atividade inibitória das α -amilases é devida em parte à sua estrutura cíclica que se assemelha aos substratos da α -amilase e, por isso, possibilita a ligação nos sítios catalíticos da 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). Os autores demonstraram que ervilhas transgênicas expressando o inibidor de α -amilase α -A11 (originário de *Phaseolus vulgaris*) foram altamente resistentes aos insetos *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) e *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae).

Dentre os inibidores mais estudados, destaca-se o α -A11, 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); *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) (Pueyo et al. 1995); *C. maculatus*, *C. chinensis* e *C. analis* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) (Ishimoto et al. 1996); *Diabrotica 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 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 ao cereal. Outra questão relevante é avaliar até que ponto a composição nutricional (umidade, cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos) dos grãos influencia a resistência.

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a resistência de híbridos de milho (AG 1051, CD 303, CD 3121, Dina 766, DOW 8480, 97 HT 129 QPM, BRS 1001, IPT 9/202, IPS G/58, Pioneer 30 F 98 e P 30 F 33) ao ataque por *S. zeamais* e correlacioná-la com inibidores de amilase contidos em extratos de grãos de milho e com a composição nutricional destes para verificar se esses fatores são importantes na resistência de híbridos de milho contra o ataque da praga.

Material e Métodos

Híbridos de Milho. Os genótipos de milho utilizados nesta pesquisa foram obtidos no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR-Londrina), mas não havia informação prévia sobre a resistência ou presença de inibidores de amilase nesses materiais. Alguns eram sementes comerciais, enquanto outros eram genótipos experimentais. As características físicas desses híbridos estão apresentadas na Tabela 1.

Os grãos foram secos à sombra até 13,5% de umidade. Na determinação desta, três amostras de 5 g de grãos, de cada híbrido, foram colocadas em estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, 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).

Criação dos Insetos e Avaliação da Resistência. Os adultos de *S. zeamais* utilizados nos bioensaios, obtidos da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, foram criados em potes de 2 L contendo grãos de milho, previamente congelados para eliminar infestações, e mantidos em temperatura ambiente no Laboratório de Entomologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

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

Híbridos ¹	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

¹A citação dos materiais não implica em endosso por parte dos autores.

Cada parcela experimental consistiu de uma amostra de 100 g de grãos de cada híbrido que 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, os adultos foram removidos. 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 $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ UR e 12h de fotofase.

A resistência dos híbridos de milho foi avaliada pelo índice de suscetibilidade (IS) (Dobie 1977), que é baseado na análise do número de insetos emergidos e no tempo médio de desenvolvimento, após infestação artificial dos grãos por *S. zeamais*. Esse índice foi determinado pela equação

$$IS = \frac{\ln \sum x}{T} \times 100$$

, 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. Esse último foi calculado pela equação

$$T = \frac{\sum (x.y)}{\sum x}$$

, 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 avaliados o peso dos gorgulhos adultos, após 24h da emergência, e a perda de peso da matéria seca dos grãos, provocada pelos adultos e sua progênie, determinada pela diferença entre o peso da matéria seca inicial e o peso da matéria seca final, segundo metodologia de Toscano *et al.* (1999).

Análise Nutricional. Foi realizada 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 a umidade através da secagem das amostras em estufa a 130°C utilizando o método 925.10 do Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, compilados por Lane (2000). A análise das cinzas foi realizada pela incineração das amostras em mufla a 550°C pelo método 923.03 da AOAC e os lipídios pela extração com éter de petróleo pelo método 920.85 da AOAC. As proteínas foram determinadas pelo método 920.87 da AOAC e o conteúdo de carboidratos através da subtração de 100 da soma dos quatro compostos descritos (Cecchi 1999). Os resultados obtidos foram expressos em base seca.

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.

Inicialmente extraíram-se as amilases dos insetos, macerando e homogeneizando as larvas de *S. zeamais* com tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5,0), na proporção 1:5 (p/v), durante 10 minutos a 4°C . As suspensões foram centrifugadas a 10.000 g durante 20 min. a 4°C , e o sobrenadante utilizado como fonte de amilase (Blanco-Labra *et al.* 1995).

Posteriormente extraiu-se o inibidor de amilase, presente nos grãos de milho, com 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 2h a 25°C . A seguir, as suspensões foram centrifugadas a 10.000 g durante 20 min. a 4°C e o sobrenadante utilizado como fonte de inibidores

de amilase.

A extração do inibidor de amilase, presente nos grãos de milho, com tampão acetato de sódio 0,1 M, 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 min. 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 desengordurada foi homogeneizada durante 2h 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 10.000 g por 20 min. a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi dialisado contra água destilada, em câmara fria a 4°C. O dialisado foi armazenado como fonte de inibidor de amilase.

A atividade da amilase foi determinada pelo método iodométrico segundo Wilson & Ingledew (1982), modificado para determinação em microplacas de 96 poços por Figueira *et al.* (2003b). Em cada microplaca aplicou-se quatro tratamentos com um volume de reação de 70 µl. O tratamento A consistiu de: 58 µl de tampão de reação pH 5,0 (1,70 g de acetato de sódio 50 mM + 0,29 g de cloreto de sódio 20 mM + 0,004 g de cloreto de cálcio 0,1 mM + 250 ml de água destilada) + 10 µl de etanol ou tampão acetato de sódio + 2 µl de amilase; o tratamento B: 60 µl de tampão de reação + 10 µl de etanol ou tampão acetato de sódio; o tratamento C: 58 µl de tampão de reação + 10 µl de extrato de milho, em etanol ou tampão, contendo inibidores de amilase + 2 µl de amilase e o tratamento D: 60 µl de tampão de reação + 10 µl de extrato de milho, em etanol ou tampão, contendo inibidores de amilase.

Os extratos de milho, em etanol e tampão, contendo os inibidores de amilase foram incubados com 0,2 unidades de amilase durante 30 min. a 25°C. Após esse período aplicou-se 30 µl de solução de amido, em cada poço da microplaca, a qual ficou incubando por 1h a 25°C. Em seguida aplicou-se, em cada poço, 140 µl de uma solução contendo uma parte de solução de iodo (0,125 g de iodo + 1,25 g de iodeto de potássio + 25 ml de água destilada), cinco partes de solução de ácido clorídrico 5 M e 100 partes de água destilada. A seguir, mediu-se a atividade de amilase residual a 650 nm.

Uma unidade de inibidor de amilase (UIA) foi definida como a quantidade de inibidor 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 min. a 25°C, na presença de 0,038 mg de amido (Figueira *et al.* 2003b).

Os resultados dos tratamentos para avaliação da atividade da amilase foram calculados segundo as equações $UA = [0,038 - (A \times 0,038)/B]/0,1$ e $UIA/ml = \{UA - \{0,038 - (C \times 0,038)/D\}/0,1\} \times [1000/Extrato \text{ de IA } (\mu l)]$, onde UA = Atividade amilásica sem interação com o inibidor de amilase (IA) (Controle da atividade amilásica); A = Absorbância a 650 nm correspondente ao controle da amilase; B = Absorbância a 650 nm correspondente ao controle do amido; C = Absorbância a 650 nm correspondente à interação entre a amilase e o IA; D = Absorbância a 650 nm correspondente

ao controle do inibidor de amilase.

A primeira dessas equações foi utilizada para determinar a atividade de amilase inicial sem a interação com o IA e a segunda para determinar a atividade de inibição da amilase expressa em unidades inibidoras de amilase (UIA) por ml de extrato contendo IA. Com o objetivo de se comparar os resultados entre os híbridos, os valores da segunda equação foram expressos em UIA/g de milho em base seca.

Delineamento Experimental e Análise Estatística. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados, com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Realizou-se análise de correlação entre as variáveis que apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey.

Resultados e Discussão

Os híbridos que apresentaram os maiores índices de suscetibilidade, ou seja, os mais suscetíveis ao ataque por *S. zeamais*, foram Pioneer 30 F 98, Dina 766, CD 303, BRS 1001 e IPS G 58; enquanto que os mais resistentes foram IPT 9/202, DOW 8480, CD 3121, 97 HT 129 QPM e P 30 F 33 (Tabela 2). O maior valor de correlação entre o índice de suscetibilidade e o número de insetos emergidos, quando comparado com o valor apresentado da correlação desse mesmo índice com o ciclo biológico, indica que o número de insetos exerceu maior influência sobre o índice.

Os híbridos Pioneer 30 F 98, Dina 766 e BRS 1001 foram os que apresentaram as maiores médias para perda de peso de matéria seca dos grãos, e isso é consequência do maior número de insetos emergidos nesses híbridos (Tabela 2), visto que essas duas variáveis apresentam alta correlação ($r = 0,84$; $P < 0,05$) (Tabela 3). Esses resultados sugerem que esses híbridos sejam os mais suscetíveis e que proporcionaram as melhores condições para a oviposição e/ou desenvolvimento das larvas. O bom desempenho das larvas nesses híbridos é provavelmente devido aos baixos níveis de inibição de amilase apresentados pelos extratos em tampão (Tabela 4).

Os híbridos 97 HT 129 QPM, P 30 F 33 e CD 3121 apresentaram as menores perdas de peso de matéria seca dos grãos, como consequência dos menores números de insetos emergidos (Tabela 2). Os resultados sugerem que esses híbridos sejam os mais resistentes uma vez que afetaram negativamente o comportamento de oviposição e/ou desenvolvimento das larvas. O prolongamento do ciclo biológico dos insetos nos híbridos deve ter sido consequência da presença dos inibidores de amilase solúveis em etanol, visto que as duas variáveis apresentam correlação significativa ($r = 0,61$; $P < 0,05$) (Tabela 3).

Com relação ao conteúdo de proteínas, 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 5). Apesar dessas diferenças, o conteúdo de proteínas não influenciou a resistência dos híbridos ao ataque de *S. zeamais*, visto que o primeiro parâmetro não se correlacionou significativamente com o índice de suscetibilidade (Tabela 3). Segundo Gómez *et al.* (1994), o conteúdo de proteínas,

Tabela 2. Médias (\pm EP) do índice de suscetibilidade, número de *S. 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 de híbridos de milho. Temp.: $27 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $75 \pm 5\%$, fotofase: 12h, (n = 3) para cada variável.

Híbridos	Índice de suscetibilidade	Número de insetos emergidos	Ciclo biológico	Peso dos adultos ^{n.s.}	Perda de peso de matéria seca dos grãos
Pioneer 30 F 98	9,3 \pm 0,17 a	169,3 \pm 4,26 a	54,9 \pm 1,14 ab	2,8 \pm 0,02	6,9 \pm 0,12 b
Dina 766	9,2 \pm 0,22 a	153,6 \pm 2,60 a	54,7 \pm 1,43 ab	2,8 \pm 0,02	6,8 \pm 0,10 b
CD 303	9,0 \pm 0,27 a	107,0 \pm 10,12 b	51,5 \pm 0,53 b	2,9 \pm 0,02	3,1 \pm 0,08 ef
BRS 1001	9,0 \pm 0,11 ab	144,3 \pm 13,20 a	54,9 \pm 0,47 ab	2,9 \pm 0,03	8,6 \pm 0,20 a
IPS G/58	8,9 \pm 0,14 ab	103,6 \pm 9,06 b	51,7 \pm 0,38 b	2,7 \pm 0,02	4,4 \pm 0,25 c
AG 1051	8,1 \pm 0,17 bc	92,6 \pm 7,26 bc	55,7 \pm 0,25 ab	2,7 \pm 0,01	4,1 \pm 0,16 cd
IPT 9/202	7,6 \pm 0,17 cd	81,6 \pm 4,67 bc	57,2 \pm 0,62 a	2,8 \pm 0,06	4,2 \pm 0,19 c
DOW 8480	7,6 \pm 0,22 cd	88,0 \pm 7,81 bc	58,4 \pm 0,86 a	2,7 \pm 0,07	4,1 \pm 0,11 cd
CD 3121	7,4 \pm 0,17 cd	64,3 \pm 2,85 c	55,6 \pm 0,83 ab	2,8 \pm 0,02	2,4 \pm 0,11 f
97 HT 129 QPM	7,3 \pm 0,13 cd	61,3 \pm 2,19 c	56,3 \pm 1,30 a	2,8 \pm 0,11	3,9 \pm 0,09 cd
P 30 F 33	7,0 \pm 0,19 d	58,3 \pm 5,84 c	57,9 \pm 1,23 a	2,8 \pm 0,08	3,4 \pm 0,17 de

As médias de cada variável seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%; ^{n.s.} não significativo

mesmo com diferentes níveis de lisina e triptofano, também não influenciou a resistência de genótipos de milho ao ataque por *S. zeamais*. Baseado nisso, é provável que todos os híbridos utilizados nesta pesquisa apresentem os

requerimentos de aminoácidos básicos para o desenvolvimento dessa espécie, o que explicaria a igualdade de peso dos adultos nos diferentes híbridos (Tabela 2).

Com relação ao conteúdo de carboidratos, observa-se

Tabela 3. Coeficientes de correlação entre nove variáveis, considerando a resistência de onze híbridos de milho a *S. zeamais*.

	N. insetos emergidos	Ciclo biológico	Índice de suscetibilidade	Perda de peso dos grãos (matéria seca)	Un. inibidora de amilase (etanol)	Un. inibidora de amilase (tampão)	Lipídios	Proteínas
Número de insetos emergidos								
Ciclo biológico	-0,33 ^{n.s.}							
Índice de suscetibilidade	0,89	-0,71						
Perda de peso dos grãos (matéria seca)	0,84	-0,09 ^{n.s.}	0,65					
Unidade inibidora de amilase (etanol)	-0,34 ^{n.s.}	0,61	-0,58	0,02 ^{n.s.}				
Unidade inibidora de amilase (tampão)	-0,58	0,22 ^{n.s.}	-0,58	-0,41	0,60			
Lipídios	-0,12 ^{n.s.}	0,46	-0,32 ^{n.s.}	0,12 ^{n.s.}	0,39	0,23 ^{n.s.}		
Proteínas	-0,03 ^{n.s.}	-0,01 ^{n.s.}	0,02 ^{n.s.}	0,05 ^{n.s.}	-0,12 ^{n.s.}	-0,19 ^{n.s.}	0,24 ^{n.s.}	
Carboidratos	0,05 ^{n.s.}	-0,24 ^{n.s.}	0,12 ^{n.s.}	-0,12 ^{n.s.}	-0,04 ^{n.s.}	0,11 ^{n.s.}	-0,62	-0,86

Os valores são significativos pelo teste *t* a 5%; ^{n.s.} não significativo.

Tabela 4. Médias (\pm EP) de inibição de amilase de *S. zeamais*, pelo extrato etanol e tampão, para onze híbridos de milho, (n = 3) para cada variável.

Híbridos	Inibição (UIA/g bs) ¹	
	Extrato etanol	Extrato tampão
97 HT 129 QPM	34,4 \pm 0,67 a	114,1 \pm 2,53 a
IPT 9/202	29,5 \pm 0,68 b	21,8 \pm 1,35 c
P 30 F 33	27,8 \pm 0,41 b	23,6 \pm 1,39 c
CD 3121	27,7 \pm 0,36 b	79,9 \pm 2,21 b
AG 1051	27,5 \pm 0,52 bc	5,8 \pm 0,38 de
Pioneer 30 F 98	26,5 \pm 0,69 bc	1,5 \pm 0,29 e
BRS 1001	26,2 \pm 0,94 bc	8,5 \pm 0,46 d
DOW 8480	24,4 \pm 0,84 cd	6,2 \pm 0,50 de
Dina 766	21,8 \pm 0,54 de	5,9 \pm 0,32 de
IPS G/58	19,2 \pm 0,65 e	1,7 \pm 0,13 e
CD 303	12,3 \pm 0,64 f	5,9 \pm 0,39 de

¹Unidade 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 a 5%.

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 5). Apesar dessas diferenças, o conteúdo de carboidratos também não influenciou a resistência dos genótipos de milho ao ataque por *S. zeamais* visto que o primeiro parâmetro não se correlacionou significativamente com o índice de suscetibilidade (Tabela 3). De acordo com Torres *et al.* (1996), o conteúdo de carboidratos também não influenciou

a resistência de variedades de sorgo ao ataque de *S. oryzae*.

Dos parâmetros nutricionais avaliados, os lipídios foram os que mais influenciaram a resistência dos híbridos ao ataque por *S. zeamais*, visto que seu conteúdo apresentou correlação positiva com o ciclo biológico da praga ($r = 0,46$; $P < 0,05$). Esses resultados indicam que o aumento no conteúdo de lipídios nos grãos ocasiona o aumento do ciclo biológico, o que, conseqüentemente, proporcionará menor número de gerações produzidas por *S. zeamais*, resultando em menor

Tabela 5. Médias (\pm EP) dos componentes nutricionais (em porcentagem) de grãos de onze híbridos de milho utilizados para a avaliação da resistência a *S. zeamais*, (n = 3) para cada variável.

Híbridos	Carboidratos ¹	Proteínas ¹	Lipídios ¹	Cinzas ^{1 n.s.}	Umidade ^{n.s.}
IPS G/58	72,7 \pm 0,32 a	8,11 \pm 0,10 def	4,4 \pm 0,11 d	1,1 \pm 0,03	13,5 \pm 0,09
CD 3121	72,4 \pm 0,18 ab	7,6 \pm 0,13 f	5,4 \pm 0,17 bc	1,1 \pm 0,04	13,3 \pm 0,21
Dina 766	71,8 \pm 0,32 abc	7,9 \pm 0,13 ef	5,7 \pm 0,05 abc	1,0 \pm 0,04	13,3 \pm 0,20
Pioneer 30 F 98	71,4 \pm 0,29 abc	8,4 \pm 0,10 cde	5,4 \pm 0,12 c	1,1 \pm 0,03	13,5 \pm 0,25
AG 1051	71,2 \pm 0,15 bc	8,5 \pm 0,11 cde	5,6 \pm 0,10 abc	1,0 \pm 0,02	13,4 \pm 0,21
97 HT 129 QPM	70,7 \pm 0,25 cd	8,6 \pm 0,10 cd	6,0 \pm 0,10 ab	1,1 \pm 0,03	13,3 \pm 0,24
P 30 F 33	70,6 \pm 0,08 cd	8,7 \pm 0,12 c	5,9 \pm 0,15 abc	1,1 \pm 0,03	13,5 \pm 0,15
DOW 8480	70,5 \pm 0,30 cd	8,4 \pm 0,13 cde	6,1 \pm 0,12 a	1,1 \pm 0,03	13,7 \pm 0,10
CD 303	69,8 \pm 0,28 d	9,9 \pm 0,15 ab	5,6 \pm 0,12 abc	1,1 \pm 0,02	13,4 \pm 0,17
BRS 1001	69,7 \pm 0,10 d	9,4 \pm 0,10 b	6,0 \pm 0,15 ab	1,1 \pm 0,03	13,6 \pm 0,16
IPT 9/202	69,5 \pm 0,34 d	10,3 \pm 0,11 a	5,6 \pm 0,08 abc	1,1 \pm 0,03	13,2 \pm 0,16

¹Base seca

As médias de cada variável seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5%; ^{n.s.} não significativo.

perda de peso de matéria seca dos grãos.

O ciclo biológico também foi correlacionado positivamente com as unidades inibidoras de amilase (UIA) contidas no extrato etanol ($r = 0,61$; $P < 0,05$) (Tabela 3). Isso evidencia que os híbridos com maior teor de UIA em seus grãos retardaram mais o desenvolvimento das larvas, quando comparados com os híbridos com menor teor de UIA e, conseqüentemente, prolongaram mais o ciclo biológico de *S. zeamais*, contribuindo para a redução da emergência de adultos e dos danos.

O índice de suscetibilidade correlacionou-se negativamente com as UIA contidas nos extratos etanol e tampão, em ambos os casos, ($r = -0,58$; $P < 0,05$) (Tabela 3). Esses resultados indicam que à medida que o valor das UIA aumenta também aumenta a resistência dos híbridos a *S. zeamais*.

Não houve diferença significativa para as variáveis umidade e cinzas (Tabela 5). A ausência de diferença estatística para a variável cinzas, indica que não há diferença entre o conteúdo de minerais dos híbridos.

Concluiu-se, portanto, que o conteúdo de proteínas e carboidratos nos grãos não influencia a resistência dos híbridos ao ataque de *S. zeamais*. O conteúdo elevado de lipídios e a presença dos inibidores de amilase prolongam o ciclo biológico do gorgulho-do-milho e, conseqüentemente, aumentam a resistência dos genótipos. Os inibidores de amilase presentes nos extratos de milho solúveis em tampão e etanol correlacionam-se negativa e significativamente com o índice de suscetibilidade, indicando que a presença desses inibidores contribuiu para a resistência dos híbridos de milho a *S. zeamais*.

Agradecimentos

Ao pesquisador do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR-Londrina), Antônio Carlos Gerage, pelo fornecimento dos genótipos de milho. Ao Dr. Jamilton P. dos Santos pela doação dos insetos e valiosas sugestões. À Dra. Lys Mary B. Cândido pela contribuição nas análises nutricionais. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo para o primeiro autor. Este estudo é a contribuição número 1524 do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

Literatura Citada

- Blanco-Labra, A., A. Chagolla-Lopez, N. Martínez-Gallardo & S. Valdes-Rodrigues. 1995.** Further characterization of the 12 kDa protease/alpha-amylase inhibitor present in maize seeds. *J. Food Biochem.* 19: 27-41.
- Blanco-Labra, A. & F.A. Iturbe-Chiñas. 1981.** Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). *J. Food Biochem.* 5: 1-17.
- Cecchi, H.M. 1999.** Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Campinas, Editora da Unicamp, 211p.
- Dobie, P. 1977.** The contribution of the tropical stored products centre to the study of insect resistance in stored maize. *Trop. Stored Prod. Inf.* 34: 7-22.
- Faleiro, F.G., M. Picanço, M.M.M. Miranda, J.M. Araújo & L.S. Saraiva. 1995.** Resistência de 49 populações de milho a *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Bras. Armaz.* 20: 17-21.
- Faroni, L.R.A. 1992.** Manejo das pragas de grãos armazenados e sua influência na qualidade do produto final. *Rev. Bras. Armaz.* 76: 36-43.
- Figueira, E.L.Z., A. Blanco-Labra, A.C. Gerage, E.Y.S. Ono, E. Mendiola-Olaya, Y. Ueno & E.Y. Hirooka. 2003b.** Amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticillioides*. *Plant Dis.* 87: 233-240.
- Figueira, E.L.Z., E.Y. Hirooka, E. Mendiola-Olaya & A. Blanco-Labra. 2003a.** Characterization of a hydrophobic amylase inhibitor from corn (*Zea mays*) seeds with activity against amylase from *Fusarium verticillioides*. *Phytopathology* 93: 917-922.
- Franco, O.L., D.J. Rigden, F.R. Melo & M.F. Grossi de Sa. 2002.** Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. *Eur. J. Biochem.* 269: 397-412.
- Gómez, H.S., J.P. Santos & J.O.G. Lima. 1994.** Resistencia de genotipos de maíz con diferentes características físicas y químicas al ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Colombiana Entomol.* 20: 37-42.
- Ishimoto, M., T. Sato, M.J. Chrispeels & K. Kitamura. 1996.** Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed alpha-amylase inhibitor of common bean. *Entomol. Exp. Appl.* 79: 309-315.
- Lane, R.H. 2000.** Cereal Foods, p.1-58. In: Horwitz, W. (ed.). *Official Methods of Analysis of AOAC International.* 17th. Gaithersburg: AOAC International. v.2.
- Lorini, I. 2001.** Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados. Passo Fundo, Embrapa Trigo, 80p.
- Miranda, M.M.M., J.M. Araújo, M. Picanço, F.G. Faleiro & A.T. Machado. 1995.** Detecção de não-preferência à *Sitophilus zeamais* Mots. em espigas e grãos de 49 populações de milho. *Rev. Bras. Armaz.* 20: 21-25.
- Pueyo, J.J., T.D. Morgan, N. Ameenuddin, C. Liang, G.R. Reeck, M.J. Chrispeels & K.J. Kramer. 1995.** Effects of bean and wheat α -amylase inhibitors on α -amylase activity and growth of stored product insect pests. *Entomol. Exp. Appl.* 74: 237-244.

- Shade, R.E., H.E. Schroeder, J.J. Pueyo, L.M. Tabe, L.L. Murdock, T.J.V. Higgins & M.J. Chrispeels. 1994.** Transgenic pea seeds expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/Technol.* 12: 793-796.
- Titarenko, E. & M.J. Chrispeels. 2000.** cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 979-990.
- Torres, J.B., J.L.D. Saavedra, J.C. Zanuncio & J.M. Waquil. 1996.** Resistance of sorghum to *Sitophilus oryzae* (L.) and its association with varietal parameters. *Int. J. Pest Manag.* 42: 277-280.
- Toscano, L.C., A.L. Boiça Júnior, F.M. Lara & J.M. Waquil. 1999.** Resistência e mecanismos envolvidos em genótipos de milho em relação ao ataque do gorgulho, *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 28: 141-146.
- Valencia, A., A.E. Bustillo, G.E. Ossa & M.J. Chrispeels. 2000.** α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 207-213.
- Waquil, J.S. 1992.** Regras para análise de sementes. Brasília, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 365p.
- Wilson, J.J. & W.M. Ingledew. 1982.** Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amyolytic enzymes. *Appl. Environ. Microb.* 44: 301-307.

Received 01/IX/04. Accepted 07/III/05.
