



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**RESISTÊNCIA DE MILHO E OZONIZAÇÃO NO MANEJO DO CARUNCHO**

*Sitophilus zeamais*

**IANNE LARA DE OLIVEIRA MEIRELES**

**DISSERTAÇÃO**

**DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA – DF**

**FEVEREIRO/2019**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**RESISTÊNCIA DE MILHO E OZONIZAÇÃO NO MANEJO DO CARUNCHO**

*Sitophilus zeamais*

**IANNE LARA DE OLIVEIRA MEIRELES**

**ORIENTADORA: CRISTINA SCHEITINO BASTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA - DF**

**FEVEREIRO/2019**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**RESISTÊNCIA DE MILHO E OZONIZAÇÃO NO MANEJO DO CARUNCHO**

*Sitophilus zeamais*

**IANNE LARA DE OLIVEIRA MEIRELES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

**APROVADO POR:**

---

**CRISTINA SCHEPINO BASTOS, DSc. Fitotecnia – Entomologia/ Universidade de Brasília/ ORIENTADORA/ CPF: 007.369.317-08/ e-mail: cscetino@unb.br**

---

**RAUL ALBERTO LAUMANN, DSc. Ciências Biológicas/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/ EXAMINADOR INTERNO/CPF: 709061571-53/ e-mail: raul.laumann@embrapa.br**

---

**RAUL NARCISO CARVALHO GUEDES, PhD. Entomologia/ Universidade Federal de Viçosa/ AVALIADOR EXTERNO/ CPF: 878.493.216-34/ e-mail: guedes@ufv.br**

**BRASÍLIA-DF, 28 de fevereiro de 2019.**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

MEIRELES, Ianne Lara de Oliveira

“Resistência de milho e ozonização no manejo do caruncho *Sitophilus zeamais*”

Orientação: Cristina Schetino Bastos, Brasília 2019. 60p. Dissertação de mestrado –  
Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

1. Antibiose, antixenose, gorgulho-do-milho, *Zea mays*, causas químicas, causas morfológicas. I. Bastos, C.S. II. Dr<sup>a</sup>.

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

MEIRELES, I.L. de O. Resistência de milho e ozonização no manejo do caruncho *Sitophilus zeamais*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2019, 60 páginas. Dissertação.

## **CESSÃO DE DIREITOS**

**AUTOR:** Ianne Lara de Oliveira Meireles

**TÍTULO:** Resistência de milho e ozonização no manejo do caruncho *Sitophilus zeamais*.

**GRAU:** Mestre

**ANO:** 2019

É concedida à Universidade de Brasília de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Nome: Ianne Lara de Oliveira Meireles

CPF: 032.08.111-00

Endereço: Rua Travessa João Braz, número 75, centro. Luziânia-Goiás. CEP: 72800-080.

Telefone: (61) 996192409 / 36221233 / e-mail: iannelara@gmail.com

## DEDICATÓRIA

*"Se você for tentar, tente de verdade. Caso contrário nem comece. Isso pode significar perder tudo. E talvez até a sua cabeça. Isso pode significar não comer nada por três ou quatro dias. Isso pode significar congelar num banco de praça. Isso pode significar escárnio, isolamento. Isolamento é uma dádiva. Todo o resto é teste da sua resistência. De quanto você realmente quer fazer isso. E você vai fazer isso, enfrentando rejeições das piores espécies. E isso será melhor do que qualquer coisa que você já imaginou. Se você for tentar, tente de verdade. Não há outro sentimento melhor que isso. Você estará sozinho com os deuses. E as noites vão arder em chamas. Você levará a sua vida direto para a risada perfeita. Esta é a única briga boa que existe."*

Henry Charles Bukowski - Trecho do livro Factótum.

*Para a minha mãe Maria Lucia da Silva Ribeiro Oliveira (in memoriam), por todos estes sonhos que a vida não a deixou ver realizados. Para o Douglas, o amor da minha vida, a todos os meus familiares e amigos.*

## AGRADECIMENTOS

À memória da minha mãe, Maria Lucia da Silva Ribeiro Oliveira, por todo o apoio dado a mim em vida. Pelos ensinamentos, boa índole, caráter e educação que permaneceram aqui comigo, com a minha irmã e com todos que ajudou durante esta jornada. Para me tornar a mulher que a senhora foi eu iria precisar de algumas outras vidas, mas pensando bem, nem assim me igualaria. Espero que a senhora esteja num lugar melhor, onde não sinta dor. Nunca vou me conformar por ter lhe perdido tão cedo.

Ao meu pai, Dário Meireles Sobrinho, pelo incentivo de todos os momentos turbulentos e as constantes tentativas de me acalmar, quando me deparei com algumas situações que não poderiam ser revertidas a favor da minha vontade.

Ao meu namorado, Douglas Gonçalves de Paulo, pelo companheirismo, por acompanhar as minhas idas ao laboratório até nos fins de semana e feriados, por toda a ajuda na realização desta pesquisa, pela paciência nos instantes mais difíceis. Por compartilhar as suas metas comigo e por escolher permanecer ao meu lado, mesmo eu sendo a pessoa mais complicada do universo, me dando o devido apoio para não desistir e prosseguir neste caminho. Por cuidar da Nala e da Diana quando eu não podia estar presente. Por ir ao meu encontro todas as vezes em que precisei. Por ir assistir comigo todos os filmes que gostamos e não se importar em ficar até o fim das sessões, em todas as vezes que algumas cenas “foram demais pra mim”.

À professora Dra. Cristina Schetino Bastos, pela oportunidade de ter sido sua orientada nesta etapa, de aprender com uma pessoa que têm um imenso conhecimento científico. Por ter me recebido tão bem desde o ano de 2017 no laboratório e em sua casa. Por me preparar para que eu pudesse ter um crescimento pessoal e profissional. Por todo o esforço, paciência e dedicação ao me orientar e confiar a mim algumas responsabilidades. Por todas as conversas e conselhos. Por ter entendido toda a situação que enfrentei quando mamãe ficou doente.

Aos estagiários da equipe da professora Cristina Schetino Bastos, do Laboratório de Proteção de Plantas, por todas as horas de trabalho dedicadas a mim nas avaliações deste experimento. Pela disposição ao fazer tudo o que eu deveria ter feito quando não pude mais estar presente. Agradeço em especial à Patricia de Jesus dos Santos, por ter me acompanhado em vários lugares para comprar alguns itens necessários à realização dos bioensaios. Agradeço também pelo companheirismo e suporte em todas as disciplinas que fizemos juntas, nos dias de trabalho na fazenda e no laboratório em si. Também expresso a minha gratidão por, todas as vezes em que eu estava triste no laboratório ou na fazenda, a

Renata Suzan e a Ana Caroline irem conversar comigo, me tirando um pouco o foco do pesadelo em que eu estava vivendo. Obrigada.

Ao professor Dr. Ernandes Rodrigues de Alencar, por todo o tempo dedicado a mim durante a orientação da minha dissertação e por ter disponibilizado o espaço do Laboratório de Análise de Alimentos e do Laboratório de Armazenamento e Pré-Processamento de Produtos Agrícolas, para que algumas das avaliações pudessem ser feitas.

Ao Fábio Cavalcanti, Técnico do Laboratório de Proteção de Plantas, pelo suporte durante as avaliações dos diversos ensaios lá instalados. Pela leitura diária de alguns parâmetros, conversas, sugestões e bom senso nas diferentes situações vividas diariamente no mesmo ambiente, para que eu fosse capaz de agir com prudência nas mesmas.

Ao Marcio Antônio Mendonça, antes Técnico do Laboratório de Análise de Alimentos e agora Professor, pelos ensinamentos, amparo, gentileza, ajuda e paciência, durante as avaliações relacionadas à composição química dos grãos de milho lá executadas.

À minha irmã, Iasmim Maria de Oliveira Meireles, pelo companheirismo, ensinamentos, paciência e ajuda para cuidar da Nala e da Diana em todos os momentos em que não pude estar presente. Obrigada por ser a calma e o equilíbrio nesta família. Obrigada por ser melhor que eu em tudo. Em tudo mesmo.

Às minhas tias e madrinhas, Lusmaia, Lucimar, Maria Luisa e Antônia Luisa, por ajudarem a mim e a minha irmã desde o início de nossas vidas. Também vemos em vocês a figura de Mãe. Espero que possamos unir nossas forças para tentar atravessar todo este sofrimento.

Ao namorado da minha irmã, José Eduardo Martins, e à sua família, pela intensa ajuda e força que nos deram nos últimos meses.

À minha avó, Alzira da Silva Ribeiro Oliveira, por toda a preocupação que tem para comigo a datar de meu nascimento. Se tento me alimentar e beber água nas quantidades realmente necessárias, é pela senhora.

À memória do meu avô, João Lino de Oliveira. Se me graduei em Agronomia e continuei neste caminho, é porque mesmo sem ter estudo, eu via tudo o que o senhor plantava “ir pra frente” e achava extraordinário. Obrigada por ter sido um excelente exemplo.

Aos meus amigos, Fernanda Salomão, Matheus Oliveira, Alex Ribeiro e Laira Alves, por entenderem o quanto tenho que me dedicar a Universidade, pela compreensão

nos eventos em que estive ausente. Pela preocupação e força que foram intensificadas e voltadas a mim, a minha família e a todos os que queriam ver mamãe bem, desde novembro.

Às minhas filhas Nala e Diana, “se vocês não nasceram de mim, certamente nasceram para mim”. Me sinto lisonjeada em ser o trenó de vocês em nossos passeios diários.

Pelas pessoas que passaram do patamar de “colegas do laboratório”, Maria Luisa Rech e Luís Gustavo Pereira Coelho de Oliveira. Muito obrigada por existirem, por toda a ajuda, descontração, contribuição nos experimentos, idas ao bar e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos a mim concedida durante o Mestrado.

À Universidade de Brasília por me conceder esta oportunidade de aperfeiçoamento profissional. Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pelo apoio institucional. Por todos os professores que, de algum modo, puderam compartilhar comigo um pouco dos seus conhecimentos e trajetórias.

Por todas e cada uma das pessoas que enviaram boas energias, vibrações e orações em prol da melhora da minha rainha Maria Lucia. Infelizmente, nem sempre a nossa vontade ou conceito de cura, prevalecem.

Aos funcionários da Universidade de Brasília e da Fazenda Água Limpa pela prestação de serviços. Espero que esta pesquisa que não é só minha, mas de muitos que contribuíram para a sua realização, esteja clara para cada um de vocês. Caso contrário, podem perguntar que eu tento explicar/sanar as suas dúvidas.

A todos “os meus”, pelo apoio, por acreditarem em mim, por me apoiarem nesta jornada, me impulsionando até a realização deste trabalho: **Muito Obrigada!**

## WISH YOU WERE HERE

So, so you think you can tell

Heaven from hell?

Blue skies from pain?

Can you tell a green field

From a cold steel rail?

A smile from a veil?

Do you think you can tell

Did they get you to trade

Your heroes for ghosts?

Hot ashes for trees?

Hot air for a cool breeze?

Cold comfort for change?

Did you exchange

A walk on part in the war

For a lead role in a cage?

*How I wish*

*How I wish you were here*

*We're just two lost souls*

*Swimming in a fish bowl*

*Year after year*

*Running over the same old ground*

*What have we found*

*The same old fears*

*Wish you were here\**

### **Wish You Were Here - Roger Waters e David Gilmour (London - 1975).**

*(\*Tradução: Então, então você acha que consegue distinguir/O paraíso do inferno?/ Céus azuis da dor?/ Você consegue distinguir um campo esverdeado/De um trilho de aço gelado?/ Um sorriso de uma máscara?/ Você acha que consegue distinguir?/ Eles fizeram você trocar/Os seus heróis por fantasmas?/ Cinzas quentes por árvores?/ O ar quente por uma brisa fria? O bom conforto por mudanças? Você trocou/Um papel de figurante na guerra/Por um papel principal numa cela?/ Como eu queria/Como eu queria que você estivesse aqui/Nós somos apenas duas almas perdidas/Nadando num aquário/Ano após ano/Correndo sobre o mesmo velho chão/O que nós encontramos?/ Os mesmos velhos medos/Eu queria que você estivesse aqui).*

## RESUMO

*Sitophilus zeamais* é uma praga-chave primária do milho armazenado, atacando os grãos e levando a perdas quantitativas e qualitativas. Esse trabalho objetivou avaliar a resistência de genótipos de milho ao ataque de *S. zeamais* e sua sinergia com o controle proporcionado pelo ozônio. Foram testados 15 genótipos de milho: KWX 1001 a 1010, BR106, 30s31VYHR (contendo as toxinas Bt IP3Aa20 x Cry1Ab x Cry1F), Superdoce, 30s31 (isolinha de 30s31VYHR sem toxinas Bt) e milho Pipoca (BAS 5802). Foram realizados seis bioensaios em arena de 15 escolhas para avaliar a preferência do inseto, sendo três com machos e três com fêmeas. O efeito dos grãos no desenvolvimento dos insetos (emergência, número e peso dos insetos emergidos) foi avaliado em um teste sem chance de escolha por 48 dias. Em ambos os casos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Além disso, foram avaliados os teores de proteínas, cinzas, lipídeos e carboidratos (composição química), tonalidade, croma e luminosidade (atributos da cor) e a circularidade e esfericidade (atributos morfológicos) dos grãos. Os dados de composição química e atributos morfológicos foram empregados em correlações canônicas e de Pearson com as variáveis relativas aos insetos emergidos do teste sem chance de escolha. Essas variáveis e as relativas à cor foram empregadas em correlações canônicas e de Pearson com o número de insetos que escolheram os genótipos e com a porcentagem de grãos danificados ao final dos testes com chance de escolha. O efeito da associação do genótipo BR106 e o ozônio em testes com chance de escolha foi testada mediante exposição de grãos tratados com o gás e oferecido no interior de olfatômetros de quatro escolhas a fêmeas, com três braços contendo grãos tratados e um braço contendo grãos não tratados. A associação do ozônio com os genótipos Superdoce, BR106 e Pipoca em testes sem chance de escolha foi testada mediante exposição da geração F<sub>1</sub> de insetos emergidos dos genótipos a curvas tempo x mortalidade. Os genótipos KWX 1009 e BR106 foram os mais suscetíveis à *S. zeamais* tanto nos testes com quanto nos sem chance de escolha. O aumento no teor proteínas e a redução no teor de carboidratos aumentam a resistência dos grãos ao ataque de *S. zeamais* em testes sem chance de escolha. A redução no teor de lipídeos e de proteínas e na tonalidade da cor e o aumento na luminosidade da cor aumentam a resistência dos grãos ao ataque de *S. zeamais*, em testes com chance de escolha. Grãos fumigados com ozônio são menos preferidos por fêmeas de *S. zeamais* do que grãos não tratados em testes com chance de escolha.

**Palavras-chave:** Antibiose, antixenose, gorgulho-do-milho, *Zea mays*, causas químicas, causas morfológicas.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
<b>3.1 Milho: origem, importância econômica, botânica e características genéticas ...</b>	<b>15</b>
<b>3.2 <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky, 1855: descrição morfológica, biologia, injúria e controle.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Resistência de plantas.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4 Atmosfera modificada com ozônio no controle de pragas de grãos armazenados.....</b>	<b>25</b>
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
<b>4.1 Genótipos.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Insetos.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Padronização das amostras de grãos.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Testes com chance de escolha.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Teste sem chance de escolha.....</b>	<b>29</b>
<b>4.6 Toxicidade do ozônio e a resistência de plantas.....</b>	<b>30</b>
<b>4.6.1 Ensaios com ozônio e os genótipos provenientes dos ensaios sem chance de escolha.....</b>	<b>30</b>
<b>4.6.2 Sinergia entre uso do ozônio e os genótipos provenientes dos ensaios com chance de escolha.....</b>	<b>31</b>
<b>4.7 Caracterização química dos genótipos empregados nos ensaios.....</b>	<b>32</b>
<b>4.8 Análise dos dados.....</b>	<b>33</b>
5. RESULTADOS.....	34
<b>5.1 Ensaios com chance de escolha.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Ensaios sem chance de escolha.....</b>	<b>37</b>
<b>5.3 Correlações entre os testes com e sem chance de escolha e as características físicas, morfológicas e químicas dos grãos.....</b>	<b>39</b>
<b>5.4 Associação do ozônio e genótipos selecionados em ensaios com e sem chance de escolha.....</b>	<b>43</b>
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÕES.....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

## 1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista todo o seu valor nutritivo, potencial produtivo e composição química, o milho (*Zea mays L.*) é um dos mais relevantes cereais cultivados e consumidos em todo o mundo. O mercado movimentado pelo milho, que inclui o milho grão e os seus derivados, consagra-se como uma das parcelas mais importantes do agronegócio a nível mundial (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000). De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento, no Brasil o milho é o segundo grão mais produzido, ficando atrás apenas da soja (BRASIL, 2018a). É uma cultura de aplicação variada tanto para alimentação humana quanto para alimentação animal (CIB, 2018).

Dados de 2016 da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura demonstram que no ranking mundial de produção, o Brasil se encontra em terceiro lugar, ficando atrás dos Estados Unidos e China e sendo sucedido pela Argentina e México, cada um contribuindo com 36,29%, 21,86%, 6,04%, 3,75% e 2,66% da produção mundial, respectivamente. As maiores produtividades são oriundas da Jordânia, Emirados Árabes, Israel, Kuwait e Catar e variam de 40 a 12 ton ha<sup>-1</sup> enquanto a produtividade brasileira é considerada baixa em comparação a esses países, sendo cerca de 4 ton ha<sup>-1</sup> (FAO, 2018).

Nacionalmente, o maior volume de produção é proveniente da região Centro-Oeste, seguida das regiões Sul e Sudeste. Os maiores produtores são Mato Grosso, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais respondendo juntos por mais de 70% da produção nacional. As mais extensas áreas plantadas também se encontram nesses estados, justificando os altos volumes produzidos, sendo que as maiores médias de produtividade são provenientes de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Roraima, variando de 8.152 kg ha<sup>-1</sup> a 6.222,5 kg ha<sup>-1</sup> (BRASIL, 2018b).

Dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) permitem concluir que os Estados Unidos são os maiores exportadores mundiais de milho, respondendo por cerca de 36% da exportação deste cereal. O Brasil ocupa o segundo lugar em termos de volume de exportação, participando com quase 18% do total do milho exportado em todo o mundo (USDA, 2018).

De modo geral, o comportamento preponderante dos consumidores na aquisição de bens está relacionado à oferta do produto no mercado e seus preços. Períodos em que a oferta exceda muito a procura levam à redução de preço com o oposto ocorrendo nas

ocasiões em que a demanda supera a oferta. Nesse sentido, a sazonalidade dos preços dos produtos agrícolas é devida a falta de ajuste entre oferta e demanda e uma das formas que a iniciativa pública, privada ou público-privada tem de ajustar a variabilidade de preços ao longo dos meses do ano-safra é a adoção de políticas de estoques reguladores (POSSAMAI; PESCADOR; MAYERLE, 2014). No caso do milho cujo produto final é o grão, a forma mais comum de armazená-lo é em silos ou armazéns herméticos ou em sacarias em armazéns (FONSECA, 2018).

O Brasil apresenta baixa eficiência no armazenamento e baixo investimento em tecnologias para melhorar a qualidade pós-colheita dos produtos (PEREIRA et al., 2008). Esse fato contribui para que perdas quantitativas e qualitativas sejam comuns na armazenagem do milho. Grande parte dessas perdas é decorrente do ataque de insetos, principalmente daqueles que infestam os grãos antes da colheita e quando ainda estão em campo, a exemplo do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) (PACHECO & PAULA, 1995; LORINI et al., 2010).

Desta forma, quando a armazenagem não é feita de forma adequada, a massa de grãos se torna um ambiente adequado ao desenvolvimento de insetos, que podem se alimentar e ovipositar nos grãos levando à contaminação do produto, causando perda de massa, aumento de temperatura na unidade armazenadora e diminuição do valor do produto (ALVES et al., 2008).

No caso de *S. zeamais* tanto os adultos quanto as larvas se alimentam internamente dos grãos intactos (praga primária) ocasionando perdas de peso e perdas qualitativas, devido à contaminação do produto por fezes e insetos mortos, bem como a possibilidade de infestações secundárias e infecções por microrganismos (PACHECO & PAULA, 1995). O ataque resulta em perda de qualidade reduzindo a utilidade do produto final para a industrialização, consumo humano e alimentação animal (CANEPELLE et al., 2003).

O controle dessa praga é considerado desafiador, principalmente tendo em vista que larvas e adultos infestam o interior do grão (PACHECO & PAULA, 1995) onde a possibilidade de controle e eficácia dos inseticidas com ação de contato é reduzida. Nesse caso, a principal função desses inseticidas é a proteção dos grãos antes que as infestações ocorram (controle preventivo) com o agravante de que muitos dos produtos usados para essa proteção já possuem relato de resistência em populações do inseto, a exemplo de alguns compostos pertencentes à classe dos piretróides e dos organofosforados (RIBEIRO et al., 2003; GUEDES et al., 2006). De maneira semelhante existem relatos de

resistência de populações de *S. zeamais* a produtos fumigantes (de ação curativa) empregados para o seu controle, a exemplo da fosfina (PIMENTEL et al., 2008). Logo, as falhas de controle representam, mais do que uma possibilidade, uma realidade e métodos de controle alternativos devem ser buscados.

A resistência de genótipos de milho ao ataque de *S. zeamais* já foi bastante investigada (MARSARO JR. et al., 2008; TONGJURA; AMUGA; MAFUYA, 2010; YILMAZ et al., 2012; SULEIMAN; ROSENTRATER; BERN, 2015), sendo que algumas dessas causas de resistência já foram inclusive elucidadas (GRACEN JR & GUTHRIE, 1986; CLASSEN et al., 1990; ARNASON et al., 1994; ARNASON et al., 1997; BERGVINSON, 2004; BERGVINSON & GARCÍA-LARA, 2004; GARCÍA-LARA et al., 2004; MELLON & MOREAU, 2004; CARDINAL & LEE, 2005; KRAKOWSKY; LEE; HOLLAND, 2007; MEYER et al., 2007; TONGJURA; AMUGA; MAFUYAI, 2010; NWOSU, 2016).

Até o momento não existem relatos de genótipos comerciais que usados de maneira individual proporcionem controle pleno do inseto. Além disso, a grande maioria dos trabalhos realizados até o momento não busca estudar e associar categorias de resistência ou métodos de controle do manejo integrado de pragas (MIP) que possuem maiores chances de proporcionar controle adequado e manter a viabilidade do método por mais tempo (i.e., reduzir as chances de evolução de resistência) (KENNEDY et al., 1997; PANDA & KHUSH, 1995; PEDIGO, 2002).

O ozônio é uma alternativa bastante atraente frente aos fumigantes convencionais por ser um gás oxidante e excessivamente tóxico para organismos diversos, como fungos, bactérias, vírus e insetos (KHADRE et al., 2001; AN et al., 2007; SOUSA et al., 2008). Seu modo de ação é sobre as membranas celulares em virtude do estresse oxidativo (HOLLINGSWORTH & ARMSTRONG, 2005). Isto é possível devido ao gás ser a forma triatômica de oxigênio com o segundo maior potencial de oxidação entre os elementos químicos existentes, superado unicamente pelo flúor (HILL & RICE, 1982). Devido a alta suscetibilidade e a baixa variabilidade de resposta a este composto não só de populações de *S. zeamais*, mas também de outras espécies-praga de produtos armazenados, o ozônio é um fumigante alternativo promissor (SOUSA et al., 2008). Desta forma, a utilização integrada do ozônio e genótipos resistentes ao ataque de *S. zeamais* pode representar uma alternativa aos métodos de controle vigentes e empregados no manejo da praga.

Além disso, conforme afirmam Gray et al. (2009), o princípio básico que direciona o manejo integrado de pragas (MIP) é o uso de diferentes estratégias e táticas. Nos casos em que esta associação seja sinérgica, poderá resultar na eficácia de táticas combinadas que não funcionariam no controle das pragas caso fossem usadas de maneira isolada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a resistência de diferentes genótipos de milho frente ao ataque de *S. zeamais* e o controle proporcionado pelo ozônio com insetos provenientes de alguns desses genótipos ou expostos aos genótipos tratados com o gás.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar se existem fontes de resistência entre os diferentes genótipos de milho a *S. zeamais*;
- ✓ Avaliar, dentre as causas químicas e morfológicas estudadas, quais serão explicativas da resistência nos genótipos de milho avaliados;
- ✓ Avaliar o controle de *S. zeamais* proporcionado pela associação entre genótipos selecionados e o uso do ozônio.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Milho: origem, importância econômica, botânica e características genéticas**

O milho é uma cultura importantíssima por ser um alimento básico praticamente em todas as regiões onde há o seu cultivo (NWOSU; ADEDIRE; OGUNWOLU, 2015a). Além do papel que desempenha na alimentação humana, é também bastante usado na indústria como matéria-prima para produção de óleo, etanol, açúcar e como fonte principal da produção de amido (XUE et al., 2013; NWOSU; ADEDIRE; OGUNWOLU, 2015b, 2016).

A espécie constitui-se em fonte primordial de calorias na maioria dos países em desenvolvimento (FAO, 2009). Estes fatos aliados à sua adaptabilidade a diferentes condições climáticas, o torna um dos cereais mais cultivados do mundo. Em nível global é a terceira maior cultura de cereais, ficando atrás apenas do trigo e do arroz (DUETE et al., 2009; ADARKWAH et al., 2012). O milho é uma espécie politépica, possuindo extensa variabilidade genética que pode ser exemplificada tendo por base o tipo de endosperma: cerca de 40% dos milhos são amiláceos, por volta de 30% têm grãos duros cristalinos, pouco mais de 20% são dentados, em torno de 10% classificam-se como milho pipoca e 3% são classificados como milho doce (PATERNIANI & CAMPOS, 2005).

O milho é pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. Seu genoma tem tamanho de aproximadamente 2.500 megabases. É uma espécie com número de cromossomos  $x=10$ ,  $2n=2x=20$ , sendo alógama, diploide e de altíssima diversidade molecular (LISCH, 2012). É um cereal americano, já que neste mesmo continente encontram-se seus parentes mais próximos: teosinto e tripsacum. A domesticação do milho aconteceu entre 8.000 e 10.000 anos atrás, demonstrando assim que este se constituía no principal cultivo dos povos maias, astecas e incas. Exteriormente às Américas, não existem informações pictóricas, históricas e até escritas sobre esta cultura, nem mesmo fósseis (PATERNIANI & CAMPOS, 2005). A origem da cultura é atribuída ao México (HALLAUER, 1985).

Dados da Conab da safra 2017/18 (dados conjuntos da primeira e segunda safras), permitem observar que em termos de área cultivada com milho no Brasil, as regiões Centro-Oeste, Sul e Nordeste destacam-se com 7.742,1, 3.478,3 e 2.652,6 mil hectares de milho plantados, respectivamente. Dentro dessas regiões os estados que mais produzem são Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, Paraná e Rio Grande do Sul, Maranhão, Piauí e Bahia respondendo por 74,8% da área cultivada no país. Esses também são os estados de onde provém a maior parte da produção (78,5%). Todavia Santa Catarina, Distrito Federal, Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás são as unidades da federação que alcançam as maiores produtividades de 7.997, 7.199, 6.082, 5.869 e 5.615 Kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Apesar desse fato, a área e a produção do Distrito Federal são mínimas, de 63.600 ha e 457,9 mil toneladas, respectivamente (BRASIL, 2018a).

No panorama mundial, dados da FAO de 2017 (FAO, 2018) demonstram que o Brasil é o terceiro em volume produzido ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China

e antecedendo a Argentina e o México produzindo o equivalente a 384.777.890, 231.837.497, 64.143.414, 39.792.854 e 28.250.783 toneladas, respectivamente, o que equivale a mais de 70% da produção mundial. Em termos de área colhida, China, Estados Unidos, Brasil, Índia e México são os maiores representantes e as maiores produtividades são provenientes da Jordânia, Emirados Árabes, Israel, Kuwait e Catar com valores que variam de 40 a 12 ton ha<sup>-1</sup>, enquanto a produtividade média do Brasil se situa em torno de 4 ton ha<sup>-1</sup> (FAO, 2018).

O Brasil exporta 18% de sua produção (RICHETTI & CECCON, 2009; DUARTE et al., 2011; RICHETTI, 2012) e, desta forma, a maior parte do que é produzido destina-se ao suprimento da demanda interna do país. Durante parte do período compreendido entre a colheita e a comercialização, o produto terá que ser armazenado por período de tempo maior a fim de garantir a disponibilidade de estoques-reguladores de preços agrícolas (POSSAMAI; PESCADOR; MAYERLE, 2014).

Nesse aspecto, a armazenagem agrícola é uma atividade indispensável nas áreas que fazem a mediação entre a produção no campo e o consumo interno e externo (PUZZI, 2000). Desta forma, é fundamental garantir a qualidade dos grãos mantidos nesse ambiente durante o tempo em que lá permaneçam. Uma das formas de depreciação dos produtos armazenados é o ataque de insetos-praga, a exemplo de *S. zeamais* que além das perdas quantitativas causadas pela alimentação direta dos insetos, expressivas perdas qualitativas são observadas, tais como o decréscimo do valor nutricional dos grãos e da qualidade fisiológica das sementes, o que, reduz o seu valor de mercado, chegando até mesmo a condenar lotes de sementes e/ou grãos (CANEPPELE et al., 2003).

### **3.2 *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855: descrição morfológica, biologia, injúria e controle**

A integridade dos grãos armazenados é afetada por fatores abióticos e bióticos. Um dos fatores bióticos que se apresenta como um grande entrave na armazenagem de grãos é a sua suscetibilidade ao ataque de diferentes artrópodes-praga. Conhecido vulgarmente como caruncho-do-milho, o besouro *S. zeamais* pertencente à ordem Coleoptera e à família Curculionidae, é uma praga cada vez mais presente em armazéns acarretando perdas consideráveis ao produto final. É descrito como praga primária, atacando grãos ou sementes intactas. Têm uma vasta gama de hospedeiros alternativos na falta do milho,

dentre os quais se podem citar: trigo, arroz, triticale, cevada e aveia. Infesta os cultivos de maneira cruzada, começando a atacar as culturas ainda no campo e continuando o seu ataque durante o armazenamento (LORINI et al., 2009). O ataque deste inseto é bem severo, de modo que tanto a fase larval quanto a adulta são capazes de danificar o interior dos grãos, consumindo-os de dentro para fora (FONTES; ALMEIDA FILHO; ARTHUR, 2003; TAVARES & VENDRAMIM, 2005).

Em um ambiente como o que predomina durante o armazenamento, os adultos e larvas de *S. zeamais* têm acesso a um recurso alimentar ilimitado e não são perturbados por longos períodos de tempo. Além disso, caso um lote a ser armazenado esteja infestado, ele servirá como inóculo para os lotes subsequentes que vierem a ser armazenados na mesma unidade armazenadora. Adicionalmente, por se tratar de uma praga primária uma das consequências do seu ataque é a ocorrência de pragas secundárias (incapazes de atacar grãos intactos) e de outras pragas que infestam um dos subprodutos do seu ataque, os pós e as farinhas (PACHECO & PAULA, 1995).

Como característica predominante da espécie, a cabeça projeta-se à frente, na forma de rostro curvado, e tal peculiaridade é usada como uma das formas de fazer a sexagem destes insetos, pois nos machos, o rostro é menor e mais grosso e nas fêmeas o rostro é mais comprido e fino, onde se localizam as peças bucais. Além disso, as fêmeas possuem puncturas no rostro regulares, que nunca se tocam, organizadas em linhas. Já nos machos essas puncturas são irregulares e se conectam e não estão organizadas em linhas (HALSTEAD, 1963; LORINI, 2001; PADIL, 2018).

O tamanho dos adultos está entre 2,0 a 3,5 mm de comprimento, apresentando coloração castanho-escuro, com manchas mais claras nas asas anteriores ou élitros (LORINI, 2001). Os ovos são de coloração branco-leitosa e possuem um tamanho aproximado de 0,76 x 0,27 mm (PACHECO & PAULA, 1995). A postura é feita de maneira individualizada nos grãos pelas fêmeas, que após se alimentarem e ovipositarem, fecham esta cavidade com uma secreção gelatinosa (ANTUNES & DIONELLO, 2010). A fêmea tem sua postura inibida em grãos com umidade inferior a 12,5% (EVANS, 1981; ATHIÉ & PAULA, 2002), pois quanto mais seco o grão, maior é a sua dureza acarretando resistência ao ataque (TONGJURA; AMUGA; MAFUYA, 2010).

Após a eclosão dos ovos surgem as larvas que são de cor amarelo-clara, ápodas, apresentam formato de C (curculioniformes), cabeça marrom e tamanho entre 2-3 mm; as pupas são branco-leitosas. O período de oviposição das fêmeas abrange 104 dias, sendo

que elas podem viver até 140 dias e a incubação ocorre entre 3 e 6 dias. A fecundidade média é de aproximadamente 282 ovos por fêmea. O ciclo total, de ovo a adulto, tem duração média de 34 dias, caso o milho seja o hospedeiro (LORINI et al., 2010).

Grãos danificados por *S. zeamais* apresentam decréscimo do seu valor nutricional e taxa de germinação e demais características determinantes da qualidade fisiológica de sementes comprometidas; o peso cai exponencialmente e há um incremento na suscetibilidade à infecção por fungos (CANEPPELE et al., 2003; YUYA et al., 2009).

Há centenas de micotoxinas, produzidas por uma infinidade de fungos filamentosos, capazes de se aproveitar do ataque iniciado por *S. zeamais* para colonizar a massa de grãos. Entretanto, algumas merecem destaque pela sua alta toxicidade e ocorrência em produtos alimentícios (WOLOSHUK & SHIM, 2013). Dentre estas, destaca-se *Aspergillus flavus*, produtor das aflatoxinas, altamente prejudiciais à saúde humana (HELL et al., 2000; FONTES; ALMEIDA FILHO; ARTHUR, 2003). As aflatoxinas são reconhecidas por afetar o fígado de mamíferos, podendo causar intoxicações, além de serem cancerígenas (BETI; PHILLIPS; SMALLEY, 1995).

Ni et al. (2011) mostraram que a herbivoria de insetos afetou a contaminação por aflatoxinas em pré-colheita de milho no sudeste dos Estados Unidos. Os autores observaram que existia uma alta correlação entre a contaminação por aflatoxinas com o número de *S. zeamais* que infestava o produto e também com a presença de grãos descoloridos decorrente do ataque de percevejos.

Trabalhos recentes destacam que as atividades reprodutivas e alimentares de *S. zeamais* podem causar perdas na produção de milho durante a armazenagem de grãos de até 90%, caso medidas de controle não sejam adotadas (NWOSU; ADEDIRE; OGUNWOLU, 2015b; NWOSU et al., 2015).

A principal forma de controle deste inseto é através do uso de inseticidas de contato (ação protetora) e fumigantes (ação curativa) (LORINI et al., 2010). Os produtos de contato registrados para o controle de *S. zeamais* infestando o milho são a bifentrina (piretróide), a fenitrotona e o pirimifós-metílico, ambos organofosforados, e os fumigantes precursores da fosfina (fosfeto de alumínio e magnésio) (BRASIL, 2018c), tornando a possibilidade de rotação de princípios ativos reduzida. Talvez por essa razão, já existam relatos de detecção de resistência em populações de *S. zeamais* a todos esses grupos de inseticidas (RIBEIRO et al., 2003; GUEDES et al., 2006; PIMENTEL et al., 2008; SHADIA & ABD EL-AZIZ, 2011).

Além disso, o uso exagerado e exclusivo destas moléculas pode aumentar os riscos de intoxicação humana e animal e a detecção de resíduos nos alimentos que chegarão à mesa dos consumidores (RIBEIRO et al., 2007).

Outras alternativas ao controle químico e incluídas no manejo integrado da praga incorporam o uso de substratos inertes tais como a terra de diatomáceas (LORINI et al., 2001; MARTINS & OLIVEIRA, 2009), os óleos essenciais (KÉITA et al., 2001; ROEL, 2001; PAULIQUEVIS & FAVERO, 2015), os inseticidas botânicos (RIBEIRO et al., 2017), a aeração (MARTINS; MOTA; FONSECA, 2001), o resfriamento da massa de grãos (RIGUEIRA et al., 2009; QUIRINO et al., 2013), o uso de atmosfera modificada com ozônio (KELLS et al., 2001; ZHANGGUI et al., 2003; ROZADO et al., 2008; SOUSA et al., 2008; ALENCAR et al., 2012) e com CO<sub>2</sub> (SANTOS, 1995; FARONI et al., 2002) ou nitrogênio (ADLER, 1994; NICOLAS & SILLANS, 1989; JAYAS et al., 1991), e a resistência hospedeira (MARSARO JÚNIOR et al., 2008). A aplicabilidade da atmosfera modificada com uso do ozônio e da resistência hospedeira serão abordados adiante em itens específicos por serem temas deste trabalho.

Alguns estudos têm tratado a associação de métodos de controle ou diferentes táticas do MIP como forma de torná-las eficientes em condições em que elas falhariam em proporcionar controle adequado da praga se usadas de maneira isolada (GRAY et al., 2009).

Nesse sentido, Ceruti & Lazzari (2005), concluíram em seu estudo sobre a combinação da aplicação de deltametrina em pó e terra de diatomáceas, que mesmo na menor dosagem de ambos, a integração foi capaz de manter a população de *S. zeamais* em níveis baixos, sem que fosse preciso usar a dosagem total do produto químico, atestando a sinergia proveniente da combinação das duas medidas de controle. De modo semelhante, Luz et al. (2017), observaram sinergia entre o uso de variedades de feijão resistentes por antibiose à *Zabrotes subfasciatus* e o controle químico com um inseticida botânico ou sintético, tendo em vista que esta associação reduziu a oviposição, o número e o peso dos adultos emergidos.

Logo, a integração de diferentes medidas de manejo pode ser uma alternativa interessante no caso dessa praga que dispõe de poucas medidas de controle para que possamos conviver com a mesma sem que haja perdas exorbitantes na produção de grãos.

### 3.3 Resistência de plantas

Tendo em vista a restrita disponibilidade de medidas para o convívio com *S. zeamais*, a busca por genótipos resistentes é de cabal importância para a manutenção e viabilidade do armazenamento de grãos no Brasil.

Um genótipo que tenha resistência a um inseto possui características geneticamente herdáveis (composição genotípica) que fazem com que ele apresente menores danos em relação a outro genótipo considerado suscetível, que não tenha os mesmos atributos, em condições similares de ataque (ROSSETO, 1972; SMITH, 2005).

O uso de genótipos resistentes merece destaque na implementação de programas de manejo integrado de pragas (MIP) tendo em vista que apresenta viabilidade econômica e ambiental, baixo custo ao produtor e praticamente não impacta negativamente o meio ambiente (LARA, 1991; BOIÇA-JUNIOR et al., 2013).

São reconhecidas três categorias de resistência de plantas a insetos (SMITH, 2005), denominadas de mecanismos de resistência inicialmente por Painter (1951): antixenose, antibiose e tolerância.

A resistência do tipo tolerância ocorre quando sob condições de igualdade de infestação por uma praga, um genótipo é danificado de maneira similar a outro, porém, devido à maior capacidade de regeneração de tecidos, emissão de novos perfilhos, ramos e folhas, não haverá queda na quantidade nem tampouco na qualidade da produção (LARA, 1991; BOIÇA-JÚNIOR et al., 2013). Compreende a habilidade do hospedeiro em lidar ou se recuperar do ataque da praga (SMITH, 2005).

A resistência por antibiose se expressa quando algum artrópode, ao se alimentar da planta, sofre algum tipo de efeito adverso percebido em sua biologia, por exemplo: taxa de mortalidade alterada, período de desenvolvimento das diversas fases prolongado, redução do tamanho, peso e menor fertilidade, fecundidade e período de oviposição (LARA, 1991; PEDIGO, 2002). Alguma característica de natureza química, física ou morfológica, se encarregará de provocar o efeito adverso na biologia do inseto (SMITH, 2005).

Por fim, a resistência por antixenose ou não-preferência, decorre quando algum genótipo, por algum motivo é menos preferido que outro, estando em condições iguais de haver o ataque por parte do artrópode-praga, exercendo aqui, um efeito adverso em seu comportamento (SMITH, 2005). Tal artifício funciona inviabilizando parcial ou

totalmente comportamentos de alimentação, abrigo e oviposição (BASTOS et al., 2015). Relaciona-se a características da planta hospedeira que influenciam o inseto e alguns exemplos são: cor, composição da epiderme (presença ou não de tricomas, dureza do grão) e também estímulos químicos, os chamados de semioquímicos, podendo ser favoráveis ou não nesta comunicação inseto-planta.

A resistência a insetos em culturas alógamas, como é o caso do milho, é muitas vezes herdada quantitativamente. O milho é uma cultura com ampla variabilidade genética e de polinização cruzada. As recombinações genéticas acontecem bem mais frequentemente nele do que na maioria dos outros cereais. A ampla recombinação de diferentes genes de resistência no milho pode levar ao acúmulo de vários fatores de resistência em maior frequência do que se verifica em culturas autógamas. A ampla variabilidade genética da cultura pode desfavorecer o desenvolvimento de raças ou biótipos de pragas. Outra característica da resistência a insetos no milho é a natureza múltipla dos mecanismos de resistência e, desta forma, vários fatores de resistência foram identificados para a maioria dos insetos-praga do milho. Insetos ou patógenos expostos a culturas homogêneas cuja resistência é monogênica são mais propensos a desenvolverem biótipos capazes de suplantar a resistência em questão. Todavia, se as pragas estão expostas a uma cultura com ampla variabilidade genética, que utiliza vários genes de resistência para se defender do ataque de pragas, uma série de respostas complexas decorrentes da interação entre a resistência do hospedeiro e os fatores de virulência da própria praga, poderá ser encontrada (GRACEN JR & GUTHRIE, 1986). Face ao exposto, existem grandes chances de que a variabilidade existente entre os genótipos de milho permita selecionar fontes de resistência ao ataque de *S. zeamais*.

Nesse particular, Marsaro Júnior et al. (2008) avaliaram a resistência de alguns híbridos de milho a *S. zeamais* pelo índice de suscetibilidade de Dobie (1977) que leva em conta o número de adultos do inseto emergidos e o tempo médio de desenvolvimento, depois da infestação artificial dos grãos. Os autores verificaram que nos híbridos mais suscetíveis o ciclo biológico do gorgulho foi mais curto, sendo estes mais adequados para alimentação e oviposição do inseto. Estes híbridos suscetíveis permitiram ainda, geração de um número maior de descendentes e também apresentaram um maior grau de danos qualitativos e quantitativos em relação aos híbridos mais resistentes.

Normalmente grãos de milho resistentes ao ataque de *S. zeamais* caracterizaram-se por possuírem atributos morfológicos e bioquímicos causadores da resistência observada.

Dentre as causas bioquímicas, o fortalecimento mecânico da parede celular do pericarpo, que irá se apresentar como barreira física ao ataque da praga e os efeitos tóxicos dos compostos encontrados na camada de aleurona e causadores de antibiose (ARNASON et al., 1997), são reportados. Os principais compostos fitoquímicos envolvidos na manifestação desses efeitos são o ácido trans-ferúlico (FA), o ácido p-coumarico (p-CA) (CLASSEN et al., 1990), vários isômeros dos ácidos diferúlicos (DiFA), ácidos fenólicos (PhA) e proteínas estruturais (glicoproteínas ricas em hidroxiprolina - HRGP) (ARNASON et al., 1994; GARCÍA-LARA et al., 2004; BERGVINSON & GARCÍA-LARA, 2004). Outros autores destacam que os principais compostos causadores de antibiose no milho são amidas de ácido fenólico, tais como a putrescina p-coumaroil-feruloyl (CFP) e a putrescina de diferuloil (DFP) (SEN et al., 1994; BURT, 2003), peroxidases e seus produtos catalíticos (GARCÍA-LARA et al., 2007).

Os ácidos fenólicos simples, diferulados e HRGPs (glicoproteína rica em hidroxiprolina) exprimem fortes correlações negativas com a suscetibilidade dos grãos de milho a *S. zeamais* e correlacionam-se positivamente com a dureza do grão. O conteúdo de amidas também se correlaciona negativamente com a presença de danos nos grãos. Essas correlações negativas indicam que o aumento em cada um desses componentes nos grãos de milho é associado a uma diminuição na suscetibilidade dos grãos, e por consequência, aumento da resistência ao ataque do gorgulho-do-milho. É importante mencionar que as amidas também apresentam atividade inibitória da biossíntese de aflatoxina B1 em *Aspergillus flavus* (MELLON & MOREAU, 2004).

Outros estudos observaram que o conteúdo de fibras, ácidos fenólicos e inibidores de tripsina dos grãos de milhos constituem-se na base da resistência à *S. zeamais* e que o aumento no conteúdo desses compostos é acompanhado da redução na suscetibilidade ao ataque do gorgulho-do-milho. Antagonicamente, o aumento dos teores de proteína, zinco, magnésio, cálcio, sódio, fósforo, manganês, ferro, cobalto e amido aumentaram a suscetibilidade do milho ao ataque da praga (NWOSU, 2016).

Estudos realizados com o objetivo de identificar genes e locos de traços quantitativos (QTL) associados às bases bioquímicas da resistência do grão de milho ao ataque de *S. zeamais* verificaram que os QTL para componentes da parede celular foram associados à resistência do milho à praga e que alguns deles estão agrupados em regiões representativas do genoma da espécie (CARDINAL & LEE, 2005; KRAKOWSKY; LEE; HOLLAND, 2007; MEYER et al., 2007). Assim, os marcadores moleculares

ligados a estes compostos podem vir a ser satisfatórios na seleção assistida por marcadores (MAS) em programas com esse propósito.

Em termos de atributos morfológicos há uma relação entre a dureza e espessura do pericarpo ou do núcleo dos grãos e sementes e a resistência à *S. zeamais*. Bergvinson (2004) observou que é bem mais difícil haver penetração de *S. zeamais* no milho com pericarpo mais espesso e duro e que o milho que continha palhas mais apertadas ou grãos e sementes mais duros, era visivelmente mais resistente a estes insetos. Similarmente, Tongjura, Amuga & Mafuya (2010) constataram que existia uma relação entre o tamanho e o teor de umidade dos grãos de sete variedades de milho testadas e que essa característica influenciava no ataque de *S. zeamais*. Assim, grãos ou sementes de tamanho menor eram conseqüentemente mais duros e compactos e apresentavam menores teores de umidade sendo, portanto, mais resistentes ao ataque de *S. zeamais*. De maneira antagônica, grãos maiores, eram mais macios, apresentando maior umidade e sendo mais facilmente atacados.

Todas essas diferenças contribuem para explicar as alterações no ataque de *S. zeamais* de acordo com o tipo de grão avaliado conforme observado por Suleiman, Rosentrater & Bern (2015) que relataram que apesar de haver crescimento exponencial de *S. zeamais* desenvolvendo-se sobre diferentes tipos de milho, que os tipos Flint (duro) e pipoca se mostram mais resistentes ao ataque da praga em relação ao milho doce e dentado.

Além dos efeitos já descritos, atualmente muitos materiais comerciais incorporam toxinas Bt (da bactéria *Bacillus thuringiensis*) que têm como alvo Lepidopteras-praga. Todavia, existem várias proteínas cry com toxinas que agem sobre diferentes grupos de insetos incluindo dípteros, lepidópteros, himenópteros e coleópteros. A classe Cry3 de proteínas Bt é reconhecida por apresentar toxicidade para larvas de coleópteros (FABRICK et al., 2009; MOSTAFA; VLASÁK; SEHNAL, 2013). Essas proteínas já foram testadas em diversas pragas de grãos armazenados, todavia, não existem relatos de que o controle de *S. zeamais* com o uso dessas proteínas tenha sido efetivo o que pode ser explicado pelo comportamento críptico de suas fases imaturas no interior do grão, dificultando o controle (YILMAZ et al., 2012).

Além disso as proteínas Cry1B e Cry9 que demonstraram alta toxicidade a *Ephestia kuehniella* Zeller e *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), apresentaram toxicidade apenas moderada sobre *Tribolium castaneum* (Herbst)

(Coleoptera: Tenebrionidae). De maneira semelhante, Yilmaz et al. (2012) isolaram uma estirpe de Bt (SY49.1) que se mostrou altamente patogênica a larvas de *E. kuehniella* e *P. interpunctella*. Todavia, ao se testar esta mesma cepa sobre *T. castaneum*, a conclusão foi a de que para causar o mesmo efeito de toxicidade aguda observado para as larvas de Lepidoptera nesta espécie era necessário uma quantidade substancialmente maior da toxina. Desta forma, a expressão dessas toxinas nos genótipos comerciais, mesmo que estejam em concentração abaixo da necessária para causar mortalidade em espécies da ordem Coleoptera, pode apresentar efeitos tóxicos crônicos, compatível com ação de antibiose, conforme verificado por estes autores. Por essas razões, isolinhas contendo ou não estas toxinas também devem ser consideradas e avaliadas em ensaios em que se pretenda buscar resistência a espécies de grãos armazenados que não sejam alvo das toxinas Bt.

As cultivares resistentes podem reduzir a perda de massa de grãos em relação às cultivares suscetíveis em 50 a 87%, compatível com o que já foi verificado em outros trabalhos (GARCÍA-LARA et al., 2007), sendo portanto seu uso altamente recomendado no contexto do MIP.

### **3.4 Atmosfera modificada com ozônio no controle de pragas de grãos armazenados**

O gás ozônio ( $O_3$ ), forma alotrópica e tri-atômica do oxigênio, está entre as principais alternativas ao uso da fosfina em ambientes com atmosfera modificada enriquecidas com o gás, devido a sua ação como agente controlador e forte oxidante que apresenta propriedades inseticidas já demonstradas para insetos que infestam os grãos armazenados (KELLS et al., 2001; ZHANGGUI et al., 2003). O ozônio tem sua eficiência já constatada no controle de insetos-praga de grãos armazenados, na destoxificação de micotoxinas e no controle de microrganismos (ROZADO et al., 2008; SOUSA et al., 2008; ALENCAR et al., 2012).

Além do controle de insetos-praga, segundo Mendez et al. (2003), nenhum efeito negativo foi observado no produto armazenado ozonizado ou seja, nenhuma alteração nutricional foi constatada em um estudo feito com trigo, milho e arroz. O gás pode também ser gerado no próprio local de uso, descartando-se gastos com transporte, manipulação, armazenamento e destinação de embalagens de inseticidas (MENDEZ et al., 2003).

E a despeito dos casos já relatados de resistência de populações de *S. zeamais* aos inseticidas comumente utilizados para o seu controle (RIBEIRO et al., 2003; GUEDES et al., 2006; PIMENTEL et al., 2008), não existem relatos de resistência de populações de *S. zeamais* ao ozônio. Nesse aspecto, Sousa et al. (2008) encontraram uma variabilidade não significativa na toxicidade do ozônio entre as populações de *S. zeamais* expostas ao gás, com todas elas sendo suscetíveis ao ozônio. Sobretudo, houve uma variação significativa na atividade de caminhada entre as populações que foi geralmente reduzida pela exposição ao ozônio. A capacidade do ozônio em diminuir a atividade de caminhar dos insetos significa que seguramente ele será eficaz no controle de pragas de grãos armazenados por limitar a sua capacidade de escapar da exposição (BONJOUR et al., 2011).

Rozado et al. (2008) avaliaram a suscetibilidade de adultos de *S. zeamais* e a qualidade fisiológica de grãos de milho submetidos ao tratamento com ozônio (na concentração de 50 mg Kg<sup>-1</sup>) aplicado em diferentes camadas de grãos e observaram que o sucesso no controle é influenciado pelo período de exposição e pela distribuição do inseto na massa de grãos. Similarmente, Kells et al. (2001) ao estudar a eficácia do ozônio como fumigante na concentração de 50 ppm e direcionado ao controle de *T. castaneum* e de *S. zeamais*, obtiveram eficácia de 92 e 100%, respectivamente, três dias após a aplicação localizada, ou seja, próxima do ponto de injeção. Desta forma os autores concluíram que é altamente provável que sejam necessárias doses mais elevadas e/ou tempos de tratamento mais longos para erradicar estes insetos. Nesse sentido, Hansen, Hansen & Jensen (2013), ao testar a ação de controle do ozônio sobre três espécies de *Sitophilus* observaram que, para que fosse obtido o controle total de todos os estágios internos dessas pragas, foi necessário um tratamento com 135 ppm durante 8 dias.

Em um estudo em que se avaliou a mortalidade de *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus) (Coleoptera: Silvanidae) e *E. kuehniella* infestando figos secos, constatou-se que a concentração de ozônio e o tempo de exposição tiveram influência significativa no tempo letal estimado para estes organismos e que a mortalidade plena de ambos os insetos ocorreu apenas mediante 90 minutos de exposição a uma concentração de 5 ppm de ozônio. Semelhantemente ao que foi descrito anteriormente, o ozônio não apresentou efeito significativo sobre a cor, doçura e firmeza dos figos secos, mas seu aroma foi reduzido em alguns casos (SADEGHI; MOGHADDAM; TAGHIZADEH, 2017).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Genótipos

Foram testados 15 genótipos de milho de diferentes tipos incluindo milho grão, doce e pipoca e contendo ou não toxinas Bt quais sejam: KWX 1001, KWX 1002, KWX 1003, KWX 1004, KWX 1005, KWX 1006, KWX 1007, KWX 1008, KWX 1009, KWX 1010, BR106, 30s31VYHR (contendo as toxinas Bt VIP3Aa20 x Cry1Ab x Cry1F), Superdoce, 30s31 (isolinha de 30s31VYHR sem toxinas Bt) e milho Pipoca (BAS 5802).

Tais genótipos foram cedidos por parceiros para a realização deste trabalho, em que, do KWX1001 ao KWX 1010 foram provenientes do estado da Bahia, o BR106 e o BRS 400 (superdoce) são genótipos comercializados pela Embrapa, o 30s31VYHR (com toxinas Bt) e o 30s31 (isolinha) são genótipos comercializados pela Pioneer e o BAS 5802 é comercializado pela empresa Basso Semillas

A descrição qualitativa da cor e do formato foi feita a partir de medições quantitativas. No caso da cor, ela foi determinada com auxílio de um espectrofotômetro Modelo ColorQuest XE (HunterLab, Reston, Estados Unidos), utilizando amostras dos grãos de maneira não destrutiva e realizando as medições em três sub-amostras de cada genótipo, sendo feitas duas leituras por subamostra. Os dados foram representados como coordenadas  $L$ -,  $a$ - e  $b$ - do sistema de cores de Hunter, onde o  $L$ - representa a luminosidade (os valores variam de 0 a 100, escuro a claro) e os valores de  $a$ - e  $b$ - são os componentes cromáticos que variam de (+) avermelhado ao (-) esverdeado e (+) amarelado a (-) azulado, respectivamente. Os valores de  $a$ - e  $b$ - foram usados para calcular a tonalidade da cor ( $h$ ) e a saturação da cor ou croma ( $C$ ) de acordo com as seguintes equações:  $h = \tan^{-1} (b/a)$ ;  $C = (a^2 + b^2)^{1/2}$  (MASKAN, 2001). No caso do formato, ele foi inferido a partir da medição das três dimensões de amostras de 30 grãos de cada genótipo: largura, comprimento e espessura. Essas medições foram realizadas com paquímetro digital com 0,001 mm de precisão e foram empregadas ainda para o cálculo da circularidade e da esfericidade a partir das equações descritas em Guedes et al. (2011).

## 4.2 Insetos

A espécie *S. zeamais* empregada nos ensaios foi obtida de criação estoque mantida no laboratório de Proteção de Plantas da Universidade de Brasília, Brasília, DF. Os insetos são criados sobre variedade de milho Doce Cristal e mantidos sob condição ambiental em baldes plásticos de 20 litros de capacidade contendo uma abertura recoberta com organza para aeração. Para serem usados nos testes os insetos seguiram os procedimentos de sexagem descritos em Padil (2018) e Haslthead (1963) e baseados na presença de rostro relativamente mais comprido e estreito, contendo puncturas ao longo do mesmo em linhas regulares e sem se tocarem nas fêmeas e mais curto e largo nos machos, com puncturas não organizadas em linhas e sempre tocando umas nas outras. Antes de serem usados em alguns dos testes os insetos foram mantidos sem contato com grãos para alimentação e oviposição por pelo menos 24 horas. Foram usados adultos dos insetos de 1-21 dias de idade, dependendo do ensaio em questão.

## 4.3 Padronização das amostras de grãos

As amostras de grãos livres de infestação foram mantidas em freezer a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  até o início dos ensaios de tal forma a evitar novas infestações. Para que pudessem ser empregadas nos ensaios com os insetos as amostras tiveram seu teor de umidade padronizado para  $13,5 \pm 0,5\%$ , tendo em vista que esta umidade torna o milho mais suscetível ao ataque de insetos e é a umidade que os grãos são normalmente comercializados no país. Para isso, inicialmente as amostras tiveram seu teor de umidade auferido de acordo com a metodologia padrão da ASAE S352.2 (ASAE, 2001), sendo empregadas três repetições de amostras contendo 100 grãos de cada um dos genótipos testados. Em seguida, para uniformizar a umidade dos diferentes lotes de grãos de milho, foi utilizado o método estático em que o equilíbrio higroscópico entre o produto e o ambiente sob condições controladas é atingido sem movimentação do ar (CHEN, 2000; CORRÊA et al., 2005). Desta forma, as amostras foram acondicionadas em tecido permeável (tipo voile) possibilitando que ocorresse a troca de vapor de água e foram colocadas no interior de dessecadores contendo solução salina saturada de NaCl. Os dessecadores contendo as amostras foram mantidos em condição ambiental. A dessorção (retirada de umidade) ou adsorção (adesão de moléculas de um fluido a uma superfície sólida, no caso, adesão da umidade da solução salina aos grãos) foi constatada quando a

umidade de equilíbrio foi atingida. O atingimento de tal umidade foi assegurado por meio de pesagem periódica das amostras e comprovação de que não existia variação na massa após três pesagens consecutivas, sendo observado que a umidade de  $13,5 \pm 0,5\%$  para os grãos de cada um dos 15 genótipos havia sido atingida, expressando seu teor em base úmida.

#### **4.4 Testes com chance de escolha**

Nestes testes foram usados 4 g de cada tratamento (genótipo) avaliado que foram alocados ao acaso em cada uma das 15 posições ocupadas em uma arena construída com recipientes plásticos redondos de 3.500 mL de capacidade em cujo diâmetro foram dispostos os tubos Falcon de maneira equidistante e fixados com auxílio de cola quente e fita veda rosca. Cada arena recebeu então 50 fêmeas e 50 machos de *S. zeamais* de 7 dias de idade, sendo usadas três arenas por bioensaio com fêmeas e machos. Os tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os insetos foram mantidos sem acesso à alimentação por 24 h antes da realização dos ensaios.

O número de insetos encontrado em cada tratamento e os que não estavam sobre nenhum tratamento foi contabilizados decorridos 30, 60, 90, 150, 270, 390, 540, 1.440, 2.880 e 4.320 minutos após o início do bioensaio. Após a última avaliação, os insetos foram descartados e o número de grãos contendo sintomas visíveis de dano físico ou furo característico do ataque de *S. zeamais* e intactos foi contabilizado em cada amostra. Esse número foi usado para o cálculo da porcentagem de grãos danificados através da fórmula: número de grão danificados/número total de grãos\*100.

#### **4.5 Teste sem chance de escolha**

Os tratamentos (15 genótipos) foram testados em um único bioensaio. Durante toda a experimentação, os recipientes foram mantidos em condição ambiental, sendo a temperatura e a umidade relativa mensuradas diariamente e usadas para estimar a variação (média  $\pm$  EPM) no período de experimentação. Os tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições.

Os 5 gramas de cada tratamento avaliado conjuntamente e os 10 casais de *S. zeamais* foram colocados no interior de cada um dos 60 recipientes (15 genótipos x 4 repetições) de vidro transparente de 40 mL de capacidade com tampa plástica de rosca.

Os casais usados na infestação tinham 21 dias de idade e foram mantidos sem contato com alimento por 24 h e após a infestação foram mantidos em contato com os grãos por 14 dias. No décimo quarto dia os adultos foram retirados, sendo contabilizado o número de indivíduos vivos e mortos. Após a retirada dos insetos utilizados para a infestação, a emergência do primeiro adulto da geração F<sub>1</sub> foi avaliada diariamente, sendo anotada a data de emergência, o número e o peso dos insetos emergidos. Esses dados foram usados para o cálculo do total de adultos emergidos e da média ponderada do tempo gasto e peso médio dos indivíduos obtidos em cada tratamento. A partir da emergência do primeiro adulto as avaliações persistiram por 48 dias (pelo fato de haver insetos que podem ultrapassar a média de dias que normalmente levam para se tornarem adultos) tendo em vista que a duração média de ovo a adulto de *S. zeamais* é em torno de 34 dias (ROSSETO, 1972; LORINI et al., 2010).

#### **4.6 Toxicidade do ozônio e a resistência de plantas**

##### **4.6.1 Ensaios com ozônio e os genótipos provenientes dos ensaios sem chance de escolha**

Os genótipos Superdoce, BR106 e Pipoca foram infestados com cerca de 200 adultos de *S. zeamais* que foram mantidos em contato com 100 g de grãos por 14 dias e, após esse período foram eliminados. Os adultos obtidos (F<sub>1</sub>) foram utilizados em testes adicionais com atmosfera modificada com ozônio.

Os insetos assim obtidos foram usados na proporção de 5 g de grãos e cinco adultos de *S. zeamais* por unidade experimental sendo acomodados no interior de sacos de organza de 18,5 cm de comprimento x 14,5 cm de largura que foram destinados a recipientes de vidro de 850 mL de capacidade com tampa adaptada para passagem de ozônio. Foram usados insetos de 21 dias de idade e mantidos sem alimento por 24 h. Os tratamentos assim constituídos foram submetidos à passagem de ozônio gerado pelo método de barreira dielétrica. A concentração usada foi de 5 mg L<sup>-1</sup> e a vazão de 2,0 L min<sup>-1</sup>. Foram empregados quatro recipientes de vidro por tempo de exposição ao gás que foi de 10, 20, 40 e 60 minutos, sendo dispostos no delineamento inteiramente casualizado. Adicionalmente, foi empregado o mesmo tempo de exposição ao ozônio nas testemunhas, submetidas à passagem de oxigênio através de bombinha de aquário e sem contato com nenhum gás, apenas em contato com os genótipos. A mortalidade foi

avaliada após 48 horas e um indivíduo foi dado como morto quando não exibiu resposta ao toque de uma pinça. Cada bioensaio foi repetido duas vezes.

Os dados de mortalidade após 48 horas em função dos tempos de exposição foram corrigidos para a mortalidade média ocorrida nas testemunhas através da fórmula de Schenneider-Orelli (PÜNTENER, 1981):

$$\text{Mortalidade corrigida (\%)} = \left( \frac{M_{\text{trat}} - M_{\text{test}}}{100 - M_{\text{test}}} \right) * 100$$

Em que:  $M_{\text{corrigida}}$ : mortalidade no tratamento corrigida pela testemunha (%);  $M_{\text{trat}}$ : mortalidade no tratamento (%);  $M_{\text{test}}$ : mortalidade na testemunha (%).

#### **4.6.2 Sinergia entre uso do ozônio e os genótipos provenientes dos ensaios com chance de escolha**

O genótipo BR106 foi empregado nos testes. Foram usados 4 g de grão por seringa e uma fêmea de *S. zeamais* de 21 dias de idade por arena que foi mantida sem acesso a alimentação por 24 h.

A exposição dos grãos ao ozônio foi realizada conforme descrito em 5.6.1, com tempo de ozonização de 30 min.. Após a exposição ao gás, os grãos foram acomodados no interior de seringas (10 mL) que permitiram acesso ao olfatômetro de quatro escolhas, que é composto por uma placa de acrílico (16,5 x 16,5 cm) com uma depressão em forma de “X” (corpo com 16,5 cm e cada braço medindo 4,1 cm). Tal categoria de olfatômetro possibilita a medição da repelência ao ozônio impregnado nos grãos que foram acomodados no interior das seringas de vidro (4) conectadas em cada uma das suas 4 possibilidades de escolha com o auxílio de mangueiras de silicone (8 mm de diâmetro total e 4 mm de diâmetro do furo central). Foi formada uma corrente de ar, e para isso foi utilizada uma bomba de aquário com fluxo de 0,8 L min<sup>-1</sup>, fluxo este que foi dividido em 0,2 L min<sup>-1</sup> para cada braço (possibilidade de escolha). Este ar foi carregado para o interior do olfatômetro, passando antes pelo carvão ativado e pela água destilada, sendo filtrado e umidificado. O ar, após adentrar o interior do olfatômetro, foi escoado por meio de uma bomba de sucção posicionada em um orifício no meio do olfatômetro, com um fluxo regulado para 0,4 L min<sup>-1</sup>. Foram realizados testes com seis fêmeas em que os braços do olfatômetro continham a combinação de um genótipo não tratado com o mesmo genótipo tratado com ozônio nos três braços (possibilidades de escolha) remanescentes. O tempo de avaliação foi de 10 minutos e uma fêmea foi considerada não responsiva, caso não

demonstrasse nenhuma reação após 1 minuto. Foram avaliados o tempo (em segundos) para primeira escolha (ao soltar a fêmea no centro do aparato e acionar o cronômetro, isto se refere à qual das 4 possibilidades de escolha/estímulo, cada inseto optou por entrar, primeiramente) e o tempo (em segundos) de residência (ao escolher um dos 4 estímulos, quanto tempo o inseto permaneceu no mesmo).

#### **4.7 Caracterização química dos genótipos empregados nos ensaios**

Na determinação dos teores de carboidratos, cinzas, lipídeos, proteína e umidade dos 15 diferentes genótipos de milho, foram moídos 30 gramas de cada genótipo, submetidos às análises citadas anteriormente, com exceção aos teores de umidade e de cinzas, obtidos a partir dos grãos inteiros.

##### **Teor de umidade**

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico em estufa com circulação forçada de ar a  $103 \pm 2$  °C por 72 horas (ASAE, 2000), com três repetições. Foram utilizados por repetição 2,0 g de grãos inteiros previamente pesados em balança analítica e acondicionados em cadinhos de porcelana. O teor de umidade foi expresso em base úmida.

##### **Teor de proteínas**

Para a quantificação do teor de proteínas, admitiu-se o método de Kjeldahl, conforme a recomendação AOAC (2005), de método 991.22, com três repetições. Utilizou-se 0,3 g de grãos moídos acondicionados em tubos de vidro para destilação de nitrogênio. Adicionou-se 1,0 g de mistura catalítica composta por sulfato de potássio e dióxido de titânio e 3,5 mL de ácido sulfúrico. Procedeu-se a digestão da amostra por 4,0 h a 450°C. Posteriormente foi efetuada a destilação em destilador de nitrogênio modelo TECNAL TE0363 e em seguida a titulação do destilado com HCl 0,1 N. Em função do volume de HCl gasto na titulação, calculou-se o teor de proteínas, adotando-se fator de proteínas igual a 6,25.

### **Teor de lipídeos**

O teor de lipídeos foi estabelecido de acordo com o método Am 5-04 da AOCS (2005), usando-se o extrator de gordura Modelo ANKOM XT15 Extractor (Ankom Technology, Nova Iorque, Estados Unidos), sendo o éter de petróleo (30-70°C, P.A– A.C.S) o solvente, com três repetições. Para cada repetição, pesou-se 1,5 g de grãos moídos acondicionados em bolsa de filtro Modelo ANKOM XT4 para extração de lipídeos com porosidade de 2-3  $\mu\text{m}$ . Em seguida efetuou-se a desidratação das amostras em estufa com circulação forçada de ar a  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  por 3 h. Decorrido esse período, as amostras foram submetidas a extração de lipídeos por 1,0 h. Depois da extração de lipídeos, o solvente residual das amostras foi evaporado em estufa a  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  por 3 h. Então, efetuou-se a pesagem das amostras.

### **Teor de Cinzas**

O método adotado para quantificar o teor de cinzas foi o 945.46 da AOAC (2005), a partir das amostras utilizadas na determinação do teor de umidade, com três repetições. A calcinação ocorreu em mufla a  $600^\circ\text{C}$  por 4,0 h.

### **Teor de carboidratos**

O teor de carboidratos totais presente nas amostras deu-se por diferença, ao subtrair de 100 os valores obtidos para os teores de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas, segundo o método 986.25 da AOAC (2005).

## **4.8 Análise dos dados**

Os dados dos diferentes bioensaios realizados com fêmeas e machos nos testes com chance de escolha foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) por Medidas Repetidas, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey HSD a  $P < 0,05$ . A média do número de insetos escolhendo os diferentes genótipos ao longo dos tempos de avaliação e a porcentagem de grãos danificados em cada bioensaio com chance de escolha foi submetida a ANOVA sendo as médias comparadas pelo teste Tukey HSD a  $P < 0,05$ .

Os dados da curva tempo x mortalidade após exposição ao ozônio foram submetidos à análise de Probit. Além disso, as  $TL_{50}$  foram comparadas dividindo-se o

maior valor pelo menor valor e obtendo-se a razão do tempo letal que possibilita saber se dois valores de TL são significativamente diferentes ou não (isto é, quando o IC a 95% do TL não inclui o valor 1.0 (ROBERTSON et al., 2007). Os dados relativos ao tempo demandado para primeira escolha no olfatômetro e tempo de residência foram comparados por teste de  $\chi^2$  (para verificar se a frequência com que um determinado acontecimento ocorreu se desvia significativamente ou não daquela frequência com que o mesmo era esperado).

Os dados relativos ao teor de proteínas, cinzas, lipídeos e carboidratos, esfericidade e circularidade foram submetidos a análise de correlação canônica, e eventualmente correlação de Pearson, com as variáveis número de insetos emergidos, tempo de emergência e peso dos insetos emergidos dos testes sem chance de escolha a  $P < 0,05$ . A média do número de insetos escolhendo os genótipos nos ensaios com chance de escolha (média dos tempos de avaliação) foi correlacionada com a tonalidade, o croma e a luminosidade por correlação de Pearson e Canônicas a  $P < 0,05$ . Em todos os casos foi usado o programa SAS para as análises (SAS, 2002).

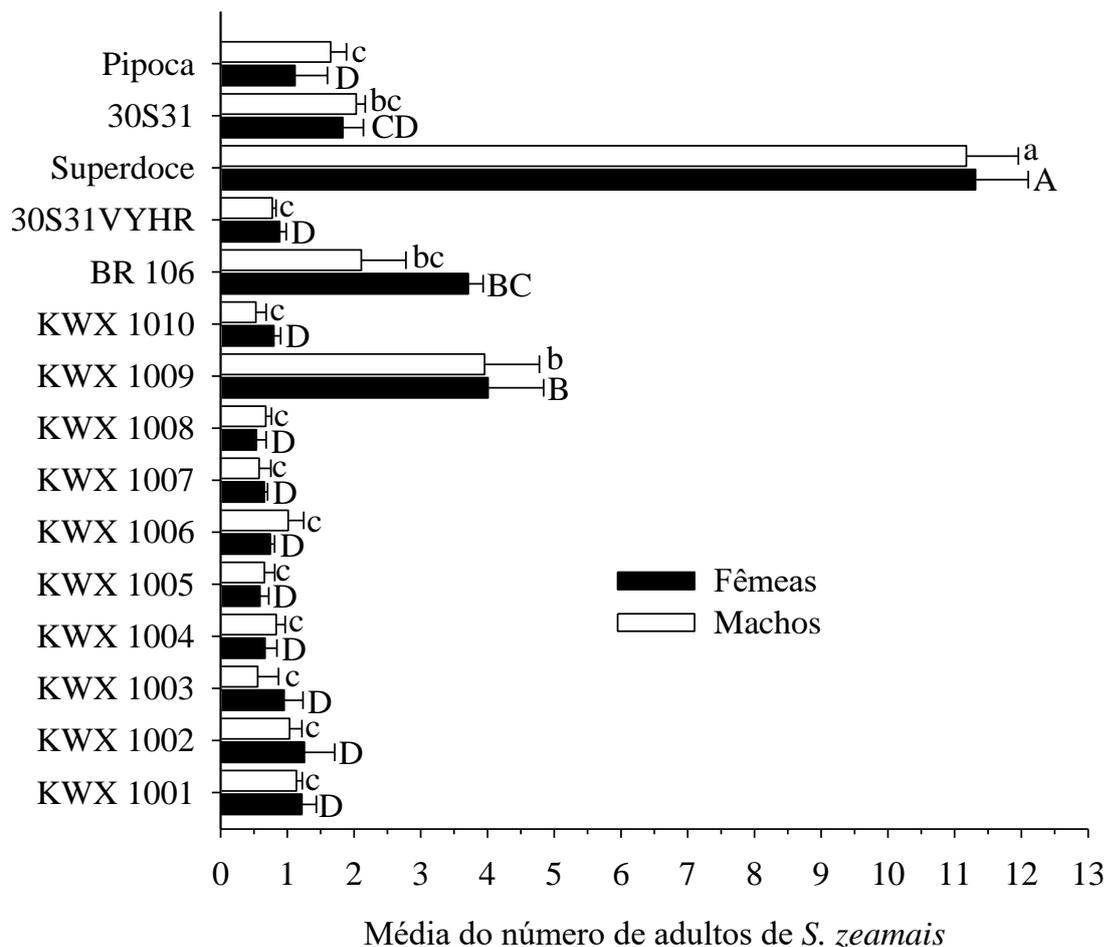
## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Ensaios com chance de escolha**

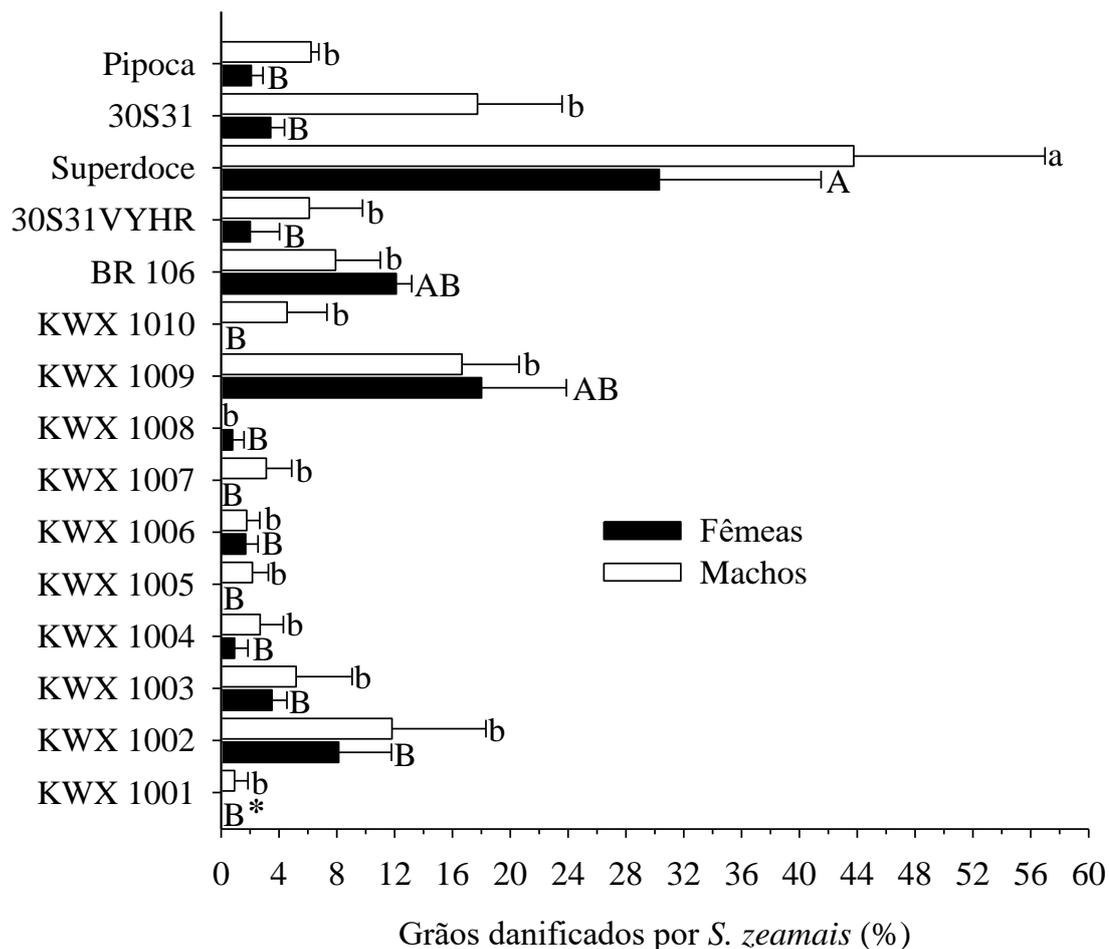
Fêmeas e machos de *S. zeamais* apresentaram preferência pelo genótipo Superdoce em testes com chance de escolha. No caso das fêmeas, os genótipos KWX1009 e BR106 foram intermediariamente preferidos e no caso dos machos os genótipos KWX1009 e 30S31 foram os que apresentaram densidades intermediárias de insetos, com os demais genótipos não diferindo estatisticamente entre si (Figura 1).

Os grãos do genótipo Superdoce foram os mais danificados por fêmeas e machos de *S. zeamais*. O genótipo KWX1009 apresentou porcentagem de grãos danificados por fêmeas intermediária entre os mais e os menos danificados com os demais não diferindo entre si. No caso dos machos os demais genótipos testados não diferiram em relação à porcentagem de grãos danificados entre si (Figura 2).

A única diferença apresentada entre fêmeas e machos foi em relação à porcentagem de grãos danificados do genótipo KWX1001, com os machos danificando significativamente mais esse genótipo do que as fêmeas de *S. zeamais* (Figura 2).



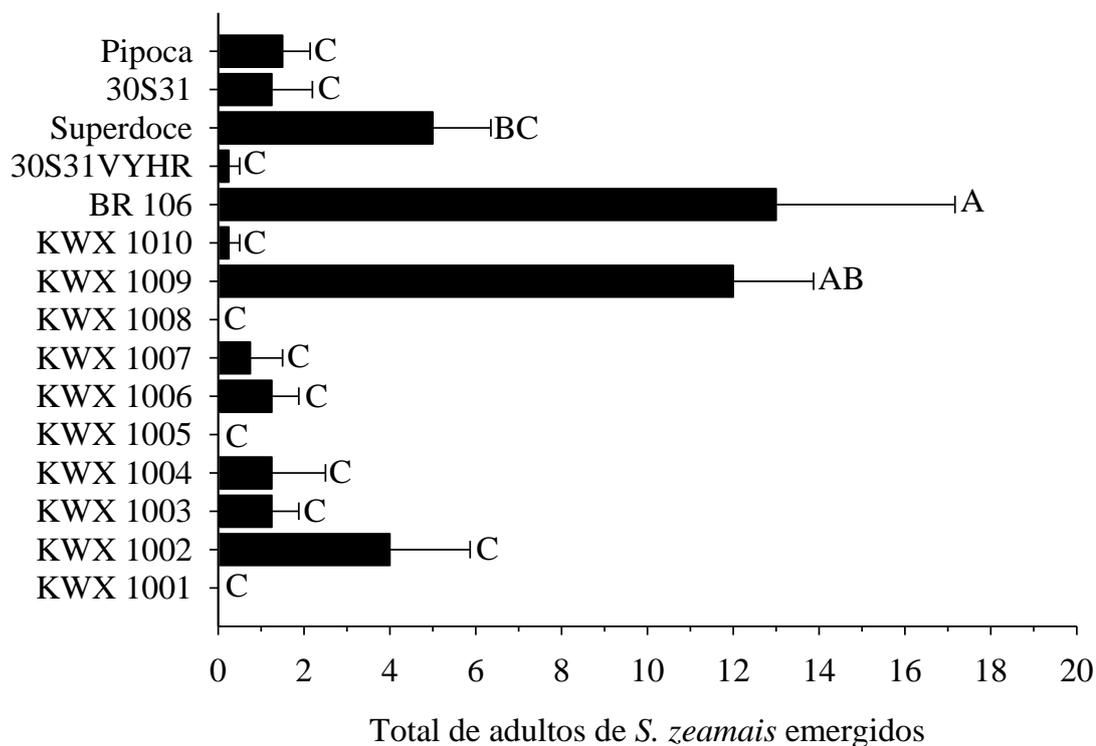
**Figura 1.** Média do número de adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) ± EPM (10 avaliações e 3 bioensaios) em 15 genótipos de milho (*Zea mays* Poaceae) em testes com chance de escolha. \*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula ou minúscula em barras da mesma cor não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey HSD a  $P > 0,05$ .



**Figura 2.** Média (10 avaliações e 3 bioensaios) da porcentagem de grãos danificados por adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) ± EPM em 15 genótipos de milho (*Zea mays* Poaceae) em testes com chance de escolha. \*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula ou minúscula em barras da mesma cor não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey HSD a  $P > 0,05$ . Asteriscos indicam diferença significativa entre fêmeas e machos pelo teste t não pareado a  $P < 0,05$ .

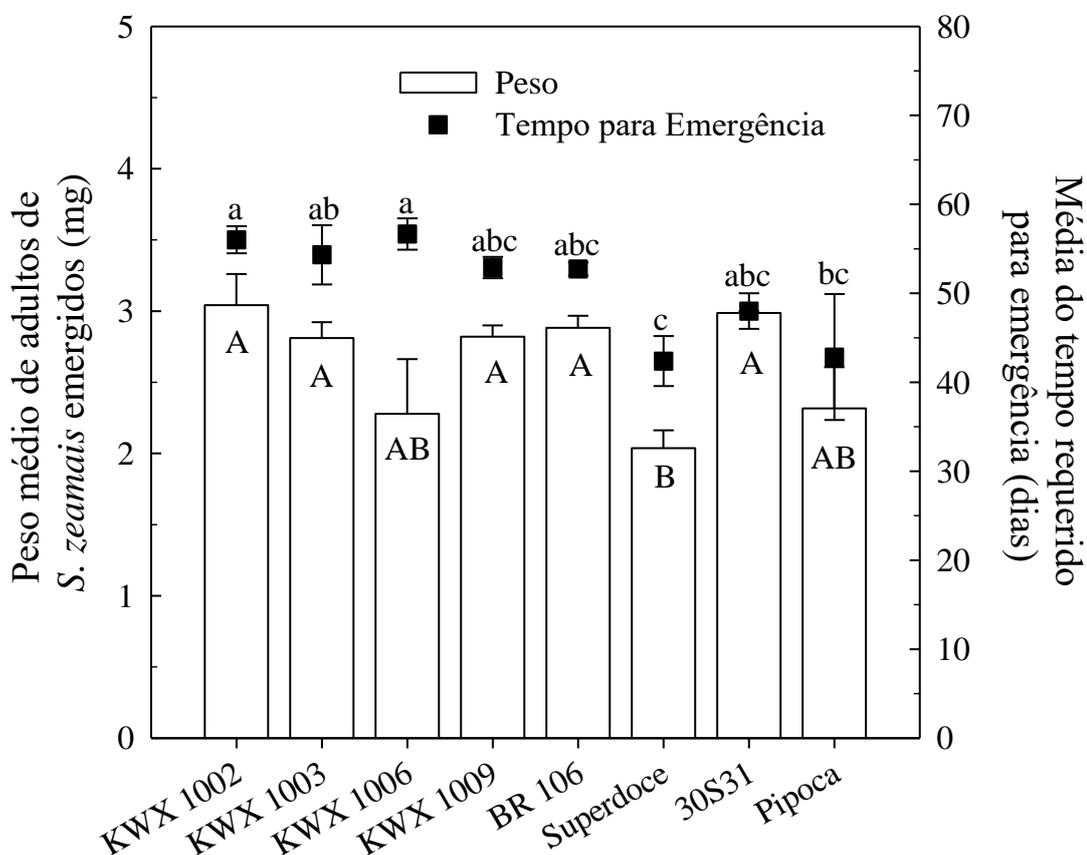
## 5.2 Ensaio sem chance de escolha

Nos ensaios sem chance de escolha, o genótipo que proporcionou a emergência de maior número de adultos de *S. zeamais* foi o BR106 seguido do KWX 1009 e do Superdoce. Os demais genótipos proporcionaram baixa ou nenhuma emergência de insetos, não diferindo estatisticamente entre si (Figura 3).



**Figura 3.** Média do número de adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)  $\pm$  EPM emergidos de 15 genótipos de milho (*Zea mays* Poaceae) em testes sem chance de escolha. Ta. =  $26,06 \pm 0,09$ ; U.R. =  $65,66 \pm 1,12$ . \*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey HSD a  $P > 0,05$ .

Não foi possível registrar o peso e o tempo para emergência em todos os genótipos, tendo em vista não ter ocorrido emergência de insetos em alguns deles. Dentre os genótipos em que houve emergência, os insetos emergidos apresentaram maior peso quando se desenvolveram em KWX 1002, KWX 1003, KWX 1009, BR106 e 30S31, sendo esses valores intermediários em KWX 1006 e Pipoca e mínimo quando os insetos foram provenientes do Superdoce. O maior tempo requerido para emergência ocorreu nos genótipos KWX 1002 e KWX 1006 e o menor no genótipo Superdoce, sendo intermediário nos demais genótipos (Figura 4).



**Figura 4.** Média do peso médio (mg) e do tempo requerido (dias) para emergência de adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)  $\pm$  EPM de 8 genótipos de milho (*Zea mays* Poaceae) em testes sem chance de escolha. Ta. =  $26,06 \pm 0,09$ ; U.R. =  $65,66 \pm 1,12$ . \*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas barras e minúsculas nos quadrados não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey HSD a  $P > 0,05$ .

### 5.3 Correlações entre os testes com e sem chance de escolha e as características físicas, morfológicas e químicas dos grãos

O número de fêmeas e machos que escolheram e danificaram os genótipos em testes com chance de escolha apresentaram correlações canônicas significativas com as características físicas, morfológicas e químicas dos grãos ( $r = 0,91$ ;  $F_{36,121,66} = 4,66$ ;  $P < 0,0001$ ). As características dos insetos que mais contribuíram para as correlações obtidas foram o número de fêmeas e machos no eixo 1 e o número de fêmeas e a porcentagem de grãos danificados no eixo 2, tendo em vista o valor das correlações canônicas. Com exceção do número de fêmeas no eixo 2, todas as correlações foram positivas. Em relação às características dos grãos, as que mais contribuíram para explicar a escolha dos insetos e a porcentagem de grãos danificados foram a tonalidade e o teor de lipídeos no eixo 1 e a luminosidade e o teor de proteínas no eixo 2, sendo todas positivas, com exceção da luminosidade (Tabela 1).

Nas correlações par a par (de Pearson) foram verificadas correlações significativas e positivas entre o número de fêmeas realizando escolha e a tonalidade da cor dos grãos ( $r = 0,76$ ;  $P < 0,0001$ ), o teor de lipídeos ( $r = 0,65$ ;  $P < 0,0001$ ) e o teor de cinzas ( $r = 0,42$ ;  $P = 0,0037$ ) e negativas com a saturação da cor ( $r = -0,40$ ;  $P = 0,0064$ ), o teor de carboidratos ( $r = -0,42$ ;  $P = 0,0045$ ), a esfericidade ( $r = -0,50$ ;  $P = 0,0005$ ) e a circularidade ( $r = -0,37$ ;  $P = 0,0114$ ). O número de machos realizando escolha apresentaram correlações significativas e positivas com a tonalidade ( $r = 0,74$ ;  $P < 0,0001$ ), com o teor de proteínas ( $r = 0,31$ ;  $P = 0,0380$ ), lipídeos ( $r = 0,65$ ;  $P < 0,0001$ ) e cinzas ( $r = 0,41$ ;  $P = 0,0055$ ) e negativas com a saturação da cor ( $r = -0,40$ ;  $P = 0,0064$ ), o teor de carboidratos ( $r = -0,46$ ;  $P = 0,0014$ ), a esfericidade ( $r = -0,46$ ;  $P = 0,0014$ ) e a circularidade ( $r = -0,37$ ;  $P = 0,0133$ ). A porcentagem de grãos danificados por fêmeas de *S. zeamais* apresentou correlações positivas e significativas com a tonalidade ( $r = 0,66$ ;  $P < 0,0001$ ), com o teor de lipídeos ( $r = 0,37$ ;  $P = 0,0128$ ) e de cinzas ( $r = 0,32$ ;  $P = 0,0346$ ) e negativa com a saturação da cor ( $r = -0,45$ ;  $P = 0,0021$ ) e com a esfericidade ( $r = -0,35$ ;  $P = 0,0179$ ). A porcentagem de grãos danificados por machos apresentou correlações significativas e positivas com a tonalidade da cor ( $r = 0,59$ ;  $P < 0,0001$ ) e com o teor de lipídeos ( $r = 0,53$ ;  $P = 0,0002$ ) e negativa com o teor de carboidratos ( $r = -0,31$ ;  $P = 0,0355$ ).

**Tabela 1.** Correlações canônicas (*r*) e coeficientes canônicos (*ca*) entre as variáveis do inseto *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) [Número de fêmeas, número de machos, porcentagem de grãos danificados por fêmeas e porcentagem de grãos danificados por machos] e dos grãos de milho com os quais o inseto foi alimentado [L, h, C, proteínas, lipídeos, cinzas, carboidratos, esfericidade e circularidade] em testes com chance de escolha.

Variáveis	Eixo 1		Eixo 2	
	<i>r</i>	<i>ca</i>	<i>r</i>	<i>ca</i>
Número de fêmeas	<b>0,97</b>	0,20	<b>-0,21</b>	-3,45
Número de machos	<b>0,99</b>	0,99	0,01	2,87
Porcentagem de grãos danificados por fêmeas	0,75	-0,22	-0,13	-0,24
Porcentagem de grãos danificados por machos	0,79	0,002	<b>0,22</b>	0,87
L	-0,15	-0,54	<b>-0,57</b>	-0,54
h	<b>0,78</b>	0,66	-0,24	0,37
C	-0,42	-0,17	0,07	-0,07
Proteínas (%)	0,35	0,002	<b>0,56</b>	1,23
Lipídeos (%)	<b>0,74</b>	0,51	-0,04	0,05
Cinzas (%)	0,44	0,05	-0,23	-0,19
Carboidratos (%)	-0,53	0,24	-0,16	1,13
Esfericidade (%)	-0,51	-0,21	0,44	0,76
Circularidade (%)	-0,42	0,11	0,22	-0,47
Estatísticas	<i>R</i>	0,91	<i>R</i>	0,58
	<i>F</i>	4,66	<i>F</i>	2,09
	<i>df</i>	36	<i>df</i>	24
	<i>P</i>	<0,0001	<i>P</i>	0,0063

Os valores em negrito correspondem as principais contribuições para o eixo significativo ( $P < 0,05$ ). \*L- luminosidade; h - tonalidade da cor e C- saturação da cor ou croma.

As características relativas aos insetos emergidos do ensaio sem chance de escolha [total de adultos emergidos, peso dos adultos emergidos (mg) e médias dos dias requeridos para emergência (dias)] apresentaram correlação canônica significativa com as características químicas [teor de proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos] e morfológicas [esfericidade e circularidade] dos grãos testados ( $r = 0,82$ ;  $F_{18,40} = 2,56$ ;  $P = 0,0066$ ). As características relativas ao peso médio dos adultos emergidos, teor de proteínas e de carboidratos foram especialmente importantes para tais correlações exibindo valores elevados tanto em relação às correlações canônicas quanto para os coeficientes canônicos. Nesse sentido, o peso dos insetos emergidos foi positivamente afetado pelo teor de carboidratos e pela circularidade e negativamente afetado pelo teor de proteínas dos grãos (Tabela 2). Esse comportamento também foi observado nas correlações par a par (correlações de Pearson) em que o peso médio dos insetos apresentou correlação negativa e significativa com o teor de proteínas ( $r = -0,54$ ;  $P = 0,0067$ ). Além disso, o número de dias requeridos para emergência apresentou correlação significativa e negativa com o teor de proteínas ( $r = -0,71$ ;  $P = 0,002$ ), negativa com o teor de cinzas ( $r = -0,58$ ;  $P = 0,0037$ ), positiva com o teor de carboidratos ( $r = 0,79$ ;  $P < 0,0001$ ), positiva com a esfericidade ( $r = 0,44$ ;  $P = 0,0352$ ) e positiva com a circularidade ( $r = 0,64$ ;  $P = 0,0011$ ) dos grãos. O total de insetos emergidos apresentou correlação de Pearson negativa e significativa com o teor de cinzas dos grãos ( $r = -0,42$ ;  $P = 0,0477$ ).

**Tabela 2.** Correlações canônicas (*r*) e coeficientes canônicos (*ca*) entre as variáveis do inseto *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) [total de adultos emergidos, peso dos adultos emergidos (mg) e médias dos dias requeridos para emergência (dias)] e dos grãos de milho com os quais o inseto foi alimentado [proteínas, lipídeos, cinzas, carboidratos, esfericidade e circularidade] em testes sem chance de escolha.

Variáveis	<i>r</i>	<i>ca</i>
Total de adultos emergidos	0,64	0,42
Peso médio dos adultos emergidos (mg)	<b>0,90</b>	<b>0,74</b>
Média dos dias para emergência (dias)	0,42	0,14
Proteínas (%)	<b>-0,94</b>	-0,52
Lipídeos (%)	-0,56	0,58
Cinzas (%)	-0,65	-0,14
Carboidratos (%)	<b>0,89</b>	<b>0,76</b>
Esfericidade (%)	0,35	-0,02
Circularidade (%)	0,70	0,10
Estatísticas	<i>R</i>	0,82
	<i>F</i>	2,56
	<i>df</i>	18
	<i>P</i>	0,0066

Os valores em negrito correspondem as principais contribuições para o eixo significativo ( $P < 0,05$ ).

#### 5.4 Associação do ozônio e genótipos selecionados em ensaios com e sem chance de escolha

Em relação aos ensaios feitos com o inseto no olfatómetro de 4 escolhas, o maior tempo de residência das fêmeas de *S. zeamais* ocorreu nos grãos do genótipo BR106 não tratados com ozônio, ao passo que o tempo para primeira escolha foi menor nos grãos não tratados em comparação aos grãos tratados com ozônio (com ozônio braços 1, 2 e 3) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média do tempo de residência (em segundos) e do tempo para 1ª. escolha (em segundos) de fêmeas de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) em olfatómetro de quatro escolhas contendo milho do genótipo BR106 tratados ou não com ozônio na concentração de 5 mg L<sup>-1</sup> por 30 minutos em comparação ao milho não tratado. Tempo de teste: 10 minutos.

Tratamentos	Tempo de residência (IC a 95%)	Tempo para 1ª. escolha (IC a 95%)
Com Ozônio braço 1	70,8 (-13,98-155,64)	7,8 (-8,96-24,63)
Com Ozônio braço 2	41,5 (-16,94-99,94)	2,2 (-3,40-7,73)
Com Ozônio braço 3	16,0 (-10,84-42,84)	4,5 (-7,06-16,07)
Sem tratamento	412, 8 (301,15-524,51)	1,7 (-1,12-4,45)
$\chi^2$ ; GL; valor de P <sup>1</sup>	481,65; 4; $P < 0,0001$	79,25; 4; $P < 0,0001$

<sup>1</sup>Hipótese de igualdade de 25% de escolha (Proc Freq do SAS); n = 6 insetos – dados parciais. GL- graus de liberdade.

Os valores de TL<sub>50</sub> estimados se ajustaram à distribuição de Probit e foram iguais a 9,98, 13,35 e 8,64 minutos para os genótipos BR106, Superdoce e Pipoca, respectivamente. Desta forma, o tempo requerido para que a geração F<sub>1</sub> de adultos de *S. zeamais* emergidos do milho Superdoce morresse foi 1,33 e 1,54 vezes maior do que o tempo requerido para os insetos emergidos dos milhos BR106 e Pipoca morressem, respectivamente. Apesar desse fato, a única diferença significativa encontrada entre a TL<sub>50</sub> dos genótipos testados e o milho Pipoca tendo em vista o IC a 95% foi entre o milho Pipoca e o Superdoce (Tabela 4), no que pese essa diferença ter sido de pequena magnitude.

**Tabela 4.** Tempo Letal (TL) a 50% dos adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) em diferentes genótipos de milho, 48 horas após a fumigação com o gás ozônio na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup>.

Genótipos	n <sup>(1)</sup>	Coefficiente Angular (±EP) <sup>(2)</sup>	TL <sub>50</sub> <sup>(3)</sup> (IC 95%) min <sup>-1</sup>	G.L. <sup>(4)</sup>	χ <sup>2</sup>	Valor de P	RTL <sup>(5)</sup> IC a 95% <sup>(6)</sup>
BR 106	200	2,56 (±0,52)	9,98 (5,04-14,43)	2	3,31	0,35	1,15 0,75-1,77
Superdoce	200	3,07 (± 0,56)	13,35 (8,00-18,14)	2	1,57	0,45	1,55 1,06-2,25
Pipoca	200	3,60 (±0,84)	8,64 (4,82-11,47)	2	0,83	0,66	1,00

<sup>(1)</sup>Número de insetos testados; <sup>(2)</sup>Coefficiente angular da curva tempo-mortalidade e seu erro padrão (EP); <sup>(3)</sup>Tempo letal (TL) em minutos e seu respectivo intervalo de confiança a 95% (IC 95%); <sup>(4)</sup>Grau de liberdade. <sup>a</sup>RTL foi calculada dividindo-se o maior valor de TL pelo menor. <sup>(6)</sup>Se o IC do RTL a 95% incluir o valor 1,0 então os TL's não são significativamente diferentes.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho permitiram constatar que houve diferenças significativas na resistência dos genótipos à *S. zeamais* tanto em testes com chance de escolha, quanto em testes sem chance de escolha, e a despeito dos insetos testados serem machos ou fêmeas.

O genótipo mais escolhido pelos insetos nos testes com chance de escolha foi o Superdoce. O milho Superdoce (BRS 400) possui características químicas que incluem o alto teor de açúcar no endosperma e o baixo teor de amido (PARENTONI et al., 1990).

Tongjura, Amuga & Mafuya (2010) constataram que grãos ou sementes de tamanho menor são mais duros e compactos e apresentam menores teores de umidade sendo, portanto, mais resistentes ao ataque de *S. zeamais*. De maneira antagônica, grãos maiores, são mais macios, apresentando maior umidade e sendo mais facilmente atacados. Apesar desse fato, a umidade inicial dos grãos no presente trabalho foi homogeneizada de tal modo a não interferir nos resultados, sendo, portanto as diferenças explicadas pelas causas físicas, morfológicas e químicas dos grãos, conforme observado pelo resultado das correlações canônicas e de Pearson.

Por outro lado, Marsaro Júnior et al. (2008) avaliaram a resistência de alguns híbridos de milho a *S. zeamais* e verificaram que nos híbridos mais suscetíveis o ciclo biológico do gorgulho foi mais curto e que esses híbridos permitiram a geração de um maior número de descendentes e apresentaram maior grau de danos qualitativos e quantitativos em relação aos híbridos mais resistentes.

Nesse quesito, no que pese o genótipo Superdoce ter sido o mais preferido pelos insetos em testes com chance de escolha e também ser o mais danificado ao final destes ensaios, o baixo número de insetos emergidos e o menor tempo de emergência requerido pelos insetos nos testes sem chance de escolha provavelmente se relacionam às características morfológicas dos grãos que limitam o desenvolvimento do inseto (poucos circulares e esféricos), tendo em vista que a composição química desses grãos (alto teor de carboidratos em comparação ao teor de proteínas) apresentou correlação positiva com algumas das características biológicas de *S. zeamais* nos testes sem chance de escolha. Além disso, esses grãos apresentaram valores de tonalidade intermediários entre os maiores e os menores valores e baixos valores de luminosidade em comparação aos demais, algo que pode justificar a escolha por esse genótipo em testes com chance de escolha, tendo em vista as correlações positivas e negativas encontradas entre a escolha

feita pelos insetos e a tonalidade e a luminosidade, respectivamente. Já o enriquecimento com carboidratos, pode justificar a maior porcentagem de grãos desse genótipo sendo danificados ao final dos ensaios com chance de escolha (fase em que o inseto já estabeleceu a alimentação), tendo em vista que no que pese os teores de proteínas e lipídeos terem apresentado correlação positiva com a escolha feita pelos insetos nesses testes, este genótipo possui baixos teores desses componentes quando comparado aos demais, não justificando tal resultado.

Desta forma, tendo em vista os resultados dos testes com e sem chance de escolha, os milhos KWX 1009 e BR106 podem ser considerados como os mais suscetíveis em ambos os testes.

Suleiman, Rosentrater & Bern (2015) relataram que apesar de haver crescimento exponencial de *S. zeamais* em diferentes tipos de milho, que os tipos Flint (duro) e pipoca se mostram mais resistentes ao ataque da praga em relação ao milho doce e dentado, algo que está parcialmente de acordo com os resultados do presente trabalho, tendo em vista que o milho pipoca não foi o mais atacado por *S. zeamais*.

Os resultados encontrados no presente trabalho não são coincidentes com os de Nwosu (2016) que observou que os maiores responsáveis pelo incremento da mortalidade de *S. zeamais* desenvolvendo-se em grãos de milho foram os teores dos inibidores de proteinase e inibidores de tripsina e que o aumento nos teores de proteína resultava em aumento no ataque do inseto. Todavia, esses autores apenas descreveram os teores dos componentes químicos dos diferentes genótipos e das variáveis relativas aos insetos, sem, contudo relacioná-los conforme realizado no presente estudo.

Vale destacar que isolinhas possuidoras ou não de toxinas Bt, tais como os genótipos 30s31VYHR e 30s31, apresentaram diferenças tanto na escolha quanto na emergência de adultos de *S. zeamais* com a ausência da toxina condicionando tanto maior escolha quanto maior emergência de adultos. O genótipo 30s31VYHR apresenta as toxinas VIP3Aa20 x Cry1Ab x Cry1F. As proteínas Bt já foram testadas em diversas pragas de grãos armazenados, todavia, não existem relatos de que o controle de *S. zeamais* com o uso dessas proteínas seja efetivo o que pode ser explicado pelo comportamento críptico de suas fases imaturas no interior do grão, dificultando o controle. Além disso, as proteínas que demonstram alta atividade sobre Lepidopteras-praga, apresentam toxicidade apenas moderada sobre Coleópteros (YILMAZ et al., 2012). De todo modo, mesmo a ação moderada dessas toxinas pode causar algum grau de

antibiose sobre os insetos desenvolvendo-se sobre esses grãos, o que pode justificar a menor escolha e emergência de insetos da isolinha contendo toxinas Bt.

Outro fato relevante foi a quase inexistência de diferenças no comportamento de escolha de machos e fêmeas de *S. zeamais*, a despeito dos machos serem capazes de produzir o feromônio de agregação (4S, 5R)-5-hidroxi-4-metil-heptan-3-ona, vulgarmente chamado de “sitophinona”, exercendo também a função sexual ao atrair as fêmeas da espécie (MOREIRA; ZARBIN; CORACINI, 2005; AMBROGI et al., 2009). Desta forma, talvez o tempo requerido para emissão e ação seja maior do que o tempo máximo de avaliação dos bioensaios.

Na análise dos genótipos selecionados e a fumigação com ozônio, observou-se que no caso do genótipo BR106 as fêmeas de *S. zeamais* preferiram os grãos não tratados, mesmo mediante a chance de escolha por grãos tratados ser três vezes maior, apesar da primeira escolha não ter sido por esses grãos. Semelhantemente, insetos emergidos de grãos mais suscetíveis (tais como o genótipo Superdoce) em testes sem chance de escolha, apresentaram tempo letal mediano em relação aos genótipos parcialmente resistentes (tais como o milho Pipoca).

A resistência por antixenose ou não-preferência resulta na alteração parcial ou total dos comportamentos de alimentação, abrigo e oviposição (BASTOS et al., 2015), reduzindo a densidade e a permanência dos insetos sobre os grãos. Desta forma, genótipos que sejam menos preferidos em testes com chance de escolha terão esse efeito potencializado caso alguma outra medida repelente seja usada conjuntamente, como é o caso dos grãos previamente tratados com o gás ozônio.

A antibiose se expressa quando algum artrópode, ao se alimentar da planta, sofre algum tipo de efeito adverso percebido em sua biologia, que se expressa através da taxa de mortalidade alterada, período de desenvolvimento das diversas fases prolongado, redução do tamanho, peso e menor fertilidade, fecundidade e período de oviposição (LARA, 1991; PEDIGO, 2002). A alteração em tais características pode tornar o artrópode mais suscetível à ação de outras táticas de controle, a exemplo do ozônio. Isso justifica o tempo de mortalidade em genótipos parcialmente resistentes ser inferior ao de genótipos suscetíveis, conforme verificado no presente trabalho.

Os resultados do presente trabalho podem sugerir a existência de efeito sinérgico entre o uso de genótipos possuidores de algum nível de resistência e medidas alternativas de controle tais como o gás ozônio empregado com ação repelente ou

fumigadora de *S. zeamais*. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Luz et al. (2017) que observaram efeito sinérgico do uso do controle químico com inseticidas botânicos e genótipos demonstrando algum nível de resistência a *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). No caso de insetos tais como *S. zeamais* em que o esforço de controle via adoção de táticas isoladas não permite o controle efetivo de inseto, a ação conjunta ou integrada de medidas de controle deve proporcionar o controle efetivo do inseto.

Os resultados obtidos são promissores na perspectiva de que a despeito dos casos já relatados de resistência de populações de *S. zeamais* aos inseticidas comumente utilizados para o seu controle (RIBEIRO et al., 2003; GUEDES et al., 2006; PIMENTEL et al., 2008), não existem relatos de resistência de populações de *S. zeamais* ao ozônio. Nesse aspecto, Sousa et al. (2008) encontraram uma variabilidade insignificante na toxicidade do ozônio entre as populações de *S. zeamais* expostas ao gás, com todas elas sendo suscetíveis ao ozônio. Sobretudo, houve uma variação significativa na atividade de caminhada entre as populações que foi geralmente reduzida pela exposição ao ozônio. A capacidade do ozônio em diminuir a atividade de caminhada dos insetos significa que ele é eficaz no controle de pragas de grãos armazenados por limitar a sua capacidade de escapar da exposição (BONJOUR et al., 2011). Esse aspecto associado ao seu poder de repelência e fumigação quando considerado sob a perspectiva de integração com genótipos resistentes devem possibilitar o manejo de pragas de grão armazenados tais como *S. zeamais* através do uso de outras ferramentas até então desconsideradas.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ Os genótipos Superdoce, KWX 1009 e BR106 são os mais preferidos para o ataque de *S. zeamais* em testes com chance de escolha e os genótipos KWX 1009 e BR106 são os mais preferidos nos testes sem chance de escolha;
- ✓ O aumento no teor proteínas aumenta a resistência dos grãos ao ataque de *S. zeamais* em testes sem chance de escolha, apesar de contribuir para sua suscetibilidade em testes com chance de escolha;
- ✓ A redução no teor de carboidratos aumenta a resistência dos genótipos em testes sem chance de escolha;

- ✓ A redução no teor de lipídeos e na tonalidade da cor e o aumento na luminosidade da cor aumentam a resistência dos grãos ao ataque de *S. zeamais*, em testes com chance de escolha;
- ✓ Grãos fumigados com ozônio são menos preferidos por fêmeas de *S. zeamais* do que grãos não tratados em testes com chance de escolha.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADARKWAH, C. et al. Potential of *Lariophagus distinguendus* (Forster) (Hymenoptera: Pteromalidae) to suppress the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) in bagged and bulk stored maize. **Biological control**, v.60, p.175-181, 2012.
- ADLER, C. Carbon dioxide - more rapidly impairing the glycolytic energy production than nitrogen? In: INTERNACIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED-PRODUCT PROTECTION, 6, 1994. Canberra, Wallingford, United Kingdom. **Anais...** Canberra: CAB International, 1994. p.7-15.
- ALENCAR, E.R. et al. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.899-905, 2012.
- ALVES, W.M. et al. Influência do inseto praga *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae) na taxa respiratória e na perda de matéria seca durante o armazenamento de milho. **Engenharia na Agricultura**, v.16, p.260-069, 2008.
- AMBROGI, B. G. et al. Feromônios de agregação em curculionidae (insecta: coleoptera) e sua implicação taxonômica. **Química Nova**, v.32, p.2151-2158, 2009.
- AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY (AOCS). Oficial **Procedures of the American Oil Chemists Society, Approved Procedure Am 5-04, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction**. Urbana: The Society Urbana, 2005. 3p.
- AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS (ASAE). Moisture measurement – unground grain and seeds. In: **Standards**. St. Joseph: ASAE, 2000. 563p.

- AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS. **ASAE standards 2001:** machinery, equipment, and buildings: operating costs. Iowa: Ames, 2001. p.164-226. (ASAE D472-3).
- AN, J. et al. Changes in some quality indexes in fresh-cut green asparagus treated with aqueous ozone and subsequent modified atmosphere packaging. **Journal of Food Engineering**, v.78, p.340-344, 2007.
- ANTUNES, L.E.G.; DIONELLO, R.G. **Bioecologia de *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidae)**. 2010. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_2/Sitophilus/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/Sitophilus/Index.htm). Acesso em: 10 de janeiro de 2017.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18<sup>th</sup>. Ed.. Gaithersburg: AOAC, 2005. 1094p.
- ARNASON, J. T. et al. Variation in resistance of Mexican landraces of maize to maize weevil *Sitophilus zeamais*, in relation to taxonomic and biochemical parameters. **Euphytica**, v.74, p.227-236, 1994.
- ARNASON, J. T. et al. Mechanism of resistance in maize grain to the maize weevil and the larger grain borer. In: MIHM, J.A. (Ed.). **Insect resistant maize: recent advances and utilization**. Proceedings of an international symposium held at the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). Mexico D.F.: CIMMYT, 1997. p.91-95.
- ATHIÉ, I.; PAULA, D. C. **Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação**. 2. ed, São Paulo: Varela, 2002. 244p.
- BASTOS, C.S. et al. Resistência de plantas a insetos: contextualização e inserção no MIP. In: VISOTTO, L.E. et al. (Eds). **Avanços tecnológicos aplicados à pesquisa na produção vegetal**. Viçosa: UFV, 2015. p.32-72.
- BETI, J. A.; PHILLIPS, T. W.; SMALLEY, E. B. Effects of maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on production of aflatoxin B sub (1) by *Aspergillus flavus* in stored corn. **Journal of Economic Entomology**, v.88, p.1776-1782, 1995.
- BERGVINSON, D.J. Opportunities and challenges for IMP in developing countries. In: O. Koul et al. (Eds.) **Integrate pest management potential, constraints and challenges**. London: CAB International. 2004. p.281–312.

- BERGVINSON, D.J.; S. GARCÍA-LARA. Genetic approaches to reducing losses of stored grain to insects and diseases. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.480-485, 2004.
- BOIÇA-JUNIOR, A. L. et al. Atualidades em resistência de plantas a insetos. In: BUSOLI, A. A. et al. (Eds.). **Tópicos em entomologia agrícola – VI**. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, 2013. p.207-224.
- BONJOUR, E.L. et al. Efficacy of ozone against major grain pests in stored wheat. **Journal of Economic Entomology**, v.104, p.308-316. 2011.
- BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, terceiro levantamento**, dezembro de 2017. Disponível em:  
[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18\\_01\\_11\\_14\\_14\\_35\\_dezembro.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_11_14_14_35_dezembro.pdf). Acesso em: 22 de janeiro de 2018a.
- BRASIL. Companhia nacional de abastecimento (CONAB). **Séries históricas**. Disponível em:  
[http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&Pagina\\_objcmsconteudos=3#A\\_objcmsconteudos](http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos). Acesso em: 24 de janeiro de 2018b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Agrofit**: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em:  
[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 11 de janeiro de 2018c.
- BURT, A.J. **Phytochemical mediation of post-harvest insect resistance in tropical maize**. 141f. 2003. Dissertação. (Mestrado em ciências) - University of Ottawa, Ottawa, ON.
- CANEPPELE, M.A.B. et al. Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae) and quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.47, p.625-630, 2003.
- CARDINAL, A.J.; LEE, M. Genetic relationships between resistance to stalk-tunneling by the European corn borer and cell-wall components in maize population B73 x B52. **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.1-7, 2005.

- CERUTI, F. C.; LAZZARI, S.M.N. Combination of diatomaceous earth and powder deltamethrin for insect control in stored corn. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.49, n.4, p.580-583, 2005.
- CLASSEN, D. et al. Correlation of phenolic acid content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the maize weevil in CIMMYT's collection. **Journal of Chemical Ecology**, v.16, p.301-315. 1990.
- Conselho de Informações sobre Biotecnologia (CIB) Guia do milho – tecnologia do campo a mesa. 16p. Disponível em: [http://www.cib.org.br/pdf/guia\\_do\\_milho\\_CIB.pdf](http://www.cib.org.br/pdf/guia_do_milho_CIB.pdf). Acesso em: 7 de janeiro de 2018.
- CHEN, C. A rapid method to determine the sorption isotherms of peanuts. **Journal Agricultural Engineering Research**, v.75, p.401-408, 2000.
- CORRÊA, P. C. et al. Comparação entre os métodos estático e dinâmico na determinação do equilíbrio higroscópico das espigas de milho. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.7, p.153-161, 2005.
- DOBIE, P. The contribution of the tropical stored products centre to the study of insect resistance in stored maize. **Tropical Stored Products Information**, v.34, p.7-22, 1977.
- DUARTE, J. de O. et al. Mercado e comercialização. In: CRUZ, J. C. (Eds.). **Cultivo do milho**. 7.ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 1). Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_7ed/mercado.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_7ed/mercado.htm). Acesso em: 10 de janeiro de 2018.
- DUETE, R. R. C. Viabilidade econômica de doses e parcelamentos da adubação nitrogenada na cultura do milho em Latossolo Vermelho Eutrófico. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, n.1, p.175-181, 2009.
- EVANS, D. E. The biology of stored product Coleoptera. In: AUSTRALIAN DEVELOPMENT ASSISTANCE COURSE ON THE PRESERVATION OF STORED CEREALS, 1. 1981, Canberra. **Anais...** Canberra: CSIRO, 1981. p. 149-185.
- FABRICK, J. et al. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, p.18401-18410, 2009.

- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Post-Harvest Losses Aggravate Hunger. **Media Center-FAO**, Rome, Italy. 2009. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 21 de janeiro de 2018.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **FaoStat**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 24 de janeiro de 2018.
- FARONI, L. R. D'A. et al. Atmosfera modificada no controle das pragas de grãos armazenados. Cap.7.4. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. (Eds.). **Armazenagem de grãos**. Campinas: IBG, 2002. p.463-491.
- FONSECA, M.J de O. **Secagem e armazenamento**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica, Ageitec. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01\\_37\\_168200\\_511158.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_37_168200_511158.html). 2018. Acesso em: 27 de janeiro de 2018.
- FONTES, L.S.; ALMEIDA FILHO, A.J. de.; ARTHUR, V. Danos causados por *Sitophilus oryzae* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, p.303-307, 2003.
- GARCÍA-LARA, S. et al. The role of pericarp cell wall components in maize weevil resistance. **Crop Science**, v.44, p.1560–1567, 2004.
- GARCÍA-LARA, S. et al. Peroxidase activity in maize endosperm associated with maize weevil resistance. **Crop Science**, v.47, p.1125–1130, 2007.
- GRACEN JR, V.E.; GUTHRIE, W. D. Host plant resistance for insect control in some important crop plants, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.4, p.277-29, 1986.
- GRAY, M. E. et al. The IPM paradigm: concepts, strategies and tactics. In: RADCLIFFE, E. B.; HUTCHINSON, W. D.; CANCELADO, R. E. (Eds.). **Integrated pest management: concepts, tactics, strategies and case studies**. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. p.1-10.
- GUEDES, R. N. C. et al. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Physiological Entomology**, v.31, p.30-38, 2006.
- GUEDES, M. A. et al. Caracterização física de grãos de soja utilizando-se processamento digital de imagens. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.13, p.279-294, 2011.

- HALLAUER, A.R. Compendium of recurrent selection methods and their application. **Critical reviews in Plant Sciences**, v.3, p.1-33, 1985.
- HALSTEAD, D. G. H. External sex differences in stored products Coleoptera. **Bulletin of Entomological Research**, v.54, p.119-134, 1963.
- HANSEN, L. S.; HANSEN, P.; JENSEN, K. M. V.; Effect of gaseous ozone for control of stored product pests at low and high temperature. **Journal of Stored Products Research**, v.54, p.59-63, 2013.
- HELL, K. et al. Influence of insect infestation on aflatoxin contamination of stored maize in four agroecological regions in Benin. **African Entomology**, v.8, p.1-9, 2000.
- HILL, A. G.; RICE, R.G. Historical background, properties and applications. Cap. 1. In: RICE, R. G.; NETZER, A. (Eds.). **Handbook of ozone technology and applications**. Vol.1. Michigan: Ann Arbor. 1982. p.1-37.
- HOLLINGSWORTH, R. G.; ARMSTRONG, J. W. Potential of temperature, controlled atmospheres and ozone fumigation to control thrips and mealybugs on ornamental plants for export. **Journal of Economic Entomology**, v.98, 289-298, 2005.
- JAYAS, D.S. et al. Controlled atmosphere storage of grains. **Postharvest News and Information**, v.2, p.422-427, 1991.
- KÉITA, S. M. et al. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v.37, p.339-349, 2001.
- KELLS, S. A. et al. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.37, p.371-383, 2001.
- KENNEDY, G. G. et al. Ecological, agricultural, genetic and commercial considerations in the deployment of insect resistant germplasms. **Environmental Entomology**, v.16, p.327-338, 1997.
- KHADRE, M. A. et al. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, v.66, 1242-1252, 2001.
- KRAKOWSKY, M.D., LEE, M.; HOLLAND, J. B. Genotypic correlation and multivariate QTL analyses for cell wall components and resistance to stalk tunneling by the European corn borer in maize. **Crop Science**, v.47, p.485-490, 2007.
- LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2.Ed. São Paulo; Ícone. 1991. 336p.

- LISCH, D. Regulation of transposable elements in maize. **Current opinion in plant biology**, v.15, p.511-516, 2012.
- LORINI, I. et al. Terra de diatomáceas como alternativa no controle de pragas de milho armazenado em propriedade familiar. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v.2, p.32-36, 2001.
- LORINI, I. et al. Principais pragas e métodos de controle em sementes durante o armazenamento. **Informativo Abrates**. Londrina. v.19, p.21-28, 2009.
- LORINI, I. et al. **Principais pragas e métodos de controle em sementes durante o armazenamento - série sementes**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 12p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 73).
- LUZ, C. E. A. et al. Resistance of important bean genotypes to the Mexican bean beetle [*Zabrotes subfasciatus* (Bohemann)] during storage and its control with chemical synthetic and botanical insecticides. **Australian Journal of Crop Science**, v.11, p.1168-1175, 2017.
- MARSARO JÚNIOR, A.L. et al. 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.
- MARTINS, J.H.; MOTA, A.M.; FONSECA, J.A. Simulation of an automatic controller for stored grain aeration systems. **Engenharia na Agricultura**. v.9, p.55-70, 2001.
- MARTINS, A.L.; OLIVEIRA, N.C. Eficiência da terra de diatomácea no controle do caruncho do feijão *Acanthoscelides obtectus* e o efeito na germinação do feijão. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.2, p.917-920, 2009.
- MASKAN, M. Effect of maturation and processing on water uptake characteristics of wheat. **Journal of Food Engineering**, v.47, p.51-57, 2001.
- MELLON, J.E.; MOREAU, R.A. Inhibition of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by diferuloylputrescine and p-coumaroylferuloylputrescine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.6660-6663, 2004.
- MENDEZ, F. et al. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and performance. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.33-44, 2003.

- MEYER, J.D.F. et al. Quantitative trait loci for maysin synthesis in maize (*Zea mays* L.) lines selected for high silk maysin content. **Theoretical and Applied Genetics**, v.115, p.119-128, 2007.
- MOREIRA, M.A.B.; ZARBIN, P.H.G.; CORACINI, M.D.A. Feromônios associados aos coleópteros-praga de produtos armazenados. **Química Nova**, v.28, p.472-477, 2005.
- MOSTAFA, M.A.M.; VLASÁK, J.; SEHNAL, F. Activities of modified Cry3A-type toxins on the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Applied Entomology**, v.137, p.684-692, 2013.
- NI, X. et al. Spatial Patterns of Aflatoxin Levels in Relation to Ear-Feeding Insect Damage in Pre-Harvest Corn. **Toxins**, v.3, p.920-93, 2011.
- NICOLAS, G.; SILLANS, D. Immediate and latent effects of carbon dioxide on insects. **Annual Review Entomology**, v.34, p.97-117, 1989.
- NWOSU, L.C. et al. Relative susceptibility of 20 elite maize varieties to infestation and damage by the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v.35, p.185-192. 2015.
- NWOSU, L.C.; ADEDIRE, C. O.; OGUNWOLU, E.O. Screening for new sources of resistance to *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) infestation in stored maize genotypes. **Journal of Crop Protection**, v.4, p.277-290. 2015a.
- NWOSU, L.C.; ADEDIRE, C.O.; OGUNWOLU, E.O. Feeding site preference of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) on maize grain. **International Journal of Tropical Insect Science**, v.35, p. 62-68. 2015b.
- NWOSU, L.C.; ADEDIRE, C.O.; OGUNWOLU, E.O. Efficacy of bone charcoal dust of six mammalian species as eco-friendly alternatives to conventional synthetic insecticides in the control of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) infesting stored resistant and susceptible maize cultivars. **Jordan Journal of Agricultural Sciences**, v.12, p.311-320. 2016.
- NWOSU, L.C. Chemical bases for maize grain resistance to infestation and damage by the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Journal of Stored Products Research**, v.69, p.41-50, 2016.
- PACHECO, I.A.; PAULA, D.C. **Insetos de grãos armazenados: identificação e biologia**. Fundação Cargill, Campinas, São Paulo, Brazil, 1995. 229p.

- Plant Biosecurity (PADIL). **Diagnostic methods for rice weevil *Sitophilus oryzae***. Disponível em: <<http://pbt.padil.gov.au/pbt/index.php?q=node/15&pbtID=209>>. Acesso: 26 janeiro 2018.
- PAINTER, R.H. **Insect resistance in crop plants**. New York: MacMillan, 1951. 520p.
- PANDA, N.; KHUSH, G.S. **Host plant resistance to insects**. Wallingford: CAB, 1995. 448p.
- PARENTONI, S.N. et al. **Milho doce**. Informe Agropecuário, v.14, p. 17-22, 1990.
- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Eds.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. p.491-552.
- PAULIQUEVIS, C.F.; FAVERO, S. Atividade insetistática de óleo essencial de *Pothomorphe umbellata* sobre *Sitophilus zeamais*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, p.1192-1196, 2015.
- PEDIGO, L.P. (Eds.). **Entomology and pest management**. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 742p.
- PEREIRA, A.M. de. et al. Influência da temperatura da massa de grãos sobre a toxicidade do ozônio a *Tribolium castaneum*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, p.493-497, 2008.
- PIMENTEL, M.A.G. et al. Resistance of stored-product insects to phosphine. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1671-1676, 2008.
- POSSAMAI, J.P.; PESCADOR, A.; MAYERLE, S.F. Equilíbrio espacial de preços com estoque regulador. **Production**, v. 24, p. 861-871, 2014.
- PÜNTENER, W. **Manual for field trials in plant protection**. 2ed. Basle: Ciba-Geigy, 1981. 205p.
- PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 2000. 666p.
- QUIRINO, J.R. et al. Resfriamento artificial na conservação da qualidade comercial de grãos de milho armazenados. **Bragantia**, v.72, p.378-386, 2013.
- RIBEIRO, B.M. et al. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.21–31, 2003.

- RIBEIRO, L.P. et al. Pós inertes alternativos no controle do gorgulho do milho *Sitophilus Zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, p.719-722, 2007.
- RIBEIRO, A.V. et al. Toxicity of botanical and synthetic formulations to the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v.43, p.167-172, 2017.
- RICHETTI, A. **Viabilidade econômica da cultura do milho safrinha, 2013, em Mato Grosso do Sul**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2012. 11p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Comunicado técnico, 182).
- RICHETTI, A.; CECCON, G. Análise econômica de sistemas de produção de milho safrinha em cultivo consorciado. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 10, 2009, Rio Verde. **Anais...** Rio Verde: ABMS: FESURV, 2009. p. 207-213.
- RIGUEIRA, R.J. de A. et al. Armazenamento de grãos de café cereja descascado em ambiente refrigerado. **Engenharia na Agricultura**, v.17, p.323-333, 2009.
- ROBERTSON, J.L. et al. **Bioassays with arthropods**. Boca Raton: CRC Press, 2007. 199p.
- ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, p.43-50, 2001.
- ROSSETO, C.J. **Resistência de milho as pragas da espiga, *Helicoverpa zea* (Boddie), *Sitophilus zeamais* Motschulsky e *Sitotroga cerealella* (Olivier)**. 1972. 144f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1972.
- ROZADO, A.F. et al. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, p. 282-285, 2008.
- SANTOS, D.S. **Viabilização de atmosfera modificada pelo CO<sub>2</sub> na manutenção das qualidades do milho (*Zea mays* L.) durante o armazenamento**. 1995. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

- SADEGHI, R.; MOGHADDAM, R.M.; TAGHIZADEH, M. Application of ozone to control dried fig pests - *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) and *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) - and its organoleptic properties. **Journal of Economic Entomology**, v.110, p.2052-2055, 2017.
- SAS. **The SAS system**. Version 9.00. Cary: SAS Institute, 2002.
- SEN, A. et al. Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids, and phenolic acid amides in maize kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1879-1883, 1994.
- SHADIA, E.; ABD EL-AZIZ, S.E. Control strategies of stored product pests. **Journal of Economic Entomology**, v.8, p.101-122, 2011.
- SMITH, C.M. **Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches**. Dordrech: Springer, 2005. 423p.
- SOUSA, A.H. et al. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect-pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v.44, p.379-385, 2008.
- SULEIMAN, R.; ROSENTRATER, K. A.; BERN, C.J. Evaluation of maize weevils *Sitophilus zeamais* Motschulsky infestation on seven varieties of maize. **Journal of Stored Products Research**, v.64, p.97-102, 2015.
- SUN, L. et al. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays L.*) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.113, p.103-119, 2013.
- TAVARES, M.A.G.C.; VENDRAMIM, J.D. Bioatividade da Erva-de-Santa-Maria, *Chenopodium ambrosioides L.*, Sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v.34, p.319-323, 2005.
- TONGJURA, J.D.C; AMUGA, G.A.; MAFUYAI, H. Laboratory assessment of the susceptibility of some varieties of *Zea mays* infested with *Sitophilus zeamais*, Motsch. (Coleoptera, Curculionidae) in Jos, Plateau State, Nigeria. **Science World Journal**, v.5, p.55-57, 2010.
- United States Department of Agriculture (USDA). **Grain: world markets and trade**. Disponível em: <http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>. Acesso em: 22 de janeiro de 2018.
- WOLOSHUK, C.P.; SHIM, W.B. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. **FEMS Microbiology Reviews**, v.37, p.94-109, 2013.

- XUE, Y.M. L. et al. Genome wide association analysis for nine agronomic traits in maize under well-watered and water-stressed conditions. **Theoretical and applied genetics**, v.126, p.2587-2596, 2013.
- YILMAZ, S. et al. A novel *Bacillus thuringiensis* strain and its pathogenicity against three important pest insects. **Journal of Stored Products Research**, v.51, p.33-40, 2012.
- YUYA, A. I. et al. Efficacy of combining niger seed oil with malathion 5% dust formulation on maize against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.45, p.67-70, 2009.
- ZHANGGUI, Q. et al. Investigation of the use of ozone fumigation to control several species of stored grain insects. In: INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED-PRODUCT PROTECTION, 8, 2003, York. **Proceedings...** York, 2003. p.846-851.