

COMPATIBILIDADE “IN VITRO” ENTRE DEFENSIVOS ALTERNATIVOS E O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

¹Maisa Fernandes Ribeiro

²Roberta Zani da Silva

1 Estudante do Curso de Engenharia Agrônômica da Fundação Universidade do Tocantins UNITINS.
e-mail: melorycarneiro@hotmail.com

2 Professor do Curso de Engenharia Agrônômica da Fundação Universidade do Tocantins/Unitins.
e-mail: roberta.zs@unitins.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade e os efeitos dos defensivos agrícolas: biofertilizante Vairo modificado, folhas de Nim e urina bovina em diferentes doses, sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. As doses médias utilizadas foram: 2% de urina bovina, 160 g/L de folhas de nim e 20 mL/L do biofertilizante Vairo modificado, usando-os na dose média, a metade e o dobro da mesma. As técnicas utilizadas foram pulverizações antes da inoculação do fungo e mistura na calda. O parâmetro avaliado foi viabilidade de conídios por meio das Unidade Formadora de Colônia (UFC). O biofertilizante no dobro da dose 80ml/L na técnica pulverização dos defensivos antes da inoculação do fungo reduziu significativamente as UFC, a urina bovina reduziu as UFC do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* quando foram misturados na calda durante uma hora nas concentrações de 1, 2 e 4%.

Palavras-chave: Seletividade, Controle microbiano, Toxicidade e Produtos Naturais.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the compatibility and the effects of the agricultural protections: biofertilizer modified Vairo, leaves of Nim and bovine urine in different dose on the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. The used middle dose were: 2 % of bovine urine, 160 g/L of leaves of nim and 20 mL/L of the biofertilizer modified Vairo, using them in the middle shot, the half and the double of same. The used techniques were pulverizations before the inoculation of the fungi and mixture in the product suspension. The evaluated parameter was conidial viability through the Forming Unity of Colony (UFC). The biofertilizer in the double of the dose 80ml/L in the technical pulverization of the protections before the inoculation of the fungus reduced significantly the UFC, the bovine urine reduced the UFC of the fungus entomopatogênico *M. anisopliae* when they were mixed in the syrup during one hour in the 1, 2 and 4 % concentrations.

Keywords: Selectivity, Microbial control, Toxicity and Natural Products.

Introdução

Com o uso intensivo e a aplicação inadequada de produtos químicos, vêm aumentando os problemas ambientais, como a seleção de fitopatógenos, plantas invasoras e insetos pragas resistentes, além de empobrecimento de solo e danos à saúde de produtores e consumidores (KEINATH 1998, DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO 2001, BRANCO et al 2003, ROMAN et al 2004).

A busca por estratégias ecológicas para o controle de pragas e doenças nos sistemas de produção tendem a conciliar as necessidades de manter a propriedade agrícola rentável com o equilíbrio ecológico (FERNANDES; LEITE; MOREIRA, 2008).

Durante esse processo do sistema, as culturas estão suscetíveis ao ataque de pragas e doenças, sendo, portanto, necessária a intervenção com a utilização de produtos para o controle das mesmas. Neste modelo de sistema alternativo de produção opta-se pela utilização de produtos denominados alternativos ou naturais (PENTEADO, 2007; FERNANDES; LEITE; MOREIRA, 2008).

O controle microbiano é uma das práticas mais frequentes, sendo os fungos entomopatogênicos, um dos patógenos mais utilizados, com destaque para *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, devido à fácil produção em larga escala (FARIA et al., 2001).

A ação dos produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos pode variar em função da espécie e linhagem do patógeno, da natureza química dos produtos e das concentrações utilizadas. Estes produtos podem atuar inibindo as Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), o crescimento vegetativo, a conidiogênese e a esporulação dos microorganismos, e até causar mutações genéticas, fatores que podem levar a diminuição da virulência a determinada praga (ROEL, 2001).

As interações entre os fungos entomopatogênicos e os produtos fitossanitários podem ser positivas, quando ocorre

uma ação sinérgica entre o patógeno e o produto; ou negativas, quando ocorre a inibição de um dos componentes do patógeno (ALVES, 1998). Estes produtos, principalmente os fungicidas utilizados no controle de fitopatógenos, inibem em sua grande maioria a germinação dos conídios dos fungos entomopatogênicos diminuindo o potencial de inóculo (SILVA et al., 2005).

Os estudos de compatibilidade entre defensivos e fungos entomopatogênicos têm sido realizados quase na sua totalidade envolvendo produtos químicos, segundo Tanzani, Alves e Setten (2002), Tamai et al. (2002), Gassen et al. (2003), Andaló et al. (2004), Silva e Neves (2005), Silva et. al. (2006), Santos (2008), Barci (2009), Soares (2011), sendo que um número muito reduzido de trabalhos trata da compatibilidade desses microorganismos com defensivos naturais, conforme Gonçalves et al. (2012), Rocha et al. (2012) e Luckmann (2013).

Apesar de algumas pesquisas já terem sido realizadas sobre a compatibilidade destes agentes, novos estudos e produtos surgem no mercado a cada ano e os testes de compatibilidade tornam-se necessários para o sucesso destas técnicas de controle.

Rossi-Zalaf et al.,(2008) acreditam que a associação entre os agentes de controle pode aumentar a eficácia dos produtos e dos agentes biológicos envolvidos, reduzindo os resíduos de agrotóxicos e contribuindo para o manejo adequado de pragas resistentes, podendo resultar em um controle mais eficaz das populações de insetos praga.

Segundo Ferreira (2011), poucos trabalhos avaliando a compatibilidade *in vitro* e *in vivo* de entomopatógenos com produtos químicos sintéticos, incluindo também produtos à base de plantas inseticidas, têm sido relatados.

Dessa maneira, o principal objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da urina de vaca, folhas de nim e do biofertilizante Vairo, sobre a viabilidade do fungo patogênico *Metarhizium anisopliae* em laboratório.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no laboratório de Entomologia da Fundação Universidade do Tocantins Unitins em Palmas, TO. Foram utilizados conídios do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* provenientes do produto comercial de Metarriil®.

Foram testados os seguintes defensivos: biofertilizante Vairo modificado, folhas de nim e urina de vaca, utilizando a dose recomendada, a metade da dose e o dobro da dose recomendada. As doses médias usadas em cada defensivo foram 20 ml do biofertilizante Vairo modificado, 2% de urina bovina e 160g/L das folhas de nim.

As técnicas de contato entre o fungo entomopatogênico e os defensivos foram a pulverização dos defensivos naturais antes da inoculação do fungo e mistura do fungo na calda dos defensivos naturais. O parâmetro utilizado para verificar a compatibilidade entre o fungo e os defensivos foram as unidades formadoras de colônia (UFC).

Pulverização dos defensivos antes da inoculação do fungo: Foram preparadas as caldas dos produtos nas três concentrações em água destilada esterilizada e então pulverizadas em placas de Petri contendo meio BDA que foram colocadas sobre uma superfície medindo 1m² de área utilizando um aplicador manual de jato contínuo. Após a secagem da calda nas placas foi inoculada a suspensão de conídios em toda a área da placa contendo meio de cultura BDA – Batata Dextrose Agar, inoculando 0,1 mL do produto e espalhando com alça de Drigalski.

Mistura do fungo na calda do produto: Os conídios dos fungos foram misturados com a calda dos defensivos nas três concentrações e deixados em repouso por 1 h. Após este período 0,1 mL da mistura de conídios e defensivos foi espalhada em toda a área da placa contendo meio de cultura BDA – Batata Dextrose Agar, inoculando 0,1 mL do produto e espalhando com alça de Drigalski.

Após a inoculação do fungo as placas de Petri foram incubadas por sete dias horas em câmara climatizada (BOD) à temperatura de 25 ± 1,0 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Após sete dias, as unidades formadoras de colônias foram quantificadas. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com cinco repetições em esquema fatorial 3x3. Os dados foram submetidos à análise de variância e as medias submetidos ao Teste de Turkey à 5% de probabilidade no programa Sisvar 4.9 (FERREIRA, 2011).

Resultados e discussão

Na Tabela 1 as médias de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, na técnica de Pulverização dos defensivos antes da inoculação do fungo demonstraram que as UFC sofreram uma redução significativa quando em contato com o biofertilizante no dobro da dose recomendada (80 mL/L.)

Tabela 1 – Médias de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, em contato com defensivos naturais em diferentes doses. pulverizados antes da inoculação do fungo na calda do produto.

Tratamento	Doses		
	½ DR	DR	2 DR
Biofertilizante	24,66 Aa*	35,25Aa	4,33Ab

Urina Bovina	16,75 Aa	8,75Aa	5,33Aa
Folhas de Nim	17,75 Aa	18,00Aa	17,25Aa
CV (%) = 39,57			

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Turkey a 5% de probabilidade.

**Extrato de folhas de Nim meia dose 80 g de folhas/L de água, dose media 160 g/L e dobro da dose 320 g/L; Biofertilizante Vairo Modificado meia dose 20 ml do biofertilizante/ L de água, dose média 40 ml/L, dobro da dose 80 ml/L; Urina Bovina meia dose 1%, dose média 2% e dobro da dose 4%.

Dados transformados em raiz ($x=1$).

Os dados obtidos da tabela 2 – Médias de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, em contato com defensivos naturais em diferentes doses na mistura do fungo na calda do produto, demonstram que dentre os tratamentos utilizados o que obteve diferença mais significativa foi a urina bovina, isso para a dose recomendada e o dobro da dose recomendada, o que não aconteceu nos outros defensivos usados, biofertilizante Vairo modificado e folhas de nim.

Na Tabela 2 também pode-se observar, com relação às doses dentro de cada defensivo, que tanto o biofertilizante quanto folhas de nim não apresentam diferenças significativas, o que não ocorre com a urina bovina, que por sua vez, obteve uma alteração nas Unidades Formadoras de Colônias, sendo que na dose recomendada e no dobro desta os valores ficaram nulos, divergindo na metade da dose indicada – 13,00 UFC.

Ressalta-se significativa presença nas Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* dentro dos tratamentos quando em mistura com a urina bovina em comparação aos demais defensivos testados, biofertilizante Vairo modificado e folhas de nim, para as três doses.

Tabela 2 – Médias de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, em contato com defensivos naturais em diferentes doses na mistura do fungo na calda do produto.

Tratamento	Doses		
	½ DR	DR	2 DR
Biofertilizante	19,66 AB a*	21,00 B a	20,50 A a
Urina Bovina	13,00 B a	0,00 A b	0,00 B b
Folhas de Nim	22,55A a	22,50 B a	25,75 A a
CV (%) = 25,07			

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Turkey a 5% de probabilidade.

**Extrato de folhas de Nim meia dose 80 g de folhas/L de água, dose media 160 g/L e dobro da dose 320 g/L; Biofertilizante Vairo Modificado meia dose 20 ml do biofertilizante/ L de água, dose média 40 ml/L, dobro da dose 80 ml/L; Urina Bovina meia dose 1%, dose média 2% e dobro da dose 4%.

Dados transformados em raiz ($x=1$).

O parâmetro UFC avalia dois parâmetros na compatibilidade: a ocorrência de um atraso na germinação e se há uma inibição do crescimento vegetativo (SILVA et al., 2005).

Os efeitos de produtos à base de nim são bem conhecidos no controle de insetos, porém, podem também agir negativamente sobre outros organismos como nematoides, moluscos, crustáceos, vírus de plantas e fungos (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Segundo Castiglioni et al. (2003), o Nimkol® (extrato aquoso de folhas de Nim), ocasionou efeitos positivos sobre a compatibilidade *in vitro* com *M. anisopliae* para o controle de *Heterotermes tenuis*, apresentando-se compatível em até 1% i.a.

Da mesma forma Marques et al. (2004) analisaram o efeito de óleo de nim sobre o crescimento, esporulação e viabilidade dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *P. farinosus* em diferentes concentrações deste óleo, misturando a calda nos respectivos fungos entomopatogênicos. Nos resultados o óleo de nim não teve efeito sobre o crescimento, indicando que este fungo é menos sensível à ação do óleo de nim.

O efeito negativo da urina bovina provavelmente está associada à presença de cobre, o qual possui ação fungicida, uma vez que estudos realizados *in vitro* comprovam que produtos fitossanitários que apresentam cobre em sua composição foram muito tóxicos a *B. bassiana* (TAMAI et al., 2002, ALMEIDA et al., 2003), e também pela urina de vaca apresentar compostos antimicrobianos (BROEK et al., 2002).

Conclusão

O biofertilizante no dobro da dose 80ml/L na técnica pulverização dos defensivos antes da inoculação do fungo reduziu significativamente as UFC do *M. anisopliae*.

A urina bovina reduziu as UFC do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* quando foram misturados na calda durante 1 hora nas concentrações de 1, 2 e 4% .

Referências

- ALVES, Sérgio Batista, et al. Técnicas de laboratório. In: _____. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, p.289-381,1998.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; LAMAS, C.; LEITE, L.G.; TRAMA, M.; SANO, A.H. Avaliação da compatibilidade de defensivos agrícolas na conservação de microrganismos entomopatogênicos no manejo de pragas do cafeeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.79-84, 2003.
- ANDALÓ, V.; MOINO, A.; LENIRA, V. C. E; SOUZA, G. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com Agrotóxicos Visando o Controle da Cochonilha-da-Raiz-do-Cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 4, p. 463-467, 2004.
- AZEVEDO, J.L. de et al. Melhoramento de fungos de importância na agricultura. In: MELO, I.S. de et al. (Eds). **Recursos genéticos e melhoramento – microrganismos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. p.323-355.
- BARCI, L. A. G.; WENZEL, I. M.; ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA, A. H. C.; PRADO, P. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) com carrapaticidas químicos utilizados no controle do carrapato dos bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, supl. 1, p. 63-68, dez. 2009.
- BRANCO, C.M. et al. **Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações de traças-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil**. Hortic. Bras. 21:549-552. 2003.
- BROEK, R. V. D.; IACOVINO, G. D.; PARADELA, A. L.; GALLI, M. A. Controle Alternativo de oídio (*Erysiphe cichoracearum*) em quiabeiro (*Hibiscus esculentum*). **Revista Ecosystema**, Espírito Santo do Pinhal, SP, v.27, n. 1, p. 23-26, jan–dez 2002.
- CASTIGLIONI, E.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. Compatibilidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* com Nimkol-L^o para el combate de *Heterotermes tenuis*. **Manejo integrado de plagas y agroecologia**, Costa Rica, n. 69, p. 38-44, 2003.
- DIEZ-RODRIGUEZ, G.I. & C. OMOTO. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a *Lambda-Cialotrina*. **Neotrop. Entomol.** 30:311-316.2001.
- DUARTE, J.G.; NARCIZ, J. N. O.; RIBEIRO, R. D.; VIEIRA, B. S.; ANDALÓ, V.; ASSIS, FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 22, p. 18-21, 2001
- FERNANDES, Maria Carmo Araújo; LEITE, Eliane Condo B.; MOREIRA, Viviane Ernandes; **Defensivos Alternativos**. Niterói: Programa Rio Rural, 2008.
- FERREIRA, Fátima Teresinha R. Bioatividade de nanoformulações de nim e extratos de outras Meliaceae e a sua interação com agentes de controle biológico visando ao controle de Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). 2011. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.
- FORMENTINI, Marina Andressa; MAMPRIM, Ana Paula; MARTINELO, Leonardo; RODRIGUES, Elisângela; MARCHESE, Luiz Paulo Calixto; THOMAZONI, Dhyego; ALVES, Luis Francisco Angeli. Efeito In Vitro de Produtos Fitossanitários Alternativos Sobre *Metarhizium anisopliae*. **Revista Brasileira De Agroecologia**. Vol. 4 No. 2, nov. 2009.
- GASSEN, M.H.; BATISTA FILHO, A.; ZAPPELINI, L.O.; WENZEL, I.M. Efeito de agrotóxicos utilizados na cultura da goiaba sobre o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.3, p.327-342, 2008.
- GONÇALVES, T. E.; POTRICH, M.; PURETZ, B.; SIDINET, D.; LUCKMANN, D. Compatibilidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, pulverizado com produtos alternativos. IN: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 7., 2012, Curitiba. Anais... Curitiba, 2012.
- KEINATH, A.P. Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South Carolina and New York. **Plant Dis.** 82:479-484, 1998.
- LUCKMANN D. Compatibilidade de produtos naturais comerciais a fungos entomopatogênicos e seletividade a *Trichogramma pretiosum* (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE). 2013. 69 f. (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.
- MARQUES, R. P. et al. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes

- concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.6, p. 1675-1680, nov-dez, 2004.
- MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica*. A. Juss.): múltiplos usos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. Buenos Aires, v. 2, n.1, p. 139-148, 2005.
- PENTEADO, Silvio Roberto. **Defensivos alternativos e naturais** 3.ed. Livros Via Orgânica: Campinas, SP, 2007.
- ROCHA, R. B.; MELO, E. A. S. F.; SANTOS, O. O; BITTENCOURT. M. A. L. Compatibilidade e efeito de produtos comerciais à base de nim e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Metamasius hemipterus* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 24, número especial, p. 39-51, dez. 2012.
- ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 2, p. 43-50, 2001.
- ROMAN, E.S, L. et al. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida Glyphosate. **Planta Daninha**, 22:301-306,2004.
- ROSSI-ZALAF, L. S.; et al. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças, p.279-302. In ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (26d). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba, FEALQ, 414p, 2008.
- SANTOS, L. M. P. Efeitos dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill sobre *Tuta absoluta* (MEYRICK) e compatibilidade com inseticidas. 2008. 98 f. (Doutora em Agronomia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.
- SILVA, I. D. S.; NUNES, G. H. S.; LIMA; E. A. L. A.; ALVES, N. D.; FEIJÓ, F. M. C. Avaliação do fungo *Beauveria bassiana*, associado a mosquicida com método de controle biológico de dípteros de interesse médico veterinário sob condições de laboratório. **Agropecuária Científica no Semiárido**, nv.2, n.1, Set – Dez, 2006.
- SILVA, L. M. A.; ALMEIDA, F. A.; ABADE, C. L. P.; CARVALHO, R. M.; RÊGO, T. J. S.; SOUZA, A. D.; VELOSO, J. S. Extratos vegetais empregados no manejo de *meloïdogyne incognita* em pimentão. IN: XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2013 – UFRPE: Recife, 09 a 13 de dezembro. Disponível em: < <http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R0686-1.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2015.
- SILVA, R. Z.; NEVES, P. M. de O. J.; SANTORO, P. H. Técnicas e parâmetros utilizados nos estudos de compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e produtos fitossanitários. **Seminal: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, p. 305-312, 2005.
- TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; FAION, M.; PADULA, L.F.L. toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, p.89-96, 2002.
- TANZANI, M. R. Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira (*leptopharsa heveae*) com os fungos entomopatogênicos. 2002. 140 f. (Doutorado em ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ, Piracicaba, 2002.