

Efeito *In Vitro* de Produtos Fitossanitários Alternativos Sobre *Metarhizium anisopliae*

Effect in vitro of alternative phytosanitary products on Metarhizium anisopliae

FORMENTINI, Marina Andressa. UNIOESTE - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus Cascavel/Pr, marinaformentini@hotmail.com; MAMPRIM, Ana Paula. UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus Marechal Cândido Rondon/Pr. Mestrado em Agronomia, anamamprim@hotmail.com; MARTINELO, Leonardo. UNIOESTE - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus Cascavel/Pr; RODRIGUES, Elisângela. UNIOESTE; MARCHESE, Luiz Paulo Calixto, UNIOESTE; THOMAZONI, Dhyego. UNIOESTE; ALVES, Luis Francisco Angeli. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus Cascavel/Pr. Lab. Zoologia, CCBS, lfaalves@unioeste.br

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito de produtos fitossanitários alternativos sobre parâmetros biológicos de *Metarhizium anisopliae*. Produtos comerciais foram testados na concentração recomendada (CR), metade ($\frac{1}{2}$ CR) e o dobro da mesma (2CR) e foram pulverizados nas diferentes concentrações sobre o fungo já inoculado no meio de cultura BDA. Os produtos afetaram somente as UFC e o diâmetro das colônias formadas, com exceção do Dalneem® que interferiu também na produção de conídios, mostrando-se moderadamente tóxico na 2CR, enquanto suas demais concentrações e os outros produtos foram compatíveis ao fungo.

Palavras-chave: Compatibilidade, fungo entomopatogênico, Dalneem, Ecolife

Abstract

The objective was to evaluate the effect of alternative phytosanitary products on biological parameters of Metarhizium anisopliae. Commercial products were tested in the recommended (RC), half ($\frac{1}{2}$ RC) and double concentration (2RC) and were sprayed on the already inoculated fungus in culture medium BDA. The products affected only the CFU and the diameter of the colonies, with the exception of Dalneem® which also interfered in the conidia production and was moderately toxic in 2RC, while its other concentrations and products showed compatibility with the fungus.

Keywords: Compatibility, entomopathogenic fungi, Dalneem®, Ecolife®

Introdução

O controle microbiano é uma importante alternativa contra muitas pragas, sendo os fungos entomopatogênicos, um dos patógenos mais utilizados. O uso de produtos fitossanitários naturais juntamente com o controle biológico tem papel importante no Manejo Integrado de Pragas (MIP), no entanto, a interação entre estes métodos de controle de insetos pode ser sinérgica ou inibitória (SILVA et al., 2005), ou ainda, não ocasionar alterações no fungo após o contato com estes produtos. Assim, objetivou-se avaliar o efeito de produtos fitossanitários alternativos sobre *M. anisopliae*.

Metodologia

O fungo utilizado foi *Metarhizium anisopliae* (isolado UNIOESTE-22) multiplicado em meio de cultura (ALVES et al. 1998). Foram utilizados os produtos comerciais Ecolife®, Stubble-Aid® e Dalneem® nas concentrações recomendada (CR), metade ($\frac{1}{2}$ CR) e o dobro da mesma (2CR).

Para a avaliação do efeito sobre a viabilidade dos conídios, inoculou-se 100 µL da suspensão

Resumos do VI CBA e II CLAA

fúngica (1×10^6 con./mL) em placas de Petri (5 placas/tratamento), que foram incubadas em $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 à 18h, sendo avaliadas após 16 h. Com relação às UFC, seu crescimento foi avaliado inoculando-se 100 μL da suspensão do fungo (1×10^3 con./mL) em cada uma das 5 repetições/tratamento. As placas foram incubadas durante 7 dias para contagem das colônias formadas. O crescimento vegetativo foi avaliado inoculando-se o fungo com uma alça de platina em 3 pontos na superfície do meio de cultura e posterior medição do diâmetro médio das colônias obtidas. As colônias foram recortadas do meio, os conídios removidos e feita a contagem em microscópio. Cada tratamento foi comparado com uma testemunha, que consistiu da inoculação do fungo em meio de cultura e da pulverização de água destilada sobre ele. Excetuando-se a avaliação sobre o crescimento micelial, que ocorreu após 48 h, em todos os parâmetros testados, a pulverização dos produtos ocorreu logo após a inoculação do fungo no meio de cultura. Os dados obtidos foram avaliados quanto à variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, (5% de significância), utilizando o programa Sisvar. A compatibilidade entre os tratamentos e o fungo foi baseada no cálculo de toxicidade proposto por Alves et. al. (2007).

Resultados e discussões

Produtos comerciais

A viabilidade dos conídios foi o único parâmetro biológico não afetado pelos três produtos testados, ao passo que a quantidade de UFC formadas e o crescimento micelial do fungo foram mais afetados pelo contato com os mesmos.

TABELA 1. Médias ($\pm$ EP) da viabilidade, Unidades Formadoras de Colônias (UFC), crescimento vegetativo e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Unioeste 22), em contato com diferentes produtos comerciais ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ fotofase de 12 horas).

Trat ¹	Viabilidade		UFC		Diâmetro		Produção de conídios	
	(%)	Var.%	Média UFC	Var.%	(cm ²)	Var.%	($\times 10^6$)	Var.%
Test	79,6 $\pm$ 2,41a	0	122 $\pm$ 4,27b	0	2,5 $\pm$ 0,02a	0	54 $\pm$ 1,75a	0
DN ½CR	63,9 $\pm$ 5,62a	-19,7	174 $\pm$ 5,89a	42,6	2,45 $\pm$ 0,03a	-2	40 $\pm$ 3,53b	-20,4
DN CR	67,9 $\pm$ 1,09a	-14,7	115 $\pm$ 2,6b	-5,7	2,2 $\pm$ 0,06b	-12	28 $\pm$ 3,05c	-48,1
DN 2CR	70,2 $\pm$ 4,51a	-11,8	107 $\pm$ 3,84b	-12,3	1,5 $\pm$ 0,03c	-40	4 $\pm$ 0,39d	-92,6
C.V. (%)	7,24		3,02		1,56		7,03	
Test	104 $\pm$ 3,56a	0	122 $\pm$ 4,27a	0	2,5 $\pm$ 0,01a	0	54 $\pm$ 1,75a	0
EL ½CR	76,6 $\pm$ 3,22a	-11,4	104 $\pm$ 3,48b	-14,8	2,3 $\pm$ 0,03b	-8	36 $\pm$ 3,51a	-33,3
EL CR	74,5 $\pm$ 2,14a	-13,8	113 $\pm$ 2,6ab	-7,4	2,2 $\pm$ 0,03b	-12	30 $\pm$ 4,33a	-44,4
EL 2CR	74,8 $\pm$ 5,80a	-13,5	104 $\pm$ 3,56b	-14,8	2,3 $\pm$ 0,00b	-8	42 $\pm$ 8,51a	-24,1
C.V. (%)	8,84		3,13		0,80		14,84	
Test	75,4 $\pm$ 0,00a	0	360 $\pm$ 5,00a	0	2,7 $\pm$ 0,02a	0	54 $\pm$ 1,00a	0
SA ½CR	83,6 $\pm$ 0,04a	10,8	195 $\pm$ 6,00c	-45,8	1,9 $\pm$ 0,00c	-28,30	16 $\pm$ 2,50a	-70,4
SA CR	78,3 $\pm$ 0,26a	3,8	279 $\pm$ 2,5b	-22,5	2,3 $\pm$ 0,05b	-13,21	25 $\pm$ 3,00a	-53,7
SA 2CR	68,3 $\pm$ 0,69a	-9,8	267 $\pm$ 6,00b	-25,8	2,3 $\pm$ 0,02b	-13,21	25 $\pm$ 2,00a	-53,7
C.V. (%)	2,67		1,38		0,93		11,88	

Médias ($\pm$ EP) seguidas de mesma letra na coluna, para cada produto testado, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

¹Tratamentos: DN = Dalneem[®]; EL = Ecolife[®]; SA = Stubble-Aid[®]

A conidiogênese foi afetada somente na presença do Dalneem[®], que na ½CR reduziu em cerca de 20% a germinação dos conídios. Por outro lado, Stubble-Aid[®] na mesma concentração aumentou a taxa de germinação em 10% (Tabela 1).

Resumos do VI CBA e II CLAA

Dalneem® causou grande diminuição no crescimento vegetativo e produção de conídios dependente da sua concentração, exceto para o crescimento micelial da ½CR que foi semelhante à testemunha, concordando com Marques et al. (2004) e Depieri et al. (2005). Esta inibição deve-se ao fato do produto ser constituído à base de neem (*Azadirachta indica*), cuja planta possui ação antimicrobiana (MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005).

A diminuição da quantidade de UFC desenvolvidas e o diâmetro das colônias em contato com o Ecolife® devem ter ocorrido devido à ação das fitoalexinas presentes no produto, que são compostos antimicrobianos (PAXTON, 1981). Motoyma et al. (2003) verificaram redução do crescimento radial das colônias do fungo *Colletotrichum lagenarium*, assim como Abreu et al. (2008) observaram a mesma redução para *Monilinia fruticola*, ambos em contato com Ecolife®, observando resultados semelhantes com os deste trabalho.

Stubble-Aid® mostrou-se semelhante ao Ecolife®, afetando somente as UFC e o crescimento vegetativo, apesar de ter causado influência mais forte sobre estes parâmetros. Segundo o rótulo do produto, o enxofre é o componente mais abundante, estimulando a germinação. Porém, o crescimento micelial foi reduzido, devido ao maior tempo de contato com o produto, conforme Tamai et al. (2002) que também observaram grande redução no diâmetro das colônias de *Beauveria bassiana* em contato com um fungicida composto por enxofre.

Quanto à toxicidade dos produtos, segundo Alves et al. (2007), conclui-se que todas as concentrações dos produtos comerciais são compatíveis ao fungo, com exceção apenas ao Dalneem® 2CR que foi considerado moderadamente tóxico (Tabela 2).

TABELA 2. Valores de T (toxicidade) e classificação dos produtos comerciais quanto à compatibilidade a *M. anisopliae* (isolado Unioeste 22).

Tratamento	Valor de T	Classificação ¹
Dalneem® ½CR	122,98	Compatível
Dalneem® CR	88,23	Compatível
Dalneem® 2CR	42,22	Moderadamente Tóxico
Ecolife® ½CR	123,82	Compatível
Ecolife® CR	93,46	Compatível
Ecolife® 2CR	120,18	Compatível
Stubble-Aid® ½CR	72,07	Compatível
Stubble-Aid® CR	70,12	Compatível
Stubble-Aid® 2CR	88,96	Compatível

¹Valores de T, segundo Alves et al. (2007): entre 0 à 41 = tóxico; entre 42 e 66 = Moderadamente tóxico; maiores que 66 = compatível.

Castiglioni et al., (2003) também observaram compatibilidade do Nimkol-L®, produto feito à base de folhas de nim, com *M. anisopliae* na CR. No entanto, Mertz (2006) utilizando os produtos Dalneem®, Ecolife® e Agro-mos® nas concentrações ¼; ½; 1; 2 e 4CR sobre *B. bassiana* verificou toxicidade para todos os tratamentos. As diferenças entre estudos em que se utilizam os mesmos produtos e fungos taxonomicamente iguais ou próximos podem ocorrer devido à falta de padronização na metodologia para a realização de testes de compatibilidade (SILVA et al., 2005).

Conclusões

Com exceção do Dalneem® 2CR, todos os produtos mostraram-se compatíveis com *M. anisopliae*, podendo ser utilizados em programas de manejo integrado de pragas.

Referências

ALVES, S.B. et al. Técnicas de Laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.637-711.

ALVES, S.B. et al. Novo índice biológico para classificação de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos. In: SICONBIOL, 10., 2007, Brasília. *Anais...* Brasília, 2007.

ABREU, F. M. et al. Efeito de sanificantes no controle pós-colheita da podridão parda (*Monilinia fructicola*) e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em pêssegos. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v.34, n.1, p.83-85, 2008.

CASTIGLIONI, E.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* com Nimkol-L® para el combate de *Heterotermes tenuis*. *Manejo integrado de plagas y agroecología*, Costa Rica, n. 69, p. 38-44, 2003.

DEPIERI, R.A.; MARTINEZ, S.S.; MENEZES JR., A.O. Compatibility of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with extracts of neem seeds and leaves and the emulsible oil. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 34, n. 4, p. 601-606, 2005.

MARQUES, R.P.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. 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, 2004.

MERTZ, N.R. *Efeito in vitro de produtos fitossanitários naturais sobre Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. 2006. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel. 2006.

MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica*. A. Juss.): múltiplos usos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, Buenos Aires, v. 24, n. 1, p. 139-148, 2005.

MOTOYMA, M.M. et al. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.25, n.2, p.491-496, 2003.

PAXTON, J.D. Phytoalexins – a working redefinition. *Phytopathology*, Saint Paul, n. 101, p.106-109. 1981.

SILVA, R.; NEVES, P.M.O.J. Techniques and parameters used in compaitility tests between *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill and in vitro phytosanitary products. *Pest Management Science*, Sussex, n. 61, p. 667-674, 2005.