

EFEITO DE INSETICIDAS ORGÂNICOS NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana* (BALS) VUILL.

Patricia Helena Santoro¹, Pedro Manoel Oliveira Janeiro Neves², Kelly Cristiane Constanski³, Junio Tavares Amaro⁴

¹Pesquisadora, M.Sc., IAPAR, Londrina- PR, patriciasantoro@iapar.br

² Professor/Pesquisador, Bolsista PQ CNPq, Dr., UEL, Londrina- PR, pedroneves@uel.br

³ Bióloga/Mestranda em Agronomia, UEL, Londrina- PR, kconstanski@hotmail.com

⁴ Graduando em Agronomia, UEL, Londrina- PR, juniotavares@ibestvip.com.br

RESUMO: *Beauveria bassiana* é considerado o mais eficiente agente para controle microbiano de *Hypothenemus hampei* (Ferrari), uma das principais pragas do café. A associação de *B. bassiana* com outros produtos pode aumentar a eficiência de controle, porém é necessário conhecer o efeito da mistura, principalmente em relação ao desenvolvimento do entomopatógeno. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos inseticidas orgânicos Neudosan e Organic Neem (nas concentrações de 1, 2 e 3%) em relação ao desenvolvimento *in vitro* de *B. bassiana*. As variáveis avaliadas foram: germinação dos conídios, unidades formadoras de colônias (UFC), crescimento vegetativo, produção e produtividade de conídios. Organic Neem (2 e 3%) reduziu a germinação em aproximadamente 15% em relação à testemunha. As UFC não foram afetadas negativamente pelos produtos. Neudosan (3%) aumentou as UFC em 32,19% em relação à testemunha. Para Organic Neem (1, 2 e 3%) o fungo cresceu sobre toda a placa, não sendo possível fazer a avaliação. No crescimento vegetativo observou-se redução de 15%, na área da colônia, em relação à testemunha, no tratamento com Neudosan (3%). Para o Organic Neem (2 e 3%) a redução foi de aproximadamente 30%. A produção e produtividade de conídios com Neudosan (1 e 3%) e Organic Neem (1, 2 e 3%) não diferiram da testemunha. Com Neudosan (2%) houve um incremento de 68% na produção e de 51% na produtividade quando comparados à testemunha. Os produtos Neudosan e Organic Neem, nas concentrações de 1, 2 e 3%, são compatíveis com *B. bassiana*.

Palavras-Chave: Compatibilidade, controle biológico, manejo integrado de pragas.

EFFECT OF ORGANIC INSECTICIDES IN THE *IN VITRO* DEVELOPMENT OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *Beauveria bassiana* (BALS) VUILL.

ABSTRACT: *Beauveria bassiana* is considered the most efficient microbiological control agent of *Hypothenemus hampei* (Ferrari), one of the main coffee pests. The association of *B. bassiana* with other products could improve the control efficiency, but it is necessary to know the effect of the mixture, mainly in relation to the entomopathogen development. The objective of this study was to evaluate the effect of organic insecticides Neudosan and Organic Neem (in the concentrations of 1, 2 and 3%) in relation to the *in vitro* *B. bassiana* development. The variables analyzed were: conidia germination, colony forming unit (CFU), vegetative growth, conidia production and productivity. Organic Neem (2 and 3%) reduced germination around 15% in relation to the control. The CFU was not affected by the products. Neudosan (3%) improved CFU in 32% in relation to the control. For Organic Neem (1, 2 and 3%) the fungus growth all over the plate, where the evaluation was not possible. For the vegetative growth a reduction of 15% in the colony area was observed in relation to the control, for Neudosan (3%). For Organic Neem (2 and 3%) the reduction was around 30%. The conidia production and productivity with Neudosan (1 and 3%) and Organic Neem (1, 2 and 3%) did not differ from the control. With Neudosan (2%) there was an improvement of 68% in the production and 51% in the productivity, when compared to the control. The products Neudosan and Organic Neem, in the concentrations of 1, 2 and 3%, were compatible with *B. bassiana*.

Key words: Compatibility, biological control, integrate pest management

INTRODUÇÃO

Métodos alternativos de controle de pragas visam à redução do uso, ou substituição completa, dos inseticidas químicos. A utilização de fungos no controle biológico pode ser uma alternativa viável, pois os microrganismos entomopatogênicos tem se mostrado inócuos aos animais endotérmicos. Os fungos são responsáveis por aproximadamente 80% das enfermidades que ocorrem naturalmente nos insetos. Isso se deve principalmente à capacidade de penetração via tegumento, alta facilidade de disseminação e ampla variabilidade genética (Alves 1998).

O entomopatógeno *Beauveria bassiana* destaca-se, entre os fungos, pelo amplo espectro de hospedeiros, e é considerado o agente de controle microbiano mais eficiente de *Hypothenemus hampei* (Ferrari), uma das principais pragas do café (La Rosa *et al.* 1997). No Brasil o fungo ocorre naturalmente de maneira enzootica (baixa prevalência) em diversas regiões do país (Alves, 1998).

A associação de *B. bassiana* com outros produtos pode aumentar a eficiência de controle de pragas. Efeitos sinérgicos foram observados na associação de *B. bassiana* com inseticidas (Neves & Alves, 1999), terra diatomácea (Santorio *et al.*, 2008) e óleos (Hazzard *et al.*, 2003). Entretanto, caso exista incompatibilidade entre os agentes de controle, a interação poderá ser antagônica. Por este motivo é necessário conhecer previamente o efeito da mistura, principalmente em relação ao desenvolvimento do entomopatógeno que, por ser um organismo vivo, pode ter sua viabilidade afetada.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de dois inseticidas utilizados em produção orgânica em relação ao desenvolvimento *in vitro* de *B. bassiana*, para que posteriormente, possam ser testados em associação, a fim de aumentar a eficiência de controle da broca do café.

MATERIAL E MÉTODOS

Os inseticidas comerciais orgânicos testados foram: Organic Neem (80% de óleo de nim e 20% de emulsificante natural) e Neudosan (sais de potássio de ácidos graxos 47%). O isolado do fungo utilizado foi o Unioeste 4, que está armazenado no Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as variáveis avaliadas foram: a germinação dos conídios e as unidades formadoras de colônias (UFC), com cinco repetições cada; e o crescimento vegetativo, a produção e a produtividade de conídios, com seis repetições. Os inseticidas foram diluídos em água destilada esterilizada e testados nas concentrações de 1, 2 e 3% (v v⁻¹).

No teste de germinação utilizaram-se lâminas para microscópio (2,5×7,5 cm) com 3 ml de meio BDA, sobre o qual foi pulverizado 0,1 ml da suspensão do fungo (1×10⁷ conídios ml⁻¹), em solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v v⁻¹), e 0,2 ml da calda do inseticida. A avaliação foi realizada após 24 horas, onde, com o auxílio de microscópio óptico, observaram-se aproximadamente 200 conídios, subdivididos em dois campos, para contagem dos germinados e dos não germinados. O cálculo da porcentagem de germinação foi feito com base no número total de conídios observados.

Para avaliar das unidades formadoras de colônias (UFC), pulverizou-se 0,1 ml de uma suspensão de conídios (1×10³ conídios ml⁻¹), em solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v v⁻¹), e 0,2 ml da calda dos produtos, sobre placas de Petri (9 cm Ø) com 20 ml de meio BDA. A avaliação foi realizada após cinco dias, com contagem das colônias formadas.

Para o crescimento vegetativo, produção e produtividade de conídios, pulverizaram-se 0,2 ml da calda dos produtos sobre placas de Petri (9 cm Ø) com 20 ml de meio BDA. Em seguida, o fungo foi repicado em um ponto central da placa, com o auxílio de uma alça de platina. Ao 15^o dia calculou-se a área da colônia pela média obtida com as medidas dos diâmetros maior e menor. Dessas mesmas colônias, avaliou-se a produção e a produtividade de conídios. Com uma espátula os conídios foram removidos do meio de cultura, recolhidos em um tubo, suspensos em solução aquosa de Tween 20 a 0,005 % (v v⁻¹) e submetidos à agitação em vortex por 30 s. Após as diluições necessárias, os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. Considerou-se como produção, o número total de conídios retirados da colônia; e como produtividade, a produção por área (cm²) da colônia.

Para cada variável foi feita uma testemunha em que se aplicou água destilada esterilizada em substituição à calda dos inseticidas. A pulverização das caldas e das suspensões do fungo foram feitas com um pulverizador Airbrush, acoplado a um compressor-aspirador Fanen-Diapump (1,0 kgf cm⁻¹). Todos os tratamentos foram mantidos em câmara climatizada (25±1°C e fotofase de 12 horas) até o período de avaliação.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A classificação de toxicidade dos produtos nas diferentes concentrações foi calculada pelo índice biológico proposto por Alves *et al.* (2007), que considera $IB = [(47*CV) + (43*PC) + (10*GE)]/100$, onde IB é a classificação da toxicidade do produto, CV é a porcentagem de crescimento vegetativo, PC é a porcentagem da produção de conídios e GE é a germinação de conídios, todos em relação a testemunha.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação dos conídios foi afetada apenas nos tratamentos com Organic Neem a 2 e 3 %, com viabilidades de 82,08% e 80,94%, respectivamente, o que representa uma redução na germinação de aproximadamente 15% em relação à testemunha (Tabela 1). Em concentrações de 1,0 e 1,5 % (v v⁻¹), Depieri *et al.* (2005) verificaram redução na germinação dos conídios de *B. bassiana* de 8 e 12 %, respectivamente, quando o óleo de nim foi incorporado ao meio de cultura. No entanto, também com incorporação de óleo de nim ao meio, Marques *et al.* (2004) não observaram redução da germinação dos conídios em concentrações de até 5%. Hirose *et al.* (2001) relatam redução da germinação de *B. bassiana* em 17,26%, quando os conídios do fungo foram suspensos por uma hora em calda de óleo de nim, a 2%.

Esta variabilidade de resultados, além de ser conseqüência de diferenças metodológicas, pode estar relacionada com o produto utilizado, sua formulação e adjuvantes.

As UFC não foram afetadas negativamente pelos produtos. Neudosan, a 1 e 2 %, não diferiram da testemunha. Já na concentração de 3%, Neudosan aumentou a formação de colônias, com 32,19% a mais de UFC em relação à testemunha (Tabela 1). Para o produto Organic Neem, nas três concentrações, o fungo cresceu sobre toda a placa, com completa coalescência das colônias, o que impossibilitou a avaliação das UFC. O aumento de UFC no tratamento com Neudosan (3%) e a união das colônias nos tratamentos com Organic Neem (1, 2 e 3%), pode ser devido à ação de adjuvantes que fazem parte da formulação destes produtos, que podem ter contribuído para a separação de conídios aglomerados, favorecendo a observação de mais colônias no meio.

Tabela 1. Efeito *in vitro* dos inseticidas Neudosan e Organic Neem na germinação de conídios e nas unidades formadoras de colônias (UFC) do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*⁽¹⁾.

Tratamento	Germinação (%)	I ²	UFC	I
Testemunha	95,21±0,97 ¹ ab	-	99,40±2,99	bc -
Neudosan 1%	96,55±0,52 a	1,40	88,60±3,53	c -10,87
Neudosan 2%	95,13±1,05 ab	0,08	106,00±2,12	b 6,64
Neudosan 3%	91,72±0,52 b	-3,66	131,40±3,78	a 32,19
Organic Neen 1%	98,50±0,36 a	3,45	-	-
Organic Neen 2%	82,08±0,82 c	-13,79	-	-
Organic Neen 3%	80,94±1,94 c	-14,98	-	-
	CV=2,47		CV=6,66	

⁽¹⁾ Médias (±erro-padrão), seguidas de letra igual na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade; ⁽²⁾ I: Valores positivos representam incremento (%) da variável em relação a testemunha, e os negativos representam a redução; - Valores não estimados;

Para o crescimento vegetativo, Neudosan, nas concentrações de 1 e 2%, e Organic Neem, a 1%, não afetaram significativamente o fungo. A redução da área no tratamento com Neudosan a 3% foi de 15% em relação à testemunha, e para o Organic Neem, nas concentrações de 2 e 3%, foi de aproximadamente 30%. Entretanto, essa redução não interferiu na produção e produtividade de conídios, onde Neudosan, a 1 e 3%, e Organic Neem, a 1, 2 e 3%, não diferiram da testemunha, com produção entre $510,83 \times 10^7$ e $765,83 \times 10^7$ conídios. A produção máxima foi observada no tratamento com Neudosan a 2% ($1286,67 \times 10^7$ conídios) com incremento de 68% em relação à testemunha. Este aumento foi observado também na produtividade de conídios, onde o único tratamento que diferiu da testemunha foi o Neudosan a 2% ($56,20 \times 10^7$ conídios cm^{-2}), com incremento de aproximadamente 51% (Tabela 2).

A inibição do crescimento vegetativo não é necessariamente um indicador da redução da produção de esporos ou da viabilidade dos conídios (Zimmermann, 1975). A redução na área das colônias de *B. bassiana* também foi observada por Marques *et al.* (2004), sendo proporcional à concentração de óleo de nim incorporado ao meio de cultura, no entanto estes autores observaram que houve uma redução na produção de conídios.

Tabela 2. Efeito *in vitro* dos inseticidas Neudosan e Organic Neem no crescimento vegetativo, produção e produtividade de conídios de fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*⁽¹⁾.

Tratamento	Crescimento vegetativo (cm^2)	I ⁽²⁾	Produção ⁽³⁾	I	Produtividade ⁽⁴⁾	I
Testemunha	21,00±0,87 ab	-	765,83±54,35	b -	37,14±3,74	b -
Neudosan 1%	22,62±0,36 a	7,71	674,17±90,20	b -10,90	29,55±3,45	b -20,43
Neudosan 2%	22,90±0,31 a	9,04	1286,67±118,33	a 68,00	56,20±5,14	a 51,31
Neudosan 3%	17,85±0,42 c	-15,00	629,17±58,74	b -17,84	35,30±3,23	b -4,95
Organic Neen 1%	19,11±0,16 bc	-9,00	525,83±72,14	b -31,33	27,59±3,89	b -25,71
Organic Neen 2%	14,53±0,43 d	-30,80	515,83±50,83	b -32,64	35,16±2,36	b -5,33
Organic Neen 3%	14,64±0,33 d	-30,28	510,83±40,88	b -33,29	34,86±2,53	b -6,14
	CV=5,93		CV=25,73		CV=24,01	

⁽¹⁾ Médias (±erro-padrão), seguidas de letra igual na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade; ⁽²⁾ I: Valores positivos representam incremento (%) da variável em relação a testemunha, e os negativos representam a redução; ⁽³⁾ Total de conídios produzidos na colônia (10^7); ⁽⁴⁾ Conídios por área (cm^2) da colônia (10^7); -Valores não estimados;

Segundo o critério da classificação de toxicidade proposto por Alves *et al.* (2007), os produtos Neudosan e Organic Neem, nas concentrações de 1, 2 e 3% (v v^{-1}), foram considerados compatíveis com o isolado Unioeste 4 de *B. bassiana* (Tabela 3). A compatibilidade entre insumos agrícolas e entomopatogênicos pode variar em função da formulação do ingrediente ativo e da metodologia de contato entre o produto e o fungo. Depieri *et al.* (2005), verificaram que óleo de nim, em concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5% (v v^{-1}) foram considerados incompatíveis à *B. bassiana* quando o

produto foi incorporado ao meio de cultura. Já os extratos de sementes (1; 2 e 4% v v⁻¹) e de folhas (0,15; 1,5 e 15% v v⁻¹) de nim foram compatíveis. Em metodologia similar, Hirose et al. (2001) observaram ação moderadamente tóxica à *B. bassiana* de nim a 2% (v v⁻¹).

Tabela 3. Classificação da toxicidade dos inseticidas para o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, pelo calculo do índice biológico (IB) (Alves, 2007).

Tratamento	IB ⁽¹⁾	Classificação
Neudosan 1%	98,62	Compatível
Neudosan 2%	133,49	Compatível
Neudosan 3%	84,91	Compatível
Organic Neem 1%	82,64	Compatível
Organic Neem 2%	70,10	Compatível
Organic Neem 3%	69,95	Compatível

⁽¹⁾ 0 < IB < 41= tóxico; 42 < IB < 66 = moderadamente tóxico, IB > 66 é compatível.

CONCLUSÃO

Os produtos Neudosan e Organic Neen são compatíveis, em testes in vitro, com o fungo entomopatogênico *B. bassiana* e podem ser testados em associação para o controle da broca do café ou utilizados em sistemas onde o fungo e os produtos venham a ser utilizados de forma conjunta ou separada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, B.S. Fungos entomopatogênicos. In: **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ. p.289-381. 1998.
- ALVES, S. B. ; HADAD, M. L. ; FAION, M. ; BAPTISTA, G. C. ; ZALAF, Luciana Rossi . Novo índice biológico para classificação da toxicidade de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos. In: **X SICONBIOL**, 2007, Brasília. Anais do X Siconbiol, 2007.
- DE LA ROSA, W.; ALATORRE R., TRUJILLO, J. & BARRERA J.F. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). **J. Econ. Entomol.** v. 90, n.6, p.1534-1538. 1997.
- DEPIERI, R. A., MARTINEZ, S.S.; & MENEZES JR, A.O. Extracts of Neem Seeds and Leaves and the Emulsible Oil. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p.601-606, 2005.
- HAZZARD, R.V., B.B. SCHULTS, E. GRODEN, E.D. NGOLLO & E. SEIDLECKI. Evaluation of oils and microbial pathogens for control of lepdopteran pests of sweet corn in New Engand. **J. Econ. Entomol.** 96: 1653-1661. 2003
- HIROSE, E.; NEVES, P. M. O. J.; ZEQUI, J. A.; MARTINS, C. L. H.; PERALTA, C. H.; MOINO, A. Effect of biofertilizers and Neem Oil on the Entomopatogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 4, p.419-423, 2001.
- MARQUES, P.M. et al. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meio contendo diferentes concentrações de óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, v.34, n. 6, p.1675-1680, 2004.
- NEVES, P. M. O. J. ; ALVES, S. B. Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e imidacloprid.. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 305-313, 1999.
- SANTORO, P. H. ; NEVES, P. M. O. J. ; CAVAGUCHI, Silvia Akimi ; Constanski, K. ; Amaro, J.T. ; ALVES, L. F. A.; Gomes, B.B. . Controle associado de *Alphitobius diaperinus* e efeito de microrganismos eficazes no desenvolvimento de *Beauveria bassiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n.1, p.1-8, 2008.
- ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as biocontrol agent. **Pesticide Science**, v. 37, n. 4, p.375-379, 1993.