

Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar

Aline Aparecida Alves Botelho ⁽¹⁾; Antonio Carlos Monteiro ^(2*)

⁽¹⁾ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, 14884-900 Jaboticabal (SP).

⁽²⁾ UNESP, FCAV, Departamento de Produção Vegetal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900 Jaboticabal (SP).

^(*) Autor correspondente: montecar@fcav.unesp.br

Recebido: 30/mar./2009; Aceito: 18/ago./2010

Resumo

Os agroquímicos empregados no manejo da cana-de-açúcar podem afetar a ação de fungos entomopatogênicos usados no controle biológico de pragas da cultura. Este trabalho teve por objetivo investigar se os inseticidas, herbicidas e maturadores utilizados no manejo da cana-de-açúcar têm efeito tóxico sobre os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Foram utilizados os inseticidas thiametoxan, aldicarbe e fipronil, os herbicidas imazapir, diuron, metribuzin, hexazinone+diuron, clomazone+ametrina, 2,4 diclorofenoxiacético e glifosato, e os maturadores etil-trinexapac, sulfometuron-metílico e glifosato também. Os fungos foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar contendo os agroquímicos. Avaliou-se o crescimento micelial, a produção e viabilidade dos conídios, e fez-se a avaliação da toxicidade dos agroquímicos. O inseticida à base de thiametoxan foi considerado compatível, pois não afetou o crescimento micelial, a produção e a viabilidade dos conídios dos dois fungos. O inseticida formulado com fipronil se mostrou parcialmente tóxico para os fungos, sendo considerado moderadamente compatível, enquanto o aldicarbe foi considerado tóxico. Os herbicidas avaliados afetaram o crescimento micelial, a produção e a viabilidade dos conídios dos entomopatógenos e foram classificados como tóxicos, mas aqueles formulados com imazapir, glifosato e metribuzim foram considerados compatíveis. Entre os agroquímicos usados como maturadores apenas o glifosato foi classificado como compatível. Os agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar, e que foram testados neste estudo, têm majoritariamente efeito tóxico sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae* podendo comprometer sua ação como bioagentes de controle de pragas da cultura.

Palavras-chave: controle biológico, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Saccharum* sp., compatibilidade, toxicidade.

Sensitivity of entomopathogenic fungi to pesticides used in management of sugarcane

Abstract

The pesticides used in management of sugarcane can affect the action of entomopathogenic fungi used for biological control of pests. The objective of this work was to investigate if the insecticides, herbicides and ripeners used in management of sugarcane have toxic effect on the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. The insecticides used were thiamethoxan, aldicarb and fipronil, the herbicides imazapyr, diuron, metribuzin, hexazinone+diuron, clomazone+ametryn, 2,4 dichlorophenoxyacetic and glyphosate, the ripeners ethyl-trinexapac, sulfometuron-methyl and also glyphosate. The fungi were grown in potato dextrose agar medium containing chemical pesticide. Micelial growth, production and viability of conidia were evaluated, as well as the toxicity of the chemical pesticides. The thiamethoxan insecticide was considered compatible, because it did not affect the micelial growth, production and conidial viability of both fungi. The fipronil insecticide was partially toxic to the fungi, being considered moderately compatible, whereas aldicarb was considered toxic. Most of the evaluated herbicides affected the growth, production and conidial viability of both entomopathogenic fungi and were classified as toxic, but those formulated with imazapyr, glyphosate and metribuzin were considered compatible. Among the ripeners analyzed only glyphosate was classified as compatible. The chemical pesticides used in management of sugarcane and evaluated in this work have toxic effect on the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae*, which can compromise its action as bioagents of pest control.

Key words: biocontrol, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Saccharum* sp., compatibility, toxicity.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar tem especial significado econômico para o Brasil, que lidera a lista dos 80 países produtores com 25% da produção mundial. No país são cultivados mais de 6,7 milhões de hectares, nos quais, na safra 2008/2009, foram produzidas mais de 569 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (UNICA, 2010). A cultura tem sua produtividade reduzida pela presença de plantas daninhas durante seu desenvolvimento. Tal redução deve-se à competição por nutrientes, água, luminosidade e também por hospedar insetos-praga e agentes fitopatogênicos (LORENZI et al., 1994). Quando atingem a fase adulta as mesmas entrelaçam aos colmos e folhas interferindo nas práticas culturais e na colheita (AZANIA et al., 2002).

Para o controle das plantas daninhas, têm sido utilizados produtos químicos, consistindo no uso de herbicidas seletivos para a cultura (VELINI et al., 1993). No entanto, esses produtos podem interferir no desenvolvimento de agentes microbianos usados para o controle de insetos-praga da cana-de-açúcar. A utilização de maturadores pode contribuir para a redução dos impactos causados por plantas daninhas e insetos-praga, pois inibindo a elongação dos colmos sem afetar drasticamente a fotossíntese, favorecem a acumulação de açúcares nos tecidos de reserva (VIANA et al., 2007).

Com a expansão do sistema de colheita mecanizada (cana-crua) no Estado de São Paulo a cigarrinha-da-raíz *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Homoptera: Cercopidae) tornou-se a principal praga de solo da cultura da cana-de-açúcar (BATISTA FILHO et al., 1997). As ninfas atacam as raízes e são de difícil controle por inseticidas químicos. Devido à sua frequente ocorrência e ampla distribuição nos canaviais paulistas, essa praga pode reduzir a produção em até 40% (LEITE et al., 2003). O controle biológico tem sido um método bastante explorado no controle da cigarrinha-da-raíz, principalmente com o fungo *Metarhizium anisopliae*, patógeno de ocorrência natural que vem sendo aplicado para o controle da praga (ALVES, 1998).

A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae) é uma das principais pragas desta cultura e causa prejuízos diretos como a abertura de galerias que vão ocasionar perda de peso na cana-de-açúcar e provocar a morte das gemas, causando falhas na germinação. Quando a intensidade de infestação é baixa, ou seja, até 5%, tem-se utilizado o fungo *Beauveria bassiana* para seu controle (GALLO et al., 2002).

O emprego de microrganismos entomopatogênicos e de pesticidas em geral exige conhecimento da ação desses produtos sobre os agentes microbianos para determinar os efeitos desta ação e a compatibilidade com as estruturas vegetativas e reprodutivas dos microrganismos. O resultado desta combinação deve ser avaliado antes da recomendação de determinado agente químico, constituindo uma etapa importante no manejo integrado de pragas

(BATISTA FILHO et al., 2001). O controle integrado com a utilização de agroquímicos seletivos como inseticidas e herbicidas, em conjunto com os fungos entomopatogênicos ou outros agentes de controle biológico, pode ser uma estratégia segura e eficiente (LOUREIRO et al., 2002). No entanto, os agroquímicos podem ter efeito tóxico sobre os fungos entomopatogênicos comprometendo sua ação no controle de pragas e também o uso em uma estratégia de manejo integrado.

Portanto, este trabalho teve por objetivo investigar se os inseticidas, herbicidas e maturadores utilizados no manejo da cana-de-açúcar têm efeito tóxico sobre os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* usados no controle de pragas da cultura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Fungos e agroquímicos utilizados

Foram utilizados os isolados E9 de *Metarhizium anisopliae* e IBCB66 de *Beauveria bassiana*, arbitrariamente escolhidos entre aqueles pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal, SP. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura de batata, dextrose e ágar (BDA), acondicionadas em estufa a $27 \pm 0,5$ °C, em ausência de luz, durante 12 dias.

Os agroquímicos, com diferentes ingredientes ativos, foram utilizados de acordo com as recomendações de seus fabricantes (Tabela 1). Considerou-se o volume de calda recomendado e a concentração do ingrediente ativo nessa calda. Calculou-se a quantidade de ingrediente ativo necessária para obter a mesma concentração por mililitro de meio de cultura. Os agroquímicos foram dissolvidos em água destilada esterilizada e quantidade suficiente da solução obtida foi adicionada ao meio de cultura, sem diluição, a fim de atingir a concentração final desejada do ingrediente ativo. Foram usadas as doses recomendadas (DR) dos inseticidas e as subdosagens (90%, 80%, 70%, 60% e 50% da DR) visando a um possível uso associado. Para herbicidas, foram usadas as doses recomendadas em pré-emergência (DRPE), em pós-emergência (DRPO) que são aplicadas no campo. Utilizaram-se ainda as superdoses DRPE+50% e DRPO+100% para expor os fungos a grandes concentrações dos agroquímicos, considerando a possibilidade de sobreposição de aplicações. Para maturadores, foi utilizada somente a dose recomendada (DR).

Cultivo dos fungos em meio contendo os agroquímicos

Os fungos foram submetidos à inoculação em meio BDA contendo as devidas concentrações dos agroquímicos por meio de picada em ponto central da placa de Petri, após

Tabela 1. Inseticidas, herbicidas e maturadores usados na cultura da cana-de-açúcar e avaliados quanto à compatibilidade com os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Nomes comerciais	Ingredientes ativos	Grupos químicos	Doses	
Inseticidas				
Regent 800 WG	Fipronil	Pirazol	200 g ha ⁻¹	
Actara	Thiametoxan	Neonicotinóide	1000 g ha ⁻¹	
Temik 150	Aldicarbe	Metilcarbamato oxima	1,5 kg ha ⁻¹	
Herbicidas				
Velpar-K	Hexazinone+Diuron	Triazinas+uréias	1,8 kg ha ⁻¹	3,0 kg ha ⁻¹
Karmex	Diuron	Uréia substituídas	3,2 L ha ⁻¹	6,4 L ha ⁻¹
Sinerge	Clomazone+Ametrina	Isoxazolidionas	5,0 L ha ⁻¹	6,0 L ha ⁻¹
2,4 DMA	Sal de Dimetilamina	Organoarsenicais	1,5 L ha ⁻¹	3,5 L ha ⁻¹
Sencor	Metribuzin	Triazinonas	1,5 L ha ⁻¹	2,0 L ha ⁻¹
Arsenal	Imazapir	Imidazolinonas	4,0 L ha ⁻¹	10 L ha ⁻¹
Glifosato	Glifosato	Derivado da glicina	3,0 L ha ⁻¹	6,0 L ha ⁻¹
Maturadores				
Round up	Glifosato	Derivado da glicina	0,7 L ha ⁻¹	
Curavial	Sulfometurom-metílico	Sulfoniluréia	20 g ha ⁻¹	
Moddus	Etil-trinexapac	Dioxociclohexano carboxilato de etila	1,0 L ha ⁻¹	

Fonte: COMPÊNIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS (1999). DRPE: dose recomendada em pré-emergência. DRPO: dose recomendada em pós-emergência.

mergulhar a agulha de níquel-cromo em uma suspensão contendo 1×10^7 conídios mL⁻¹. Os agroquímicos foram adicionados ao meio de cultura na temperatura entre 45 e 50 °C, para evitar alterações das propriedades químicas dos produtos avaliados. Em seguida, as culturas foram incubadas em estufa a $27 \pm 0,5$ °C por 15 dias, em ausência de luz.

Avaliação do crescimento micelial, esporulação e viabilidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae*

A avaliação do crescimento micelial do fungo foi realizada no 15.º dia após a inoculação, medindo-se, em milímetros, dois diâmetros perpendiculares da colônia previamente marcados na parte externa do fundo da placa de Petri. Cada placa correspondeu a uma repetição.

Para avaliar a produção de conídios, coletou-se de cada placa de Petri (repetição) uma amostra do centro, uma da parte mediana e outra da periferia da colônia com auxílio de um anel metálico esterilizado de 8 mm de diâmetro, no 15º dia de incubação. Estas amostras foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo 10 mL de uma mistura (1:1) de solução de NaCl (0,88%, m/v) e Tween 80 (0,1% v/v) esterilizada. Após a remoção dos conídios por vigorosa agitação em um agitador elétrico de tubos, foi realizada a contagem ao microscópio de luz em câmara de Neubauer, utilizando diluições da suspensão quando necessário.

A viabilidade dos conídios foi avaliada através de microcultivo e exame direto em lâmina ao microscópio de luz. Lâminas de vidro esterilizadas foram recobertas com uma fina camada de BDA contendo os diferentes agroquímicos nas concentrações já descritas. Na parte inferior de cada lâmina foram marcados três campos e sobre o meio de cultura foi inoculado em cada ponto 0,05 mL de suspensão fúngica contendo 10^5 conídios mL⁻¹. As lâminas

foram mantidas a $27 \pm 0,5$ °C, em ausência de luz, durante 15 horas. Foram observados 150 conídios em cada campo, contando-se os germinados (aqueles com tubo germinativo de tamanho igual ou maior que o do conídio) e os não-germinados, estabelecendo-se uma porcentagem. As lâminas foram observadas no aumento de 250× para *M. anisopliae* e 400× para *B. bassiana* e cada lâmina correspondeu a uma repetição.

Avaliação da toxicidade dos agroquímicos

Para determinar o efeito tóxico dos produtos, foi utilizada a fórmula descrita por ROSSI-ZALAF et al. (2008), utilizando as variáveis crescimento vegetativo, esporulação do fungo e viabilidade dos conídios. Utilizou-se a seguinte expressão matemática:

$$IB = 47(CV) + 43(ESP) + 10(GER) / 100,$$

sendo: IB = índice biológico; CV = porcentagem de crescimento vegetativo da colônia após 15 dias, em relação à testemunha; ESP = porcentagem de esporulação após 15 dias, em relação à testemunha; GER = porcentagem de germinação dos conídios após 15 horas, em relação à testemunha.

Não foram utilizadas casas decimais para o cálculo do IB. De acordo com os valores obtidos, foi realizada uma comparação com os limites descritos por ROSSI-ZALAF et al. (2008) para determinação da toxicidade dos produtos estudados, como segue: 0 a 41 – tóxico; 42 a 66 – moderadamente compatível; > 66 – compatível.

Análise estatística

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey

a 5% de probabilidade. Para crescimento micelial, foram utilizadas cinco repetições e para produção e viabilidade dos conídios, três repetições. Para a execução das análises usou-se o programa ESTAT (1994).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos inseticidas sobre o crescimento micelial, produção e viabilidade dos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*

No meio de cultivo contendo o inseticida à base de aldicarbe não houve crescimento micelial, produção e germinação dos conídios de *B. bassiana* e de *M. anisopliae* em todas as doses avaliadas. TAMAI et al. (2002) avaliaram seis inseticidas pertencentes ao mesmo grupo químico de aldicarbe e verificaram que cinco foram muito tóxicos e um foi classificado como tóxico para *B. bassiana*.

O crescimento micelial de *B. bassiana* foi afetado pelo inseticida formulado com fipronil, observando-se redução significativa em relação à testemunha a partir de 80% da DR no 15º dia de cultivo. A produção e a viabilidade dos conídios também foram afetadas pelo inseticida, aumentando o efeito em função do incremento da dose (Tabela 2). Tal resultado está congruente com o constatado por MOINO JUNIOR. e ALVES (1998) que verificaram reduções no crescimento micelial e na produção de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* submetidos à ação de fipronil. *B. bassiana* foi pouco afetado pelo thiametoxan, não havendo redução do crescimento micelial e da viabilidade dos conídios em todas as doses avaliadas do inseticida, mas observou-se pequeno efeito sobre a produção de conídios que diminuiu ligeiramente em função do aumento da dose (Tabela 2).

Efeito semelhante dos inseticidas, ao observado para *B. bassiana*, ocorreu para *M. anisopliae*. O inseticida formulado com fipronil afetou o crescimento micelial, a produção e a viabilidade dos conídios, e para essa última variável não se observou efeito da dose (Tabela 2). Contudo, o fungo não foi afetado pelo inseticida à base de thiametoxan, pois não houve redução significativa de nenhuma variável avaliada nas doses testadas (Tabela 2).

O fipronil é um inseticida que age nas células do sistema nervoso do inseto como inibidor do complexo receptor do ácido aminobutírico, que inibe a entrada de íons Cl⁻ o qual hiperpolariza a célula levando-a à morte (OMOTO, 2000). Tal mecanismo pode também ter atuado sobre as células fúngicas afetando os entomopatógenos. Nos insetos, o thiametoxan impede a ação da enzima acetilcolinesterase nas células do sistema nervoso, causando hiperexcitabilidade deste sistema e provocando a morte do inseto (OMOTO, 2000). Essa ação metabólica não ocorre nas células de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, e conseqüentemente, ambos não foram inibidos na presença do inseticida.

Avaliação da toxicidade dos inseticidas e sua compatibilidade com *B. bassiana* e *M. anisopliae*

No inseticida formulado com thiametoxan, notaram-se os maiores valores do índice biológico, sendo considerado compatível com *B. bassiana* e *M. anisopliae* nas doses avaliadas (Tabela 3). Este resultado está de acordo com os obtidos por BATISTA FILHO et al. (2001), NEVES et al. (2001) e ALMEIDA et al. (2003) que avaliaram a compatibilidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sob ação do thiametoxan, classificando este inseticida como compatível com os entomopatógenos. GASSEN et al. (2008) e WENZEL et al. (2008) também classificaram esse inseticida como compatível com *B. bassiana* e *Lecanicillium lecanii* respectivamente, ao avaliarem a compatibilidade dos fungos com vários inseticidas.

O inseticida à base de fipronil foi considerado moderadamente compatível com *B. bassiana* e compatível com *M. anisopliae*. Em uma possível estratégia de introdução conjunta (controle associado), o thiametoxan e o fipronil podem ser usados juntamente com *M. anisopliae* e *B. bassiana* no controle de pragas da cana-de-açúcar pois não tiveram efeito tóxico sobre os fungos, sendo, portanto, seletivos. Esta estratégia é importante, pois possibilita diminuir os impactos ambientais do uso de agroquímicos na cultura. O aldicarbe, porém foi tóxico para ambos os fungos em todas as doses avaliadas (Tabela 3), evidenciando a necessidade de um tempo de carência entre sua aplicação e o uso dos fungos.

Os estudos *in vitro* têm a vantagem de expor ao máximo o microrganismo à ação do produto químico. Constatada a inocuidade em laboratório, espera-se que o produto seja seletivo no campo. No entanto, a alta toxicidade *in vitro* nem sempre indica sua grande toxicidade em campo, onde vários fatores servem de obstáculo a essa exposição, mas sim a possibilidade de ocorrência deste efeito tóxico (MOINO JUNIOR. e ALVES, 1998).

Efeito dos herbicidas sobre o crescimento micelial, produção e viabilidade dos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*

Os herbicidas formulados com clomazone+ametrina e com 2,4 diclorofenoxiacético inibiram o crescimento micelial, a produção e a viabilidade dos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em todas as doses avaliadas. COSTA et al. (2004) e ANDALÓ et al. (2004) também verificaram reduções significativas no crescimento micelial, esporulação e na viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, respectivamente, submetidos a ação de 2,4 diclorofenoxiacético. Contudo, PANDEY e KANAUIA (2010) consideraram esse agroquímico seguro para ser usado com *M. anisopliae*, após avaliarem o efeito de cinco herbicidas sobre o fungo.

Tabela 2. Crescimento micelial, esporulação e viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura contendo diversas doses dos inseticidas químicos fipronil e thiametoxan

Inseticidas e doses	<i>Beauveria bassiana</i>			<i>Metarhizium anisopliae</i>		
	Cresc. ⁽¹⁾ mm ²	Esporulação ⁽¹⁾ n.º de con. 10 ⁸	Viab. %	Cresc. ⁽¹⁾ mm ²	Esporulação ⁽¹⁾ n.º de con. 10 ⁸	Viab. %
Fipronil						
Testemunha	54,20 a	6,44 a	98,33 a	60,60 a	8,11 a	99,66 a
50% da DR	50,20 ab	2,39 b	63,33 b	58,40 b	5,52 b	97,33 ab
60% da DR	52,80 ab	2,40 b	53,33 c	58,00 bc	4,62 c	96,66 b
70% da DR	52,20 ab	1,62 c	53,66 c	56,80 cd	4,48 cd	96,33 b
80% da DR	47,40 b	1,84 bc	53,66 c	55,60 d	3,85 de	96,00 b
90% da DR	41,00 c	0,71 d	49,33 c	53,20 e	4,92 bc	95,33 b
100% da DR	39,00 c	0,61 d	42,00 d	50,40 f	3,67 e	95,00 b
Teste F	24,46**	228,01**	254,66**	158,79**	107,23**	7,63**
C.V. (%)	5,62	9,85	3,38	1,09	4,98	1,01
Thiametoxan						
Testemunha	50,40 a	3,42 a	100,00 a	55,60 a	4,63 a	99,33 a
50% da DR	50,30 a	3,32 a	99,00 a	55,50 a	4,61 a	99,31 a
60% da DR	50,25 a	3,28 ab	98,66 a	55,43 a	4,62 a	98,66 a
70% da DR	50,17 a	3,13 bc	99,33 a	55,30 a	4,63 a	99,00 a
80% da DR	50,10 a	3,10 bc	93,66 a	55,15 a	4,60 a	93,66 a
90% da DR	50,10 a	3,05 c	92,33 a	55,10 a	4,61 a	93,66 a
100% da DR	50,00 a	3,02 c	97,00 a	55,00 a	4,60 a	95,33 a
Teste F	1,42 ns	15,46**	1,94 ns	2,43 ns	2,35 ns	2,07 ns
C.V. (%)	0,68	2,09	2,69	1,67	1,54	3,31

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); Cresc.: crescimento; Viab.: viabilidade; DR: dose recomendada; C.V.: coeficiente de variação; ns: não significativo; ** significativo a 1% de probabilidade. (1) Após 15 dias de cultivo a $27 \pm 0,5$ °C em ausência de luz.

Tabela 3. Índice biológico e classificação dos inseticidas quanto à toxicidade aos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* de acordo com as doses utilizadas

Dose	<i>Beauveria bassiana</i>			<i>Metarhizium anisopliae</i>		
	Fipronil	Thiametoxan	Aldicarbe	Fipronil	Thiametoxan	Aldicarbe
Índice biológico (%)						
Testemunha	100	100	100	100	100	100
50% da DR	66	98	0	82	96	0
60% da DR	65	98	0	80	93	0
70% da DR	63	96	0	79	92	0
80% da DR	57	94	0	79	90	0
90% da DR	45	94	0	75	87	0
100% da DR	42	85	0	74	87	0
Classificação toxicológica						
Testemunha						
50% da DR	MC	C	T	C	C	T
60% da DR	MC	C	T	C	C	T
70% da DR	MC	C	T	C	C	T
80% da DR	MC	C	T	C	C	T
90% da DR	MC	C	T	C	C	T
100% da DR	MC	C	T	C	C	T

DR: dose recomendada; C: compatível; MC: moderadamente compatível; T: tóxico

O crescimento micelial e a viabilidade dos conídios de *B. bassiana* foram afetados pela presença do herbicida à base de imazapir, porém se observou efeito mais acentuado nas maiores doses em que houve diferença significativa em relação à testemunha. No entanto, a produção de conídios foi substancialmente inibida, havendo maior inibição em função do aumento da dose (Tabela 4). A viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* não foi afetada pelo herbicida à base de imazapir. Verificou-se pequena redução do crescimento micelial, porém houve diminuição significativa da esporulação em relação à testemunha em função do aumento da dose (Tabela 4).

O herbicida imazapir pertence ao grupo químico das imidazolinonas que agem inibindo a enzima acetolactato sintase (ALS), que atua na rota de síntese dos aminoácidos e em poucas horas bloqueia a divisão celular e síntese de DNA levando a planta à morte (Hess, 1994). Tal mecanismo pode influenciar no metabolismo de ambos os fungos, principalmente em vista do aumento das doses.

Os herbicidas diuron, glifosato e hexazinone+diuron afetaram o crescimento micelial, a produção e a viabilidade dos conídios com efeito semelhante para ambos os fungos (Tabela 4). Estes resultados se assemelham aos obtidos por ANDALÓ et al. (2004) que observaram redução

Tabela 4. Crescimento micelial, esporulação e viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura contendo diversas doses dos herbicidas químicos

Herbicidas e doses	<i>Beauveria bassiana</i>			<i>Metarhizium anisopliae</i>		
	Cresc. ⁽¹⁾	Esporulação ⁽¹⁾	Viab.	Cresc. ⁽¹⁾	Esporulação ⁽¹⁾	Viab.
	mm ²	N.º de con. 10 ⁸	%	mm ²	n.º de con. 10 ⁸	%
Imazapir						
Testemunha	50,20 a	3,74 a	99,66 ab	52,40 a	4,18 a	99,66 a
DRPE	50,60 a	2,00 b	100,00 a	50,00 b	2,62 b	98,66 a
DRPE+50%	51,00 a	1,64 b	99,00 bc	50,40 b	2,23 c	97,66 a
DRPO	47,40 b	1,22 c	100,00 a	50,40 b	1,69 d	98,33 a
DRPO+100%	47,00 b	1,23 c	98,33 c	50,20 b	1,29 e	98,66 a
Teste F	31,86**	735,18**	11,75**	14,88**	235,60**	1,68 ns
CV (%)	1,51	3,8	0,36	1,11	5,22	0,97
Diuron						
Testemunha	49,60 a	3,64 a	98,66 a	57,80 a	4,97 a	98,66 a
DRPE	14,20 b	0,16 b	85,00 b	12,40 b	0,192 b	84,66 b
DRPE+50%	11,80 c	0,09 b	77,33 c	10,60 c	0,118 b	79,33 c
DRPO	8,00 d	0,02 b	71,66 d	8,0 d	0,040 b	76,66 cd
DRPO+100%	8,00 d	0,02 b	70,33 d	8,0 d	0,032 b	73,66 d
Teste F	4599,00**	1303,02**	276,98**	3699,26**	2516,69**	124,74**
C.V. (%)	3,18	9,64	1,15	4,09	7,03	1,84
Glifosato						
Testemunha	48,20 a	3,55 a	100,00 a	62,40 a	6,15 a	99,33 a
DRPE	43,20 b	1,51 bc	97,33 b	53,40 b	3,99 b	97,33 b
DRPE+50%	35,20 c	1,65 b	94,66 c	46,20 c	1,95 cd	98,00 b
DRPO	33,80 c	1,62 b	90,66 d	42,40 d	1,52 d	98,00 b
DRPO+100%	30,60 d	1,37 c	93,00 cd	39,70 d	2,04 c	96,33 c
Teste F	137,45**	549,58**	49,92**	118,18**	353,23**	18,00**
C.V. (%)	3,62	3,44	0,94	3,87	5,7	0,45
Metribuzim						
Testemunha	49,40 a	3,66 a	100,00 a	53,20 a	4,00 a	99,33 a
DRPE	50,00 a	3,43 ab	99,66 a	50,00 c	3,69 ab	100,00 a
DRPE+50%	50,20 a	3,36 abc	98,66 a	49,80 c	3,13 c	98,66 a
DRPO	49,60 a	3,29 bc	99,00 a	50,20 c	3,34 bc	98,00 a
DRPO+100%	49,40 a	3,09 c	98,66 a	51,40 b	3,23 c	98,00 a
Teste F	1,31 ns	10,05**	1,10 ns	35,93**	21,96**	1,70 ns
C.V. (%)	0,94	3,35	1,008	1,039	3,84	1,16
Hexazinone+Diuron						
Testemunha	55,40 a	4,13 a	100,00 a	51,40 a	3,73 a	99,66 a
DRPE	27,60 b	0,46 b	64,33 b	26,00 b	0,90 b	76,66 b
DRPE+50%	25,20 c	0,31 b	59,00 c	23,40 c	0,73 b	72,00 c
DRPO	20,60 d	0,11 c	53,66 d	13,60 d	0,25 c	68,66 d
DRPO+100%	15,00 e	0,07 c	52,66 d	9,60 e	0,12 c	49,33 e
Teste F	2915,57**	1687,95**	823,74**	1282,98**	632,95**	772,16**
C.V. (%)	2,25	7,23	1,79	4,11	8,87	1,53

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); DRPE: dose recomendada em pré-emergência; Cresc.: crescimento; Viab.: viabilidade; DRPO: dose recomendada em pós-emergência; C.V.: coeficiente de variação; **significativo a 1% de probabilidade; ns: não significativo. ⁽¹⁾ Após 15 dias de cultivo a $27 \pm 0,5$ °C em ausência de luz.

do crescimento micelial e da produção de conídios de *B. bassiana* quando realizaram experimento *in vitro* com os herbicidas à base de diuron e glifosato.

O crescimento micelial e a viabilidade dos conídios de *B. bassiana* não foram afetados pelo herbicida a base de metribuzim, porém se observou grande redução da esporulação em relação à testemunha (Tabela 4). Efeito semelhante do herbicida metribuzim ocorreu para o fungo *M. anisopliae*, pois a viabilidade dos conídios não foi afetada. No entanto, o crescimento micelial e a produção de conídios do fungo foram significativamente afetados pelo herbicida em função do aumento da dose (Tabela 4). COSTA et al. (2004) também obtiveram substancial

redução da esporulação de *M. anisopliae* na presença deste herbicida.

De modo geral, os mecanismos de ação dos herbicidas são bastante diversificados e têm a capacidade de agir em pontos específicos da fisiologia das plantas. Contudo, esse fato não determina que sejam seletivos para *B. bassiana* e *M. anisopliae*. De acordo com MALTY et al. (2006), podem atuar na síntese de aminoácidos, ou causar inibição de vias metabólicas dos fungos promovendo o acúmulo de substâncias como, por exemplo, ácidos orgânicos (MACEDO et al., 1996). Entretanto, os mecanismos de inibição de microrganismos pelos herbicidas são ainda pouco conhecidos.

Avaliação da toxicidade dos herbicidas e sua compatibilidade com *B. bassiana* e *M. anisopliae*

Os herbicidas imazapir e metribuzim proporcionaram os maiores valores de índices biológicos e foram considerados compatíveis com ambos os fungos em todas as doses avaliadas (Tabela 5). O herbicida glifosato foi classificado como compatível com *M. anisopliae* apenas na dose recomendada em pré-emergência e moderadamente tóxicos nas demais doses. *B. bassiana* demonstrou ser compatível somente nas doses DRPE e DRPE+50% devido aos maiores índices biológicos e as demais doses foram consideradas como moderadamente tóxicas ao fungo (Tabela 5). Este resultado é semelhante ao constatado por ANDALÓ et al. (2004), que avaliaram a compatibilidade deste herbicida com *B. bassiana*.

Os herbicidas à base de diuron e de hexazinone+diuron foram considerados tóxicos para *B. bassiana*. *M. anisopliae* revelou valores de índice biológico menores que 41 para ambos os herbicidas, porém na DRPE este fungo demonstrou ser moderadamente compatível com o herbicida à base de hexazinone+diuron (Tabela 5). De acordo com a classificação descrita por ROSSI-ZALAF et al. (2008), os herbicidas à base de clomazone+ametrina e 2,4 diclorofenoxiacético foram classificados como tóxicos, em todas as doses utilizadas, por terem valores de índice biológico entre 0 e 41 (Tabela 5).

Os resultados mostraram que os herbicidas diuron, hexazinone+diuron, clomazone+ametrina e 2,4 diclorofenoxiacético foram tóxicos para os fungos em todas as doses, exceto a DRPE de hexazinone+diuron para *M. anisopliae*. Esse fato sugere que o modo de ação do ingrediente ativo é possivelmente o principal fator envolvido no grau de toxicidade dos herbicidas. Assim, a aplicação

desses produtos na cultura deve ser efetuada em época distinta da aplicação de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* para não comprometer a ação dos agentes microbianos.

Efeito dos maturadores sobre o crescimento micelial, a produção e viabilidade dos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*

O desenvolvimento de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi substancialmente afetado pelo maturador etil-trinexapac, que inibiu totalmente o crescimento micelial e a produção e viabilidade dos conídios de ambos os fungos, em todas as doses avaliadas. Na planta, esse maturador atua seletivamente através da redução do nível de giberilina ativa induzindo uma inibição temporária ou redução no ritmo de crescimento, sem afetar o processo de fotossíntese. Porém, a ação metabólica que provocou a inibição do desenvolvimento fúngico é provavelmente distinta desta. O maturador à base de sulfometurometilico afetou o crescimento micelial, a esporulação e a viabilidade dos conídios de ambos os fungos, mas não os inibiu completamente como o etil-trinexapac. O herbicida à base de glifosato, usado como maturador, não afetou o desenvolvimento de ambos os fungos (Tabela 6). Tal resultado pode ser justificado pela baixa dose utilizada.

Avaliação da toxicidade dos maturadores e sua compatibilidade com *B. bassiana* e *M. anisopliae*

Os resultados revelaram que os maturadores sulfometurometilico e etil-trinexapac não foram compatíveis com

Tabela 5. Índice biológico e classificação dos herbicidas quanto à toxicidade aos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* de acordo com as doses utilizadas

Herbicidas	Índice biológico (%)					Classificação toxicológica						
	Test.	DRPE	DRPE + 50%		DRPE + 100%		Test.	DRPE	DRPE + 50%		DRPE + 100%	
			DRPE	DRPO	DRPE	DRPO			DRPE	DRPO	DRPE	DRPO
<i>Beauveria bassiana</i>												
Imazapir	100	84	80	71	67	C	C	C	C	C	C	
Diuron	100	28	20	15	14	C	T	T	T	T	T	
Glifosato	100	70	63	62	56	C	C	C	MC	MC	MC	
Metribuzin	100	97	95	95	92	C	C	C	C	C	C	
H+D	100	35	30	24	18	C	T	T	T	T	T	
C+A	100	0	0	0	0	C	T	T	T	T	T	
Diclorof.	100	0	0	0	0	C	T	T	T	T	T	
<i>Metarhizium anisopliae</i>												
Imazapir	100	82	78	72	68	C	C	C	C	C	C	
Diuron	100	20	17	14	13	C	T	T	T	T	T	
Glifosato	100	77	58	52	53	C	C	MC	MC	MC	MC	
Metribuzin	100	93	90	87	90	C	C	C	C	C	C	
H+D	100	42	37	22	15	C	MC	T	T	T	T	
C+A	100	0	0	0	0	C	T	T	T	T	T	
Diclorof.	100	0	0	0	0	C	T	T	T	T	T	

Test.: testemunha; DRPE: dose recomendada em pré-emergência; DRPO: dose recomendada em pós emergência; H+C: hexazinone+diuron; C+A: clomazone mais ametrina; Diclorof.: diclorofenoxiacético; T: tóxico; MC: moderadamente compatível; C: compatível.

Tabela 6. Crescimento micelial, esporulação e viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura contendo a dose recomendada dos maturadores

Maturadores	<i>Beauveria bassiana</i>			<i>Metarhizium anisopliae</i>		
	Cresc. ⁽¹⁾	Esporulação ⁽¹⁾	Viab.	Cresc. ⁽¹⁾	Esporulação ⁽¹⁾	Viab.
	mm ²	n.º de con. 10 ⁸	%	mm ²	n.º de con. 10 ⁸	%
Sulfometurom-metílico						
Testemunha	52,40 a	4,80 a	99,20 a	56,40 a	4,52 a	98,60 a
DR	11,80 b	2,61 b	77,40 b	17,40 b	3,75 b	88,40 b
Teste F	2747,27**	5031,21**	950,48**	2112,50**	95,81**	472,91**
C.V. (%)	3,82	0,97	1,27	3,64	3,01	0,79
Glifosato						
Testemunha	51,00 a	5,38 a	98,50 a	55,60 a	4,61 a	97,80 a
DR	50,60 a	5,30 a	98,20 a	55,20 a	4,57 a	97,60 a
Teste F	1,0 ns	0,16 ns	0,64 ns	1,60 ns	1,38 ns	0,13 ns
C.V. (%)	1,24	5,95	0,6	0,9	1,41	0,89

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); Cresc.: crescimento; Viab.: viabilidade; DR: dose recomendada; C.V.: coeficiente de variação; ns: não significativo; ** significativo a 1% de probabilidade. (1) Após 15 dias de cultivo a $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em ausência de luz.

Tabela 7. Índice biológico e classificação dos maturadores quanto à toxicidade aos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* de acordo com a dose recomendada

Tratamentos	<i>Beauveria bassiana</i>			<i>Metarhizium anisopliae</i>		
	Etil-trinexapac	Sulfometurom metílico	Glifosato	Etil-trinexapac	Sulfometurom metílico	Glifosato
Índice biológico (%)						
Testemunha	100	100	100	100	100	100
DR	0	19	95	0	25	90
Classificação toxicológica						
DR	T	T	C	T	T	C

DR: dose recomendada; T: tóxico; MC: moderadamente compatível; C: compatível.

B. bassiana e *M. anisopliae* enquanto o glifosato foi compatível, quando usado como maturador (Tabela 7). Em geral, esses agroquímicos são aplicados na fase de maturação da cana-de-açúcar, ocasião em que a lagarta da broca da cana pode sair do colmo para empupar, ou usados como inibidores da floração. Portanto, nestas ocasiões, o uso de *B. bassiana* para o controle de *D. saccharalis* deve ser feito em época distinta da aplicação de sulfometurom-metílico e etil-trinexapac, para não comprometer o controle. Não foram constatados na literatura trabalhos sobre a compatibilidade de ambos os fungos com maturadores. Assim, há necessidade de se fazer novas investigações para melhor conhecer a ação destes produtos sobre os entomopatógenos.

4. CONCLUSÃO

Os agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar testados neste estudo têm, majoritariamente, efeito tóxico sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae*, podendo comprometer a ação desses fungos no controle biológico das pragas da cana-de-açúcar. No entanto, os inseticidas à base de thiametoxan e fipronil e os herbicidas formulados com imazapir, glifosato e metribuzim são compatíveis ou moderadamente compatíveis com os dois fungos, podendo ser empregados em uma possível estratégia de manejo integrado da cultu-

ra. Entre os maturadores analisados, somente o glifosato é compatível com os dois fungos entomopatogênicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa pela assistência nas análises estatísticas e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado à primeira autora.

REFERÊNCIAS

- 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, v.70, p.79-84, 2003.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.289-381.
- ANDALÓ, V.; MOINO JUNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, L.V.C.; SOUZA, G.C. Compatibility of *Beauveria bassiana* with chemical pesticides for the control of the coffee root mealybug *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). Neotropical Entomology, v.33, p.463-467, 2004.

- AZANIA, A.A.P.M.; AZANIA, C.A.M.; GRAVENA, R.; PAVANI, M.C.M.D.; PITELLI, R.A. Interferência da palha de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na emergência de espécies de plantas daninhas da família convolvulaceae. *Planta Daninha*, v.20, p.207-212, 2002.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, v.30, p.437-447, 2001.
- BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; TAKADA, H.M.; LAMAS, C.; RAMIRO, Z.A. Incidência do fungo entomopatogênico *Batkoa apiculata* (Entomophthorales) sobre cigarrinhas das pastagens em Pindamonhangaba, SP. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.64, p.82, 1997.
- COMPÊNDIO de defensivos agrícolas: Guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 6.ed. São Paulo: Andrei, 1999, 672p.
- COSTA, E.A.D.; MATALLO, M.B.; ALMEIDA, J.E.M.; LOUREIRO, E. DE S.; SANO, A.H. Efeito de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar no desenvolvimento *in vitro* do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente*, v.14, p.19-24, 2004.
- ESTAT - Sistema de análises estatísticas. FCAV/Unesp. V. 2.0 (livre), 1994. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download2/softwares/estat/>
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRANETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; DE BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. Manual de entomologia agrícola. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2002. 649p.
- GASSEN, M.H.; BATISTA FILHO, A.; ZAPPELINI, L.O.; WENZEL, I.M. Efeito de agrotóxicos usados na cultura da goiaba sobre o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, p. 327-342, 2008.
- HESS, F.D. Mechanism of action of inhibitors of amino acid biosynthesis. In: *Herbicide action course: summary of lectures*. West Lafayette: Purdue University, 1994. p.10-23.
- LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; NEGRISOLI JUNIOR, A.S. Patogenicidade de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista de Agricultura*, v.78, p.139-148, 2003.
- LORENZI, H.J.; BRUNELLI NETO, V.; OLIVEIRA, J.E. DE. Estudo do efeito do herbicida oxyfluorfen, aplicado em pré-emergência, sobre o crescimento e produtividade da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) cv. SP 71-6163. *STAB*, v.12, p.25-26, 1994.
- LOUREIRO, E. DE S.; MOINO JUNIOR, A.; ARNOSTI, A.; SOUZA, G.C. DE. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alfaca e crisântemos sobre fungos entomopatogênicos. *Neotropical Entomology*, v.31, p.263-269, 2002.
- MACEDO, E.C.; SOARES, F.; GROTH, D.; OLIVEIRA, D.A. Efeito de herbicidas em fungos associados a sementes de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, v.18, p.117-121, 1996.
- MALTY, J.S.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Efeito do glifosato sobre microrganismos simbióticos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.285-291, 2006.
- MOINO JUNIOR, A.; ALVES, S.B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.27, p.611-619, 1998.
- NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E.; TCHUJO, P.T.; MOINO JUNIOR, A. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology*, v.30, p.263-268, 2001.
- OMOTO, C. Modo de ação de inseticidas e resistência de insetos a inseticidas. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. (Ed.). *Bases e técnicas do manejo de insetos*. Santa Maria: Pallotti, 2000. p.31-49.
- PANDEY, A.K.; KANAUIA, K.R. Effect of different insecticides, fungicides and herbicides on growth, sporulation and germination of fungi (*Metarhizium anisopliae*) *Indian Journal of Agricultural Sciences*, v.80, p.265-268, 2010.
- ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; SILVEIRA NETO, S.; TANZINI, M.R. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Piracicaba : FEALQ, 2008. p.270-302.
- TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; FAION, M.; PADULLA, L.E.L. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, p.89-96, 2002.
- UNICA: cana-de-açúcar, 2010. Disponível em: www.unica.com.br. Acesso em: 18/6/2010.
- VIANA, R.S.; MUTTON, M.A.; BARBOSA, V.; DURIGAN, A.M.P.R. Maturadores químicos na cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) aplicados em final de safra. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v.7, p.100-107, 2007.
- VELINI, E.D.; FREDERICO, L.A.; MORELLI, J.L.; MARUBAYASHI, O.M. Avaliação dos efeitos de doses do herbicida clomazone, aplicado em pós-emergência inicial, sobre o crescimento e produtividade de soqueira de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* cv. SP 71-1406). *STAB*, v.12, p.30-35, 1993.
- WENZEL, I.M.; BATISTA FILHO, A.; GASSEN, M.H.; ALMEIDA, A.M.B. Compatibilidade de *Lecanicillium lecanii* (Hyphomycetes) em condições de laboratório e estufa, aos agrotóxicos utilizados na cultura do crisântemo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, p.157-166, 2008.