



Compatibilidade do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar

Compatibility of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* e herbicides used in sugar cane crop

Rogério Teixeira Duarte⁽¹⁾; Luís Eugênio Lessa Bulhões⁽²⁾;
David Jossue López Espinosa⁽³⁾; Karen Oliveira de Menezes⁽⁴⁾;
Aleska Batista da Silva⁽⁵⁾; David Javier Matuz Zarate⁽⁶⁾

⁽¹⁾Professor; Universidade de Araraquara, Araraquara, São Paulo, Brasil; R. Carlos Gomes, 1338 - Centro, Araraquara - SP, 14801-320; Endereço eletrônico: rogerio.tduarte@yahoo.com.br

⁽²⁾Estudante; Universidade Federal de Alagoas; lessabulhoes@gmail.com ⁽³⁾ Estudante; Universidade Federal de Alagoas; daespi24.7@gmail.com

⁽⁴⁾Estudante; Universidade Federal de Alagoas; kren.oliveira@hotmail.com

⁽⁵⁾Estudante; Universidade Federal de Alagoas; aleska.silva@hotmail.com

⁽⁶⁾Estudante; Universidade Federal de Alagoas; david.matuz1301@gmail.com

Todo o conteúdo expresso neste artigo é de inteira responsabilidade dos seus autores.

Recebido em: 02 de agosto de 2019; Aceito em: 24 de agosto de 2019; publicado em 01 de 10 de 2019. Copyright© Autor, 2019.

RESUMO: Objetivou-se com este trabalho analisar, em condições laboratoriais, a influência de princípios ativos de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar sobre o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Os ingredientes ativos utilizados foram diuron + sulfentrazone (5L * 100L-1) (Boral Duo® - FMC Química do Brasil Ltda.), clomazone (2L * 150L-1) (Gamit® - FMC Química do Brasil Ltda.) e tebutiuron (2,4L * 300L-1) (Combine® - Dow Agrosiences Industrial Ltda.). O efeito tóxico dos herbicidas sobre o entomopatógeno foi determinado em condição laboratorial, através da adição dos produtos químicos em meio de cultura BDA. Após solidificação do meio, foram inoculadas as estruturas reprodutivas do entomopatógeno, na concentração de 107 conídios/mL, totalizando oito repetições por tratamento. Após 24 h do início experimental foi analisada a viabilidade dos conídios, e após sete dias foi mensurada a área de crescimento da colônia (cm²), e contabilizado o número de conídios para cada tratamento, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05), e padronizadas pela classificação de compatibilidade. O ingrediente ativo clomazone inibiu o crescimento vegetativo e a conidiogênese de *M. anisopliae*, enquanto que diuron + sulfentrazone e tebutiuron possibilitaram certo desenvolvimento do entomopatógeno. A maior viabilidade foi observada no tratamento com tebutiuron, representado por 92,6 ± 1,12% de conídios viáveis, enquanto que diuron + sulfentrazone e clomazone foram prejudiciais. Os ingredientes ativos diuron + sulfentrazone e clomazone foram tóxicos à *M. anisopliae* enquanto que tebutiuron foi classificado como moderadamente tóxico.

PALAVRAS-CHAVE: controle microbiano, interação, agrotóxico.

ABSTRACT: The aim of this work was analyze, in laboratorial conditions, the influence of active ingredients of herbicides used in sugar cane crop on the vegetative and reproductive development of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. The active ingredients were diuron + sulfentrazone (5L * 100L-1) (Boral Duo® - FMC Chemical of Brazil Ltda.), clomazone (2L * 150L-1) (Gamit® - FMC Chemical of Brazil Ltda.) and tebutiuron (2,4L * 300L-1) (Combine® - Dow Agrosiences Industrial Ltda.). The toxic effect of herbicides on the entomopathogen was performed in laboratorial conditions by addition the pesticides in culture medium BDA. After medium solidification were inoculated the reproductive structures of entomopathogen, at 107 conidia/mL, totaling eight replicates per treatment. After 24 h was analyzed the conidia viability, and after seven days were measured the area of colony growth (cm²), and counted the number of conidia for each treatment, being the media compared by Tukey test (P < 0.05), and standardized by compatibility classification. The active ingredient clomazone inhibited the vegetative growth and conidiogenesis of *M. anisopliae*, while diuron + sulfentrazone and tebutiuron enable some development of entomopathogen. The greater viability was observed in the treatment with tebutiuron, represented by 92.6 ± 1.12% of viable conidia, while diuron + sulfentrazone and clomazone were harmful. The active ingredients diuron + sulfentrazone and clomazone were toxic to *M. anisopliae* while tebutiuron was classified like moderately toxic.

KEYWORD: microbial control, interaction, pesticide.

INTRODUÇÃO

O cultivo de cana-de-açúcar apresenta grande importância no cenário agrícola brasileiro, com produção estimada para a safra 2016/17 de 694,54 milhões de toneladas, e crescimento avaliado em 4,4% em relação à safra anterior (CONAB, 2016). A área a ser colhida está estimada em 9,1 milhões de hectares, aumento de 5,3% quando comparada a safra 2015/16, com produção de açúcar em torno de 39,8 milhões de toneladas, cujo aumento foi de 18,9%, porém com redução de 8,5% na produção do etanol, em detrimento aos melhores preços pagos a produção de açúcar (CONAB, 2016).

Em função do bom cenário que a cultura vem apresentando, a expectativa de expansão da área cultivada de cana-de-açúcar, de 8,5 milhões de hectares em 2012 para aproximadamente 14 milhões de hectares em 2030, vai requerer maiores cuidados dentro dos tratamentos culturais empregados atualmente. Nesta perspectiva, as plantas daninhas podem representar um fator decisivo quanto a produtividade da cana-de-açúcar, intimamente relacionadas a competição por nutrientes, água e luminosidade, e também por hospedarem pragas e agentes fitopatogênicos e dificultarem a realização dos demais tratamentos na cultura, principalmente o processo de colheita (LORENZI et al., 1994; AZANIA et al., 2002).

Para minimizar os impactos negativos causados pelas plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar, o método de controle químico, por intermédio do uso de herbicidas, tem sido amplamente empregado nos canaviais, porém esta estratégia de controle pode interferir na eficiência do método de controle biológico a base do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., que tem sido a principal estratégia para a redução populacional de *Mahanarva fimbriolata* Stål (Hemiptera: Cercopidae) (ESPINOSA, 2019; ALVES, 1998; BOTELHO; MONTEIRO, 2011).

Assim, estudos prévios, realizados em condições laboratoriais, no intuito de avaliar a interação entre um agrotóxico sobre determinado entomopatógeno, são imprescindíveis na adoção de estratégias voltadas ao manejo integrado de pragas, haja vista que um ingrediente ativo pode intervir na ação de um micro-organismo entomopatogênico em relação a redução populacional de uma praga (BOTELHO; MONTEIRO, 2011; MAMPRIM et al., 2013). O objetivo do trabalho foi analisar, em condições laboratoriais, a influência de princípios ativos de herbicidas utilizados na

cultura da cana-de-açúcar sobre o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.

PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Agronomia, localizado no Departamento de Ciências da Administração e Tecnologia da Universidade de Araraquara (Uniará). O isolado do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. foi obtido do banco de entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano de Pragas de Artrópodes (LCMAP), do Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP-FCAV), Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

Os ingredientes ativos de herbicidas utilizados no experimento foram diurom + sulfentrazona (5L * 100L-1) (Boral Duo® - FMC Química do Brasil Ltda.), clomazona (2L * 150L-1) (Gamit® - FMC Química do Brasil Ltda.) e tebutiurom (2,4L * 300L-1) (Combine® - Dow Agrosiences Industrial Ltda.).

O efeito tóxico dos ingredientes ativos sobre o entomopatógeno foi determinado em condição laboratorial, através da adição dos produtos químicos em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar), preparado a partir da dissolução de 39 g do produto formulado Potato Dextrose Agar® (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Índia) em 1 L de água destilada, sendo posteriormente autoclavado a 1 atm por 20 min. Após atingir temperatura de 45 °C, ponto em que o meio ainda não se encontra solidificado, cada herbicida com concentração conhecida foi adicionado e homogeneizado no meio de cultura, e então vertido em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, totalizando 8 repetições para cada análise de compatibilidade.

Após solidificação do meio em placas de Petri, foram inoculadas as estruturas reprodutivas dos fungos entomopatogênicos, na concentração de 10⁷ conídios/mL, perfazendo uma pontuação de 5 µL da suspensão do entomopatógeno na região central de cada placa de Petri, sendo posteriormente acondicionadas em câmara BOD a temperatura de 28 ± 2 °C, com umidade relativa média de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12:12 h, por sete dias. Após este período, foi mensurada a área de crescimento da colônia

(cm²), com auxílio de uma régua graduada (mm), sendo realizada duas medidas no sentido transversal da colônia.

Depois de mensurada a área da colônia foi realizada a contagem de conídios para cada tratamento, recortando-se a colônia do meio de cultura e acondicionando-as em tubos para criação com 10 mL de água estéril mais espalhante adesivo Tween[®] 20 (0,05%), sendo esta suspensão homogeneizada com auxílio de um agitador (Phoenix[®] ModeloAP56, São Paulo, Brasil) por um período de 1 min, e retirada uma pequena alíquota da suspensão para visualização das estruturas reprodutivas em microscópio ótico, com a contagem destas realizada com auxílio de uma câmara de Neubauer.

A viabilidade dos conídios foi analisada após 24 h da montagem do bioensaio, através da técnica de microcultivo e exame direto em lâmina, proposta por Marques et al. (2004). Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições. As médias do tamanho das colônias, o número e a viabilidade de conídios referentes a cada tratamento foram comparados entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (SAS INSTITUTE, 2002), sendo padronizados pela classificação de compatibilidade desenvolvida por Alves et al. (2007) (Tabela 1), com auxílio da seguinte fórmula ($IB = 47 [CV] + 43 [ESP] + 10 [GER] / 100$), em que IB = índice biológico; CV = porcentagem de crescimento vegetativo da colônia após sete dias, em relação ao controle; ESP = porcentagem de esporulação da colônia após sete dias, em relação ao controle; GER = porcentagem de germinação dos conídios após 24 h.

Tabela 1. Classificação da toxicidade dos inseticidas químicos sobre *Metarhizium anisopliae*.

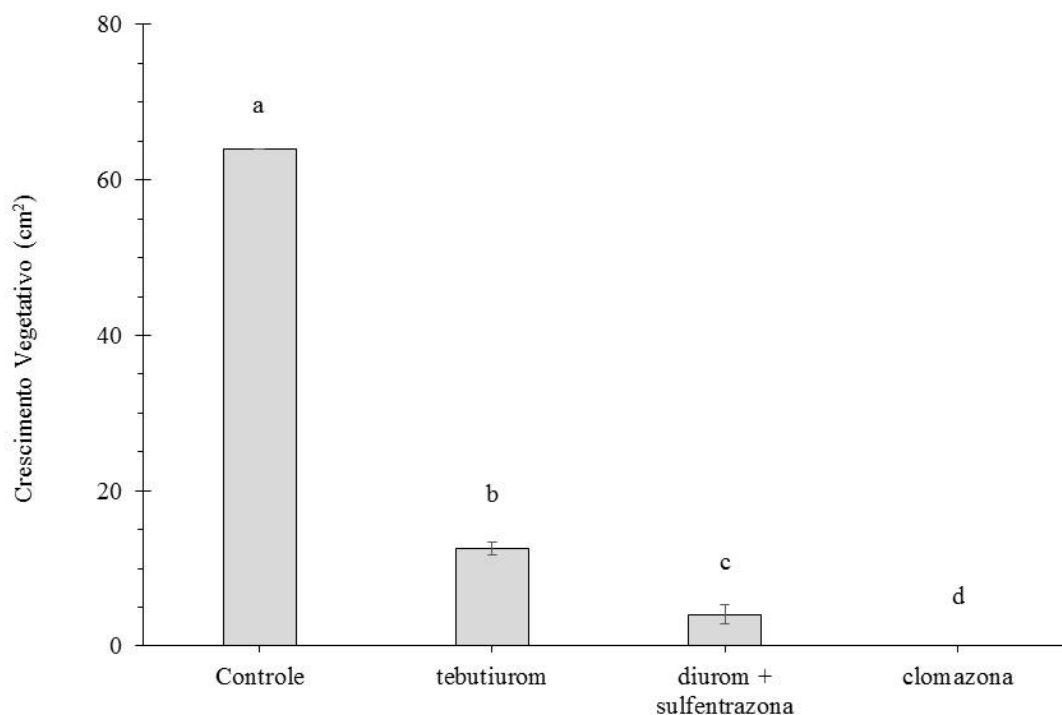
Valor de IB	Classificação do Produto
0 – 41	Tóxico (T)
42 – 66	Moderadamente Tóxico (MT)
67 – 100	Compatível (C)

IB: Índice Biológico

Fonte: ALVES et al. (2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os ingredientes ativos causaram redução significativa no crescimento vegetativo de *M. anisopliae* quando comparado ao controle ($F = 1555,46$; $gl = 3, 28$; $P <$



0,05) (Fig. 1). O ingrediente ativo clomazona foi o mais prejudicial em relação ao desenvolvimento do entomopatógeno, inibindo totalmente seu crescimento vegetativo, seguido por diurom + sulfentrazone e tebutiurum, que possibilitaram certo desenvolvimento de *M. anisopliae*, com diâmetro de colônia de $4,07 \pm 1,23$ e $12,54 \pm 0,86$ cm², respectivamente (Fig. 1).

Figura 1. Crescimento vegetativo (cm²) da colônia do fungo entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* submetido a tratamentos com diferentes ingredientes ativos de herbicidas recomendados para o controle de plantas daninhas presentes na cultura da cana-de-açúcar. Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A barra de erros corresponde ao erro padrão ($\pm EP$).

Quanto ao número de conídios produzidos por *M. anisopliae*, foi observado que apenas clomazona interferiu significativamente no processo reprodutivo do entomopatógeno, inibindo por completo a conidiogênese ($F = 7,59$; $gl = 3, 28$; $P < 0,05$). Ademais, nos tratamentos tebutiurum e diurom + sulfentrazona, a produção de conídios foi semelhante ao controle, com $2,01 \pm 0,36 \times 10^7$ e $1,78 \pm 0,55 \times 10^7$ conídios / mL (Fig. 2).

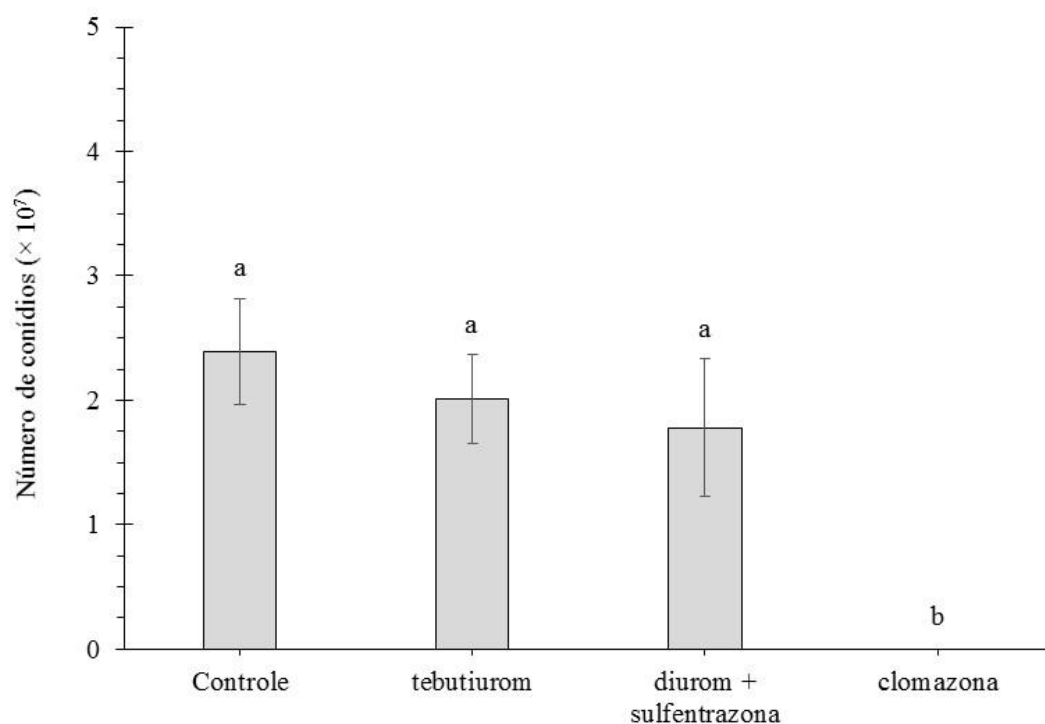


Figura 2. Número médio de conídios produzidos pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* quando em contato com diferentes ingredientes ativos de herbicidas recomendados para o controle de plantas daninhas presentes na cultura da cana-de-açúcar. Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A barra de erros corresponde ao erro padrão ($\pm EP$).

A viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* foi reduzida significativamente quando em contato com os ingredientes ativos ($F = 801,47$; $gl = 3, 16$; $P < 0,05$) (Fig. 3). A maior viabilidade foi observada no tratamento com tebutiurum, representado por $92,6 \pm 1,12\%$ de conídios viáveis, enquanto que diurom + sulfentrazona e clomazona foram

mais prejudiciais, caracterizados por $48,8 \pm 1,85\%$ e $19,8 \pm 1,56\%$, respectivamente (Fig. 3).

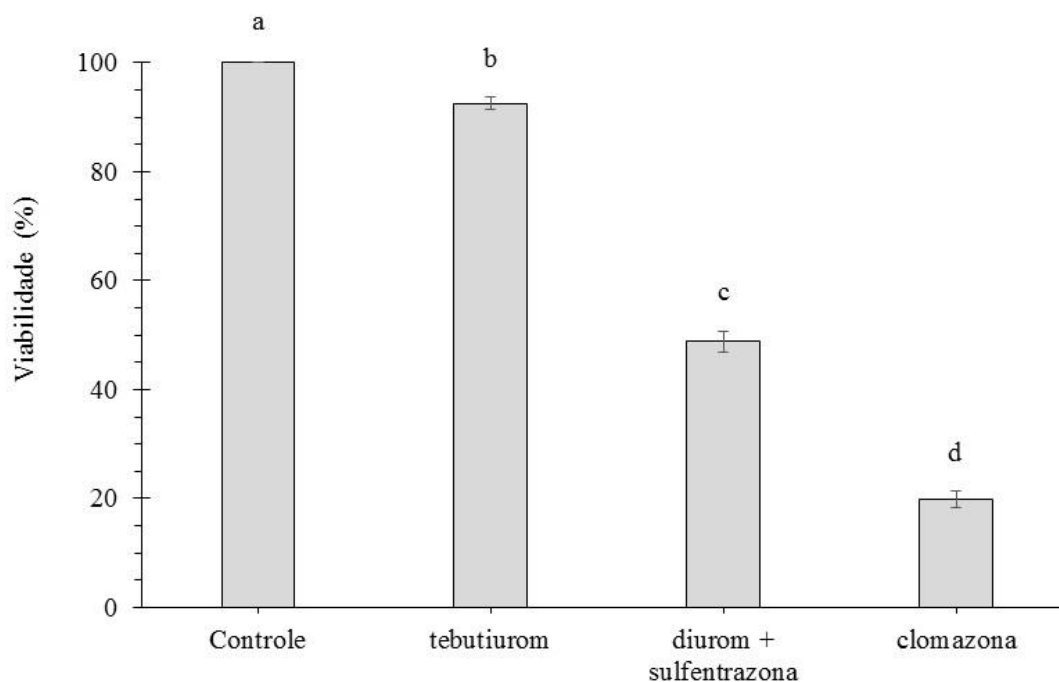


Figura 3. Viabilidade dos conídios (%) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* quando em contato com diferentes ingredientes ativos de herbicidas recomendados para o controle de plantas daninhas presentes na cultura da cana-de-açúcar. Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A barra de erros corresponde ao erro padrão ($\pm EP$).

Com base nos parâmetros analisados, dentro da classificação de compatibilidade proposta por Alves et al. (2007), os ingredientes ativos diurom + sulfentrazona e clomazona foram considerados como tóxicos ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, enquanto que tebutiurum foi caracterizado como moderadamente tóxico (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação de compatibilidade entre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e os principais ingredientes ativos de herbicidas recomendados para o controle de plantas daninhas presentes na cultura da cana-de-açúcar.

Ingrediente Ativo	Valor de IB	Classificação do Produto
tebutiurum	54,64	Moderadamente Tóxico
diurom + sulfentrazona	39,89	Tóxico
clomazona	1,98	Tóxico

IB: Índice Biológico

Fonte: ALVES et al. (2007).

Os mecanismos de ação dos herbicidas são muito diversificados, e podem atuar em diferentes sítios específicos da fisiologia de plantas, fatores estes que não determinam seletividade em relação aos fungos entomopatogênicos (BOTELHO; MONTEIRO, 2011). Estes produtos químicos podem interferir na síntese de aminoácidos ou inibirem processos metabólicos, como descrito por Macedo et al. (1996), sendo ainda um assunto pouco discutido na literatura.

Dentro desta premissa, os herbicidas à base de diurom foram considerados tóxicos à *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae*, com efeito negativo sobre o crescimento micelial, esporulação e viabilidade dos referidos entomopatógenos (ANDALÓ et al., 2004; BOTELHO; MONTEIRO, 2011; FREGONESI et al., 2016). No presente estudo, o produto comercial utilizado apresentava além do diurom o ingrediente ativo sulfentrazona, fator este que pode ter potencializado a ação tóxica do herbicida em relação ao desenvolvimento in vitro de *M. anisopliae* (Tabela 2).

O ingrediente ativo clomazona também foi considerado como tóxico à *M. anisopliae* (Tabela 2), com relatos na literatura inibindo completamente o desenvolvimento de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (BOTELHO; MONTEIRO, 2011). Já o ingrediente ativo tebutiurum foi classificado como moderadamente tóxico (Tabela 2), podendo ser uma importante estratégia frente sua utilização na cultura da cana-de-açúcar visando a conservação e o desenvolvimento natural de *M. anisopliae*, pois de acordo com Moino Júnior; Alves (1998) e Mochi et al. (2005), a toxicidade de um

ingrediente ativo em condições laboratoriais nem sempre caracteriza elevado grau de toxicidade no campo, mas a possibilidade de ocorrência de efeito tóxico.

É importante salientar que a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* foi alta quando em contato com tebutiurom ($92,6 \pm 1,12\%$ conídios viáveis) (Fig. 3), sendo um fator crucial para o fungo entomopatogênico penetrar em seu hospedeiro e ter sucesso no processo de colonização e morte da praga (ANDERSON; ROBERTS, 1983). Desta forma, a elevada redução ou inibição da germinação de conídios pode afetar consideravelmente a eficiência do fungo entomopatogênico, resultados estes observados a partir do contato de *M. anisopliae* com os ingredientes ativos diurom + sulfentrazona e clomazona.

Além disso, os resultados positivos frente ao número de conídios produzidos também pode ser um fator muito importante quanto ao potencial do entomopatógeno em iniciar a infecção secundária na população da praga, conduzida através da liberação dos conídios presentes no micélio dos cadáveres de insetos infectados (ALVES, 1998).

Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo poderão incrementar positivamente o manejo integrado de pragas da cana-de-açúcar, baseado na recomendação de herbicidas seletivos ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, caracterizado como um importante agente de controle biológico de pragas desta cultura. Entretanto, deve-se considerar a continuidade das pesquisas nesta área, visando estudos de interação entre herbicidas seletivos à *M. anisopliae* e a relação com agroecossistema da cana-de-açúcar, levando em consideração fatores bióticos e abióticos.

CONCLUSÃO

Os ingredientes ativos diurom + sulfentrazona e clomazona foram tóxicos à *M. anisopliae* em condições laboratoriais, enquanto que tebutiurom foi classificado como moderadamente tóxico.

REFERÊNCIAS

1. ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. 2.ed. Piracicaba: FEALQ. p.289-381. Cap. 11. 1998.
2. ALVES, S. B.; HADDAD M. L.; FAION, M.; BAPTISTA, G. C.; ROSSI-ZALAF, L. S. Novo índice biológico para a classificação de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos. In: Resumos, 10th Simpósio de Controle Biológico. Brasília, Brasil, 2007.
3. 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, n.4, p.463-467, 2004.
4. ANDERSON, T. E.; ROBERTS, D. W. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. *Journal of Economic Entomology*, Lanham, v.76, n.6, p.1437-1441, 1983.
5. 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, n.2, p.207-212, 2002.
6. BOTELHO, A. A. A.; MONTEIRO, A. C. Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo de cana-de-açúcar. *Bragantia*, v.70, n.2, p.361-369, 2011.
7. CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, terceiro levantamento. 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_30_01_boletim_cana_portugues_-3o_lev_-_16-17.pdf>. Acesso em: 12 mai. 2017.
8. ESPINOSA, D. J. L.; DA SILVA, I. H. S.; DUARTE, R. T.; GONÇALVES, K. C.; POLANCZYK, R. A. Potential of entomopathogenic fungi as biological control agents of whitefly (*Bemisia tabaci* biotype b)(genn.)(hemiptera: aleyrodidae). *Journal of Experimental Agriculture International*, 1-8, 2019.
9. FREGONESI, A. F.; MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* a inseticidas, herbicidas e maturadores em condições de laboratório. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.83, n.1, p.1-8, 2016.
10. LORENZI, H. J.; BRUNELLI NETO, V.; OLIVEIRA, J. E. 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, Piracicaba, v.12, n.1, p.25-26, 1994.
11. 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*, Londrina, v.18, n.1, p.117-121, 1996.
12. MAMPRIM, A. P.; ALVES, L. F. A.; PINTO, F. G. S.; FORMENTINI, M. A.; MARTINS, C. C.; BONINI, A. K. Efeito de defensivos agrícolas naturais e extratos vegetais sobre parâmetros biológicos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.34, n.4, p.1451-1466, 2013.

13. MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C.; BARBOSA, A. C. Action of pesticides to *Metarhizium anisopliae* in soil. *Neotropical Entomology*, Londrina, v.34, n.6, p.961-971, 2005.
14. MOINO JR., 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, Londrina, v.27, n.4, p.611-619, 1998.
15. SAS INSTITUTE. User's guide: statistics, version 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, 2002.