

ACÇÃO DE FUNGICIDAS SOBRE O CRESCIMENTO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* var. majus (JOHNSTON) TULLOCH

Danusa de Freitas¹, Silvana Damin¹, Andréia Vilani¹, Cristiane Krasburg¹, Jéssica Alves de Queiroz¹, Francini Yumi Kagimura², Sideney Becker Onofre³

RESUMO

Os fungos entomopatogênicos são microrganismos causadores de doenças em insetos, principalmente os de importância agrícola, atuando no controle biológico de pragas em agroecossistemas, destacando o realizado por fungos entomopatogênicos. O controle biológico realizado por fungos vem sendo uma forma efetiva de controle de insetos que atacam as principais culturas no Brasil. No entanto, o controle das pragas e doenças da cultura da soja vem sendo realizado basicamente por produtos sintéticos, como os fungicidas, que podem ser negativos a esse método, inibindo o seu crescimento e a germinação dos esporos e a sua potencialidade de inóculo. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de dois fungicidas utilizados na cultura da soja, Nativo® e Sphere® sobre o crescimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. majus. Para discos de culturas desse fungo foram inoculados no centro da placa Petri contendo meio BDA com concentrações variadas dos dois fungicidas e incubadas por um período de 360 horas a uma temperatura de 28 ± 1 °C. A pesquisa realizada foi do tipo descritiva - exploratória com abordagem qualitativa. Os halos de crescimento foram medidos e comparados com o grupo controle. Os resultados mostraram que os fungicidas Nativo® cujos princípios ativos são a Trifloxistrobina + Tebuconazol e o Sphere® composto pelos princípios ativos Trifloxistrobina + Ciproconazol inibem o crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* var. majus nas concentrações avaliadas. Dessa forma pode-se concluir que esses fungicidas atuam de forma negativa inibindo a atividade desse fungo sobre os insetos pragas.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*; entomopatogênico; controle biológico; monoculturas.

EFFECTS OF FUNGICIDES ON THE GROWTH OF *Metarhizium anisopliae* VAR. MAJUS ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS (JOHNSTON) TULLOCH

ABSTRACT

The entomopathogenic fungi are microorganisms that cause diseases in insects of agricultural importance. These microorganisms work in biological control of pests in agricultural ecosystems. The biologic control by fungi has been an effective way to control insects that attack the main crops in Brazil. The control of pests and diseases of soybean crop has been accomplished primarily by synthetic products, such as fungicides. However, this method inhibits the growth of entomopathogenic fungi, spore germination and its inoculum potential. Thus, it does not allow the use of biologic control in soybean crop. This study aimed to evaluate the toxicity of two fungicides on growth of *Metarhizium anisopliae* var. majus: a) Native ® which has tebuconazole and trifloxystrobin as active ingredients; b) Sphere ® composed of trifloxystrobin cyproconazole. Fungus spores were inoculated at the center of Petri plates with BDA medium and different concentrations of Native ® and Sphere ® fungicides. Plates were incubated for 360 hours at 28 ± 1 °C. Growth were measured and compared with control group. Results showed that both Native® and Sphere ® fungicides inhibit in all concentrations the growth of *Metarhizium anisopliae* var. majus fungus. Thus we can conclude that these fungicides act negatively by inhibiting the activity of this fungus on insect pests.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*; entomopathogenic; biological control; monoculture.

INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* L.) Possui uma entomofauna bastante variada, sendo que alguns insetos acarretam sérios danos econômicos na lavoura, desta forma, a

cultura da soja está sujeita durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos-praga, tais como *Anticarsia gemmatilis* (Lagarta da soja), *Piezodorus guildinii* (Percevejo verde pequeno da soja), *Nezara viridula* (Percevejo verde da soja), *Epinotia*

¹ Bolsistas PIBIC/UNIPAR - Biólogas, graduada pela Universidade Paranaense - UNIPAR - Unidade Câmpus de Francisco Beltrão - PR - Brasil, E-mail: danusajanis@hotmail.com

² Bolsista PIBIC/UNIPAR - Acadêmica de Biomedicina da Universidade Paranaense - UNIPAR - Unidade Câmpus de Francisco Beltrão - PR - Brasil, E-mail: fran_yk@hotmail.com

³ Biólogo, Doutor em Processos Biotecnológicos - Professor Titular da Universidade Paranaense- UNIPAR - Unidade Câmpus de Francisco, PR - Brasil, E-mail: sideney@unipar.br

aporema (Broca das axilas), *Sternechus subsignatus* (Tamanduá da soja) e *Pseudoplysia includens* (Lagarta falsa medideira) entre outros (1).

Estes insetos têm suas populações reduzidas por predadores naturais que podem ser fungos ou bactérias que promovem o controle natural destes insetos - pragas em agroecossistemas, mantendo as populações das pragas abaixo do nível de danos econômicos.

O termo Controle Biológico foi denominado pela primeira vez em 1919, pelo pesquisador Harry S. Smith, para indicar o uso de inimigos naturais para o controle de insetos-praga (2). São referidos como fungos entomopatogênicos, os microrganismos causadores de doenças em insetos, especialmente em insetos de importância agrícola, os quais são considerados, como os principais responsáveis pela morte natural de insetos-praga em agroecossistemas, atuando desse modo no controle biológico de pragas. Os principais fungos entomopatogênicos encontrados em agrossistemas são: *Metarhizium anisopliae* variedade *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*, *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*, *Metarhizium anisopliae* var. *flavoviride*, *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, *Aspergillus ochraceus* entre outros (3).

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico que foi isolado primeiramente de insetos mortos (*Anisopliae austríaca*), na Ucrânia em 1879 pelo pesquisador Metschnikoff. Esta espécie foi o primeiro a ser produzido em ampla escala e utilizado no controle de insetos-praga. A classificação taxonômica do gênero *Metarhizium* em duas espécies foi inserida por Tulloch (1976), o qual aceitou apenas as espécies *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride*, sendo as demais espécies consideradas como variedade (4).

Os fungos entomopatogênicos apresentam ampla versatilidade ocasionando infecção a artrópodes que habitam solos, plantas e ambientes aquáticos e possuem um mecanismo de infecção especializado, além de, poder infectar diversos estágios de desenvolvimento dos hospedeiros. Geralmente a infecção ocorre devido à penetração via tegumento para a maioria dos fungos entomopatogênicos, o que os coloca em vantagem quando comparado com outros

patógenos, que só penetram no inseto via oral (3).

Dentro da espécie de *Metarhizium anisopliae*, destacamos a variedade *majus*, a qual está distribuída globalmente, sendo encontrado parasitando insetos de importância agrícola e também em solos com elevados níveis de matéria orgânica (5).

Recentemente o controle das pragas agrícolas, tem sido realizado basicamente por produtos químicos como, inseticidas, herbicidas e fungicidas. No entanto, o uso de fungicidas além de atuar sobre os fungos fitopatogênicos, comprometem o crescimento vegetativo, a viabilidade e a conidiogênese dos fungos entomopatogênicos ou até deformar sua composição genética, acarretando alterações na sua virulência. Sendo assim, o uso de produtos fitossanitários seletivos vem sendo considerado como uma alternativa simples e econômica de conservação dos fungos entomopatogênicos dentro dos agroecossistemas (3).

Dentre os produtos comerciais indicados para o controle de doenças fúngicas da cultura da soja, destacam-se os fungicidas comerciais, Nativo[®] e Sphere[®], sendo que ambos fazem parte do grupo químico das Estrobilurinas e Triazóis.

O fungicida Nativo[®], é constituído por Trifloxistrobina e Tebuconazol, vem sendo recomendado no controle do Oídio (*Erysiphe diffusa*), ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), crestamento foliar (*Cercospora kikuchii*), septoriose (*Septoria glycines*), antracnose (*Colletotrichum truncatum*) e mela (*Rhizoctonia solani*) na cultura da soja. Já o fungicida Sphere[®] cuja composição química é a Trifloxistrobina e Ciproconazol é recomendado para casos de Ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi*), Crestamento foliar (*Cercospora kikuchii*), Septoriose (*Septoria glycines*) e Oídio (*Microspora diffusa*).

As estrobilurinas provocam inibição da cadeia respiratória inibindo o complexo III, interrompendo a fosforilação oxidativa e interferindo na ação da ATP-sintase. Já os triazóis atuam inibindo a biossíntese do ergosterol, substância importante para manutenção da integridade da membrana celular das células fúngicas (6, 7, 8).



Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de dois fungicidas utilizados na cultura da soja, cujos nomes comerciais são Nativo[®] e Sphere[®] a fim de verificar se estes possuem interferência sobre o crescimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. majus - linhagem CG-27.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa realizada foi do tipo descritiva - exploratória com abordagem qualitativa.

A linhagem fúngica avaliada foi *Metarhizium anisopliae* var. majus linhagem CG-27, fornecido pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) - Piracicaba-SP, coletado em 1982.

Os ensaios foram conduzidos *in vitro*, em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), adicionando-se os produtos fungicidas em concentrações pré-estabelecidas ao meio de cultura fundido, ainda não solidificado.

Após a solidificação do meio de cultura contendo o fungicida foram realizadas as inoculações no centro das placas que consistiram em discos de seis milímetros contendo a linhagem fúngica de *M. anisopliae* var. majus com idade de seis dias. As placas com a cultura do fungo foram incubadas por 360 horas em temperatura de 28°C. (3).

A determinação do efeito tóxico foi realizada avaliando-se os parâmetros de crescimento vegetativo, utilizando-se o modelo de classificação de produtos fitossanitários quanto à toxicidade sobre fungos entomopatogênicos proposto por Alves et al.

(3), sendo que o crescimento vegetativo foi determinado medindo-se os diâmetros das colônias em dois sentidos ortogonais na superfície do meio de cultura, considerando-se o seu diâmetro médio (3).

Foram avaliados dois produtos comerciais recomendados no Brasil, para a cultura da soja no controle de doenças fúngicas. São eles, Nativo[®] cujos princípios ativos são: Trifloxistrobina + Tebuconazol, nas concentrações 2,5 mL/L (uso recomendado para campo) e 1.250 µL/L, 650 µL/L, 350 µL/L, 150 µL/L, 70 µL/L e 40 µL/L; e Sphere[®] cujos princípios ativos são: Trifloxistrobina + Ciproconazol, nas concentrações de 2,0 mL/L (uso recomendado para campo), 1.000 µL/L, 500 µL/L, 250 µL/L, 125 µL/L, 62,5 µL/L e 32 µL/L.

Os dados foram submetidos à análise de variância e quando necessário procedeu-se o teste de médias (Teste de Tukey ao nível de 5% de significância).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos após observação do crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* var. majus linhagem CG-27 em meio BDA (Figura 1), sob condições controladas e ausências de fungicidas encontram-se sumarizados na (Tabela 1). Seguido dos dados obtidos após observação do crescimento da linhagem CG-27 de *Metarhizium anisopliae* var. majus sob ação dos fungicidas Sphere[®] e Nativo[®], respectivamente, demonstrados pelas (Tabelas 2 e 3).



Figura 1. Características morfológicas da linhagem CG-27 de *Metarhizium anisopliae* var. *majus* em meio BDA.

Tabela 1. Crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* var. *majus* linhagem CG-27 em meio BDA, sob condições controladas e ausência de fungicidas.

Tempo de Observação (horas) / Halos de crescimento em mm*						
48	96	144	192	240	288	360
4,00±0,04a	11,50±0,10b	17,70±0,08c	22,70±0,11d	25,60±0,09d	30,10±0,08e	34,00±0,12e

*Valores seguidos da mesma letra, não diferem de forma significativa entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de confiabilidade.

Observando-se os dados contidos na Tabela 1, verifica-se que o fungo *Metarhizium anisopliae* var. *majus* linhagem CG-27 apresentou crescimento em todos os tempos observados. Notou-se que após 48 horas de incubação, o fungo formou halos de crescimento de 4,00±0,04 mm, chegando a 11,50±0,10, 17,70±0,08, 22,70±0,11, 25,60±0,09, 30,10±0,08 e 34,00±0,12, nos

tempos de 96, 144, 192, 240, 288 e 360 horas de crescimento, respectivamente. No entanto, nos tempos de 192 e 240 horas não houve diferença significativa no aumento do halo de crescimento. Esse mesmo comportamento foi observado nos tempos de 288 e 360 horas de crescimento. A cinética do comportamento deste fungo em meio BDA pode ser observada na (Figura 2).

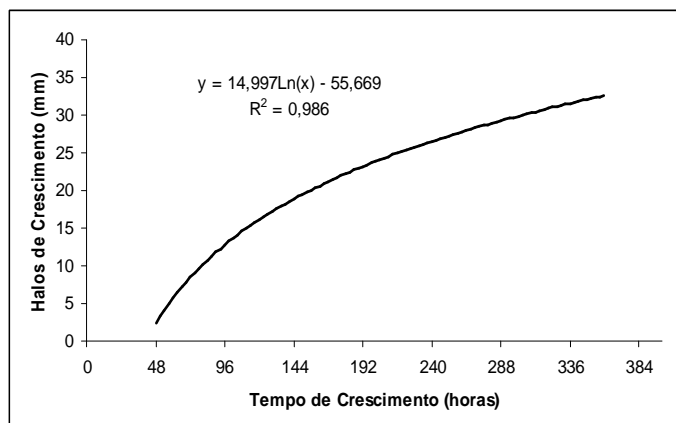


Figura 2. Cinética do crescimento microbiano do fungo *Metarhizium anisopliae* var. majus linhagem CG-27, representada pela equação de reta $y = 14,997\text{Ln}(x) - 55,669$ - $R^2 = 0,986$.

Analisando-se a Tabela 2, verifica-se que o fungo *Metarhizium anisopliae* var. majus linhagem CG-27 não se desenvolveu na concentração estabelecida para campo, na concentração de 2 mL/L para o fungicida Sphere[®], nem nas concentrações de 1000 µL/L

e 500 µL/L, porém, nas concentrações de 250; 125; 62,5 e 32 µL/L o fungo teve crescimento de $2,70 \pm 0,02$; $5,00 \pm 0,06$; $5,20 \pm 0,04$ e $8,00 \pm 0,07$ mm respectivamente.

Tabela 2. Crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* var. majus linhagem CG-27 em meio BDA na presença do fungicida Sphere[®] - 360 horas de crescimento.

Concentrações Avaliadas / Halos de crescimento em mm*						
2,0 *	1.000 #	500 #	250 #	125 #	62,5 #	32 #
NC	NC	NC	$2,70 \pm 0,02a$	$5,00 \pm 0,06b$	$5,20 \pm 0,04b$	$8,00 \pm 0,07c$

*Valores seguidos da mesma letra, não diferem de forma significativa entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de confiabilidade. * Concentração em mL/L. # Concentração em µL/L. NC – Não houve Crescimento.

Frente ao fungicida Nativo[®] (Tabela 3) a linhagem CG-27 de *Metarhizium anisopliae* var. majus também não se desenvolveu nas concentração de 2,5 mL/L que é estabelecida

para uso no campo, nem nas concentrações de 1.250, 650, 350, 150, 70 e 40 µL/L avaliadas. Apenas a concentração de 20 µL/L permitiu crescimento fúngico, sendo a medida do halo de $4,50 \pm 0,10$ mm.

Tabela 3. Crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* var. majus linhagem CG-27 em meio BDA na presença do fungicida Nativo[®] - 360 horas de crescimento.

Concentrações Avaliadas / Halos de crescimento em mm*							
2,5 *	1.250 #	650 #	350 #	150 #	70 #	40 #	20 #
NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	$4,50 \pm 0,10$

*Valores seguidos da mesma letra, não diferem de forma significativa entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de confiabilidade. * Concentração em mL/L. # Concentração em µL/L. NC – Não houve Crescimento.

Por meio da análise das (Tabelas 2 e 3), verifica-se que a Concentração Inibitória Mínima (CIM), obtida com as concentrações

avaliadas para o fungicida Sphere[®] foi de 500 µL/L e Nativo[®] foi de 40 µL/L.

Apesar do desenvolvimento fúngico diante dos fungicidas Sphere[®] e Nativo[®], os

valores dos halos de crescimento obtidos, são inferiores aos halos obtidos com o grupo controle ($34,00 \pm 0,12$ mm), nos mesmos tempos de observados. Conduzindo-nos a uma afirmação de que existe uma forte inibição no crescimento fúngico em presença dos dois fungicidas avaliados.

O produto comercial Nativo[®] composto de Trifloxistrobina + Tebuconazol pode ser classificado como um agente tóxico ao fungo, considerando o modo de ação dos seus princípios ativos, esses inibiram com maior intensidade o crescimento fúngico que o fungicida Sphere[®] que é composto pelos princípios ativos Trifloxistrobina + Ciproconazol.

Considerando que o princípio ativo Trifloxistrobina é comum aos dois fungicidas, possivelmente a maior toxicidade observada com o fungicida Nativo[®] deva-se ao efeito do Tebuconazol na formulação, sendo este, por seu modo de ação, uma molécula com maior atividade inibitória sobre o crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* var. *majus*, linhagem CG-27 que o princípio ativo Ciproconazol.

Em relação o modo de ação dos princípios ativos avaliados, as Estrobilurinas (Trifloxistrobina), possuem a ação translaminar, com ação específica sobre o patógeno e apresentam alto risco de resistência quando comparadas com os Triazóis (Ciproconazol e Tebuconazol). As Estrobilurinas interferem na respiração mitocondrial, ao bloquear a transferência de elétrons pelo complexo citocromo bc1, inibindo assim, a respiração celular do fungo (6).

As moléculas do grupo das Estrobilurinas agem preventivamente dificultando a germinação de esporos, oferecendo alguma ação curativa e inibindo o desenvolvimento dos fungos nas fases iniciais de pós-germinação, com atividade antiesporulante. As moléculas são absorvidas pelas folhas, atribuindo uma proteção na superfície por um período mais prolongado. Com o aumento da umidade o remanejamento superficial e absorção das moléculas são incrementados. As moléculas deste grupo também proporcionam difusão translaminar, são eficientes contra um grande número de fitopatógenos, em todas as classes de fungos, a baixas concentrações, permitindo um maior intervalo entre as aplicações (9).

Os Triazóis atuam na formação da biossíntese do ergosterol, que é um importante lipídio fúngico para o desenvolvimento da membrana das células. A falta desta camada induz o colapso da célula fúngica e à suspensão do crescimento micelial (7).

Os fungicidas Triazóis podem agir de forma protetora ou curativa, também proporcionam elevada fungitoxicidade, rápida penetração e translocação nos tecidos vegetais. Com o efeito curativo apresenta elevada função residual, como protetores oferecem ação tóxica à germinação de esporos (9).

A seletividade de agrotóxicos é um processo em que organismos como fungos desenvolvem tolerância a esses compostos. Este processo pode ser devido a vias metabólicas alternativas ou reações enzimáticas insensíveis à inibição por esses agrotóxicos (10).

Algumas formas de diminuir o efeito negativo dos fungicidas à utilização de fungos entomopatogênicos é a adoção conjunta de várias medidas de controle que minimizem a presença de fitopatógenos na cultura e, conseqüentemente, a necessidade de aplicações de fungicidas para seu controle como, por exemplo: utilização de sementes e mudas sadias, uso de variedades resistentes, manejo da irrigação, remoção de mudas e plantas doentes (11). Outra possibilidade pode ser obtida pulverizando-se o fungicida em intervalos de tempo de modo a não coincidir com as fases mais suscetíveis da interação entre o entomopatógeno e seu hospedeiro.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os fungicidas: Nativo[®] composto de Trifloxistrobina + Tebuconazol e Sphere[®] composto pelos princípios ativos Trifloxistrobina + Ciproconazol, inibem o crescimento e desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. *majus* linhagem CG-27 avaliado. Sugere-se, que novos estudos sejam realizados em ambiente de campo utilizando-se os fungicidas e o fungo analisado, para que haja a comprovação dos resultados encontrados *in vitro*.

Danusa de Freitas, Silvana Damin, Andréia Vilani, Cristiane Krasburg, Jéssica Alves de Queiroz, Francini Yumi Kagimura, Sideneý Becker Onofre

Endereço para correspondência: Sideneý Becker Onofre
Universidade Paranaense, Curso de Ciências Biológicas.

Departamento de Biologia

Industrial

85600-000 - Francisco Beltrao, PR - Brasil - Caixa-Postal: 265

E-mail: sideneý@unipar.br.

Recebido em 09/11/10

Revisado em 13/12/10

Aceito em 30/03/11

REFERÊNCIAS

- (1) BRASIL - Embrapa Soja. **Tecnologia de produção de soja Paraná 2009**. T. Manejo de insetos-praga. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producao soja P R/manejo i.htm>>. Acesso em: 06 out. 2010.
- (2) MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELLO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. v.1, 264p.
- (3) ALVES, S.B.; MOINO JÚNIOR, A.; ALMEIDA, J.E.M. **Produtos fitossanitários e entomopatogênicos**. In: ALVES, S.B (Ed.) Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: Fealq; 1998. p.217-238.
- (4) NAKAZATO, L. **Desenvolvimento de um sistema de expressão em *Metarhizium anisopliae* baseado no promotor homólogo do gene *tef - 1 α***. [Tese]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Centro de Biotecnologia Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Porto Alegre; 2005.
- (5) ONOFRE, S.B., VARGAS, L.R.B., ROSSATO, M., BARROS, N.M., BOLDO, J.T., NUNES, A.R.F., AZEVEDO, J.L. (2002). **Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos**. In. SERAFINI, L.A., BARROS, N.M., AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 433p.
- (6) GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 2000. 78 p. Relatório técnico.
- (7) JULIATTI, F.C. **Modo de ação dos fungicidas sobre plantas e fungos**. Departamento de Fitopatologia, ICIAG/Universidade Federal de Uberlândia; 2005. 18 p.
- (8) PARREIRA, D.F.; NEVES, W.S. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de Quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias Biológicas**, v.3, n.2, p.24-26, 2009.
- (9) RODRIGUES, M. A. T. **Avaliação do efeito fisiológico do uso de fungicidas na cultura de soja**. [Tese]. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba; 2009.
- (10) SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- (11) ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; LOPES, C.A.; VALE, F. X. R. Doenças de hortaliças em cultivo protegido. **Informe Agropecuário**, v.200, n.2, p.125-129, 1999.