

## BIOLOGICAL CONTROL

### Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com Agrotóxicos Visando o Controle da Cochonilha-da-Raiz-do-Cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae)

VANESSA ANDALÓ<sup>1</sup>, ALCIDES MOINO JR.<sup>1</sup>, LENIRA V.C. SANTA-CECÍLIA<sup>2</sup> E GISELLE C. SOUZA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto. Entomologia, Universidade Federal de Lavras, C. postal 37, 37200-000, Lavras, MG

<sup>2</sup>Epamig-CTSM/EcoCentro, C. postal 176, 37200-000, Lavras, MG

*Neotropical Entomology* 33(4): 463-467 (2004)

#### Compatibility of *Beauveria bassiana* with Chemical Pesticides for the Control of the Coffee Root Mealybug *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae)

**ABSTRACT** - Several chemical substances are used to control insects, diseases and weeds, however many of these products are toxic to mankind and the animals, besides reducing the potential of pest control by predators, parasitoids and pathogens. The integrated control using selective chemical pesticides and entomopathogenic fungi is a viable strategy, however some of these products can impact these microorganisms, reducing vegetative growth, viability and sporulation. The objectives of this work were to evaluate the effect of chemical pesticides used in the coffee crop on the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (isolate UEL 114), for the control of the coffee root mealybug. A fungal suspension of  $1 \times 10^7$  viable conidia/ml was added to solutions of the products at the recommended concentrations. After 1h, conidia were inoculated onto PDA medium, and quantification of germinated conidia assessed after 20h. The vegetative growth and sporulation were appraised eight days after the fungus inoculation onto PDA medium containing the products at recommended concentrations and maintained at the temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12h photofase and  $70 \pm 10\%$  relative humidity. The mean diameter of the colonies was measured and conidial production quantified in a Neubauer chamber. Azafenidyne, Quintozene, Symazine + Ametryne, 2,4-D, Acetochlor and Oxyfluorfen affected the conidial germination. Thiamethoxan, Imidacloprid, Carbofuran and Pencycuron were compatible; whereas Glyphosate, Dimetilurea, Azafenidine, Quintozene, Symazine + Ametryne, 2,4-D, Acetochlor and Oxyfluorfen significantly impacted vegetative growth and sporulation of *B. bassiana* UEL 114.

**KEY WORDS:** Biological control, *Coffea* spp., entomopathogenic fungus, subterranean pest

**RESUMO** - Várias são as substâncias químicas usadas no controle de insetos, doenças e plantas invasoras, porém muitos desses produtos são tóxicos ao homem e aos animais, além de reduzir o potencial de controle de predadores, parasitóides e entomopatogênicos. O controle integrado utilizando agrotóxicos seletivos e fungos entomopatogênicos é uma estratégia viável, porém alguns destes produtos podem atuar negativamente sobre estes microrganismos, reduzindo crescimento vegetativo, esporulação e viabilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de agrotóxicos aplicados na cultura do cafeeiro, sobre o fungo *Beauveria bassiana* (isolado UEL 114), visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro. Uma suspensão de  $1 \times 10^7$  conídios viáveis/ml do fungo foi adicionada a soluções dos produtos nas concentrações recomendadas. Após 1h, foi feito o plaqueamento em meio BDA, e a quantificação dos conídios germinados após 20h. O crescimento vegetativo e a esporulação foram avaliados oito dias após a inoculação do fungo em meio BDA contendo os produtos nas concentrações recomendadas, e mantido em câmara B.O.D. à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotofase de 12 h e umidade relativa de  $70 \pm 10\%$ . Foram medidos o diâmetro médio das colônias e quantificados os conídios produzidos em câmara de Neubauer. Azafenidine, quintozene, simazine + ametryne, 2,4-D, acetoclor e oxifluorfen afetaram a germinação dos conídios de *B. bassiana*. Tiametoxam, imidaclopride, carbofuran e pencycuron foram compatíveis; ao passo que glifosato, dimetilurea, azafenidine, quintozene, simazine + ametryne, 2,4-D, acetoclor e oxifluorfen reduziram significativamente o crescimento vegetativo e esporulação do isolado UEL 114 de *B. bassiana*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Controle biológico, *Coffea* spp., fungo entomopatogênico, praga subterrânea

A cultura do cafeeiro, devido à sua longa permanência no campo, passa por diferentes condições ambientais, tornando-se suscetível à ocorrência de grande número de artrópodos, com efeitos sobre o desenvolvimento, produção e qualidade do fruto (Martínez & Suris 2000).

A cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley, que também é conhecida como cochonilha farinhenta, tem sido encontrada com frequência em lavouras de café ocasionando danos severos, podendo causar até mesmo a morte da planta com até cinco anos, já que aquelas mais velhas, mesmo apresentando grande infestação, toleram o ataque da praga (Santa-Cecília et al. 2000).

Atualmente, várias são as substâncias químicas usadas no controle de insetos, doenças e plantas invasoras. Entre as principais estão os inseticidas e os fungicidas, porém muitos desses produtos são tóxicos ao homem e aos animais, além de reduzirem o potencial de controle de pragas por predadores, parasitoides e entomopatogênicos. A estratégia do controle associado ou integrado pode ser utilizada, e neste caso, agrotóxicos seletivos são usados juntamente com fungos entomopatogênicos ou outros agentes de controle biológico. Entretanto, alguns desses produtos podem influenciar os microrganismos, como no caso dos fungos, nos quais o crescimento vegetativo, a viabilidade e a esporulação, ou até mesmo a composição genética podem ser modificados, alterando a sua virulência (Alves et al. 1998a).

Os inseticidas exercem pressão de seleção sobre insetos-praga, ocorrendo também sobre populações de insetos benéficos, como inimigos naturais das pragas e polinizadores, podendo selecionar uma população resistente ao produto após sucessivas aplicações no campo, eliminando apenas os indivíduos mais sensíveis ao produto químico (Rosenheim & Hoy 1986). Os fungos estão entre os inimigos naturais que podem sofrer influência na aplicação de agrotóxicos, que devido à sua grande diversidade e sua intensa capacidade de multiplicação, oferecem uma ampla oportunidade para selecionar linhagens resistentes (Ghini & Kimati 2000).

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de agrotóxicos utilizados via solo na cultura do cafeeiro sobre o fungo *Beauveria bassiana*, que mostrou potencial para controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro em estudos anteriores, visando seu uso como bioinseticida em agroecossistemas que utilizem agrotóxicos.

## Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras/MG. Os agrotóxicos utilizados foram os descritos na Tabela 1, recomendados para a cultura do cafeeiro.

O isolado de *B. bassiana* utilizado foi UEL 114, selecionado previamente através de bioensaios de patogenicidade e virulência à cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro (V. Andaló não publicado). O fungo foi inoculado em placas de Petri contendo meio para produção de esporos de *Beauveria* spp. e *Nomuraea rileyi* (ME) (Alves et al. 1998b) e incubado em câmara climatizada B.O.D. à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotofase de 12h e umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  por 10 dias, até plena esporulação, quando os conídios foram usados para os bioensaios de compatibilidade.

Primeiramente foi feita a avaliação da germinação dos conídios, na qual as formulações dos agrotóxicos foram dissolvidas em 10 ml de água destilada esterilizada (ADE) + espalhante adesivo Tween 80 (0,1%) contendo conídios do fungo suspensos, à concentração de  $10^7$  conídios viáveis/ml. Uma alíquota de 0,1 ml foi retirada de cada suspensão após 1h, e espalhada em quatro placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) com auxílio de uma alça de Drigalsky. No tratamento testemunha não foram adicionados agrotóxicos na suspensão. As placas foram mantidas em câmara B.O.D. nas mesmas condições usadas para o crescimento do fungo, por 20h. Após este período foi quantificada a porcentagem de conídios germinados sob

Tabela 1. Agrotóxicos utilizados nos experimentos e registrados para a cultura do cafeeiro (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2002).

Nome					
Comercial	Formulação	Técnico	Uso <sup>1</sup>	Grupo químico	Diluição média (p.c./volume) <sup>2</sup>
Monceren	PM	Pencicrom	F	Feniluréia	100 g/100 L
Plantacol	PM	Quintozene	F	Cloroaromático	750 g/100 L
Actara250	WG	Tiametoxam	I	Nicotinóide	3000 g/300 L
Furadan350	SC	Carbofuran	I/N	Carbamato	6 L/1000 L
Premier	WG	Imidaclopride	I	Nicotinóide	1150 g/300 L
DMA806	CS	2,4-D	H	Fenoxiacéticos	3,5 L/300 L
Fist	CE	Acetoclor	H	Cloroacetanilida	4 L/300 L
Goal BR	CE	Oxifluorfem	H	Éter difenílico	6 L/300 L
Ranger	WG	Azafenidine	H	Triazolona	600 L/300 L
Topeze	SC	Simazine+ametrine	H	Triazina	8 L/300 L
Roundup	CS	Glifosato	H	Glicina substituída	6 L/300 L
Karmex 110	WG	Dimetilurea	H	Uréias substituídas	4 kg/300 L

<sup>1</sup>A = acaricida; I = inseticida; F = fungicida; N = nematocida

<sup>2</sup>Diluições indicadas pelos fabricantes, para aplicação em 1 ha.

microscópio óptico com aumento de 400 vezes (cinco campos por placa de Petri), segundo metodologia adaptada de Neves *et al.* (2001). Os dados obtidos foram transformados por  $\sqrt{x/100}$  e submetidos à análise de variância e teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ) para comparação entre as médias.

Os outros parâmetros avaliados foram o crescimento vegetativo e a esporulação. Neste estudo, as quantidades recomendadas pelos fabricantes dos agrotóxicos (Tabela 1) foram adicionadas em 200 ml de meio de cultura ME fundido, ainda não solidificado, e depois vertido em placas de Petri. Depois de solidificado o meio, o fungo foi inoculado em três pontos equidistantes por placa, com auxílio de uma alça de platina. Foram utilizadas quatro placas por tratamento. As placas foram incubadas em câmara B.O.D. nas mesmas condições do estudo anterior. Após oito dias foram selecionadas, aleatoriamente, seis colônias por tratamento; estas foram medidas com uma régua em dois sentidos transversais, determinando-se o diâmetro médio das colônias. Em seguida, as colônias foram recortadas com um bisturi para a quantificação dos conídios. Cada colônia foi colocada em um tubo de vidro e a ela foram adicionados 10 ml de ADE + Tween 80 (0,1%), agitando-se por cerca de dois minutos em vortex, até a retirada dos conídios da superfície do meio recortado. Foram feitas as diluições necessárias para quantificar os conídios com auxílio de uma câmara de Neubauer.

Os dados obtidos de crescimento vegetativo e esporulação foram transformados por  $\sqrt{x + 0,5}$  e submetidos à análise de variância e teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), para comparação entre as médias. Utilizou-se o sistema de classificação do nível de toxicidade (valor "T"), de acordo com metodologia proposta por Alves *et al.* (1998a), para determinar a toxicidade dos produtos testados ao isolado UEL 114 do fungo *B. bassiana*. Esse método é baseado nos valores médios em porcentagem de esporulação e crescimento vegetativo das colônias dos fungos para testes *in vitro* realizados em meio sólido, em que são calculados os valores em relação à testemunha (100%). Os valores de T são classificados de forma que para a faixa de 0 a 30 o produto é considerado muito tóxico, de 31 a 45 é considerado tóxico, de 46 a 60 é considerado moderadamente tóxico, e para valores acima de 60, é considerado compatível com o fungo estudado.

## Resultados e Discussão

Nos resultados obtidos para germinação dos conídios não houve diferenças entre a testemunha e os tratamentos com imidaclopride, glifosato, tiametoxam, pencicurom, dimetilurea e carbofuram, mostrando que não houve efeito prejudicial sobre a viabilidade dos conídios do fungo *B. bassiana*. Verificou-se redução na germinação de *B. bassiana* nos tratamentos com azafenidine, quintozene, simazine + ametrine, acetoclor, oxifluorfem e 2,4-D, os quais apresentaram diferenças em relação à testemunha, principalmente no caso dos últimos três últimos agrotóxicos citados, que devido à ação fungicida não permitiram a germinação dos conídios (Tabela 2).

Neves *et al.* (2001) avaliaram a compatibilidade de três inseticidas neonicotinóides com *B. bassiana*, *Metarhizium*

Tabela 2. Viabilidade média (n = 4) de conídios do fungo entomopatogênico *B. bassiana* na presença de agrotóxicos utilizados via solo na cultura do cafeeiro (Temperatura = 25 ± 1°C; Fotofase = 12h; UR = 70 ± 10%).

Tratamento	Formulação	Germinação (%)
Testemunha		96,9 ± 0,84 a
Imidaclopride	WG	96,7 ± 1,58 a
Glifosato	CS	94,3 ± 0,55 ab
Tiametoxam	WG	94,1 ± 1,46 ab
Pencicurom	PM	93,9 ± 1,24 ab
Dimetilurea	WG	92,7 ± 0,40 ab
Carbofuram	SC	91,3 ± 1,66 ab
Azafenidine	WG	86,5 ± 4,87 bc
Quintozene	PM	75,7 ± 3,49 cd
Topeze	SC	70,3 ± 1,42 d
Acetoclor	CE	0 e
Oxifluorfem	CE	0 e
DMA	CS	0 e
CV (%)		6,87

Médias (± EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05) (n = 4).

*anisopliae* e *Paecilomyces fumosoroseus*, estando entre eles tiametoxam e imidaclopride. Estes inseticidas não afetaram a viabilidade dos conídios de *B. bassiana*, o que é ratificado pelos resultados encontrados neste trabalho. A elevada germinação de conídios cultivados na presença de alguns produtos pode ter ocorrido devido à degradação e metabolização dos princípios tóxicos das moléculas químicas pelo fungo (Alves *et al.* 1998a).

Os resultados obtidos referentes ao crescimento vegetativo e esporulação de *B. bassiana*, quando inoculado em meio de cultura BDA contendo agrotóxicos, são apresentados na Tabela 3. Para o crescimento vegetativo, não houve diferença significativa entre a testemunha e os tratamentos com tiametoxam, imidaclopride, carbofuram e pencicurom. Glifosato e azafenidine apresentaram pequena redução do crescimento vegetativo em relação à testemunha, seguidos de quintozene e dimetilurea. Os tratamentos com acetoclor, 2,4-D e simazine + ametrine afetaram o crescimento vegetativo do fungo; no tratamento inoculado com oxifluorfem, não houve crescimento vegetativo do fungo inoculado no meio de cultura (Tabela 3).

Em relação à esporulação, não houve diferença significativa entre a testemunha e o tratamento com tiametoxam, confirmando-se o ocorrido com relação à germinação e ao crescimento vegetativo. Imidaclopride e carbofuram apresentaram pequena redução na esporulação do fungo, seguidos dos tratamentos com pencicurom, glifosato, azafenidine, quintozene e dimetilurea; os tratamentos que provocaram maior inibição da esporulação foram simazine + ametrine, 2,4-D, acetoclor e oxifluorfem, sendo que este último impediu a esporulação do fungo (Tabela 3).

Pelos resultados apresentados na tabela de classificação de agrotóxicos quanto à toxicidade dos mesmos ao fungo

Tabela 3. Diâmetro médio de colônia (cm) e número médio de conídios produzidos por colônias de *B. bassiana* (n = 6) na presença de agrotóxicos (Temperatura = 25 ± 1°C; Fotofase = 12h; UR = 70 ± 10%).

Tratamento	Formulação	Diâmetro (cm) <sup>1</sup>	Conídios (x 10 <sup>7</sup> )
Testemunha		2,9 ± 0,02 a	4,9 ± 0,12 a
Tiametoxam	WG	2,9 ± 0,03 a	4,7 ± 0,11 ab
Imidaclopride	WG	2,9 ± 0,05 a	4,4 ± 0,05 bc
Carbofuram	SC	2,9 ± 0,03 a	4,2 ± 0,18 c
Pencicuirom	PM	2,7 ± 0,09 a	2,7 ± 0,01 d
Glifosato	CS	1,7 ± 0,03 b	2,3 ± 0,01 de
Azafenidine	WG	1,5 ± 0,03 b	1,3 ± 0,01 ef
Quintozene	PM	1,1 ± 0,06 c	0,3 ± 0,01 ef
Dimetilurea	WG	0,9 ± 0,02 c	0,2 ± 0,02 f
Acetoclor	CE	0,4 ± 0,02 d	0,1 ± 0,01 g
DMA	CS	0,3 ± 0,03 d	0,1 ± 0,01 g
Topeze	SC	0,3 ± 0,04 d	0,1 ± 0,01 g
Oxifluorfem	CE	0 e	0 g
CV (%)		2,80	3,22

Médias (± EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05). (n = 6).

entomopatogênico *B. bassiana* (Tabela 4), verifica-se que os inseticidas tiametoxam, imidaclopride e carbofuram, assim como o fungicida pencicuirom, foram compatíveis com o isolado UEL 114. O herbicida glifosato foi considerado moderadamente tóxico e o herbicida azafenidine, tóxico. O fungicida quintozene e os herbicidas dimetilurea, simazine + ametrine, acetoclor, 2,4-D e oxifluorfem foram considerados muito tóxicos ao fungo estudado. Assim, estes resultados confirmam que determinados agrotóxicos alteram o desenvolvimento de *B. bassiana*, sendo necessária precaução quando utilizados no manejo integrado de pragas e doenças, caso exista o uso conjunto com este fungo.

Batista Filho *et al.* (2001) evidenciaram que tiametoxam foi compatível com 10 microrganismos testados. Neves *et al.* (2001) mostraram que os produtos tiametoxam e imidaclopride

Tabela 4. Valores de T e classificação dos agrotóxicos recomendados para a cultura do cafeeiro, quanto à toxicidade ao fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

Tratamento	Formulação	T <sup>1</sup>	Classificação <sup>1</sup>
Tiametoxam	WG	96,65	Compatível
Imidaclopride	WG	91,35	Compatível
Carbofuram	SC	88,32	Compatível
Pencicuirom	PM	62,98	Compatível
Glifosato	CS	49,72	Moderadamente tóxico
Azafenidine	WG	32,26	Tóxico
Quintozene	PM	11,74	Muito tóxico
Dimetilurea	WG	10,17	Muito tóxico
Fist	CE	3,87	Muito tóxico
Acetoclor	CS	3,53	Muito tóxico
Simazine+ametrine	SC	3,53	Muito tóxico
Oxifluorfem	CE	0	Muito tóxico

<sup>1</sup>Valores de T segundo Alves *et al.* (1998a): entre 0 e 30 = muito tóxico; entre 31 e 45 = tóxico; entre 46 e 60 = moderadamente tóxico; maiores que 60 = compatível

foram compatíveis com o fungo *B. bassiana*, o mesmo tendo sido demonstrado por Loureiro *et al.* (2002). Moino Jr. & Alves (1998) verificaram que o inseticida imidaclopride não causou efeitos prejudiciais sobre a esporulação e crescimento vegetativo dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Portanto os resultados obtidos no presente estudo são similares aos dados obtidos em trabalhos anteriores.

No tocante à utilização de *B. bassiana* para o controle de pragas de solo, em especial no caso da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro, cuidados especiais devem ser tomados no sentido de utilizar produtos seletivos ou compatíveis, visando não inviabilizar o efeito do fungo entomopatogênico no controle da praga. Além disso, os testes *in vitro* mantêm o patógeno exposto ao máximo ao produto fitossanitário, o que não ocorre em condições de campo, já que ocorrem fatores externos que agem sobre o produto, principalmente radiação solar, deriva e ventos, amenizando a ação do princípio ativo sobre o fungo (Cavalcanti *et al.* 2002). Dessa forma, espera-se que produtos considerados compatíveis nesse tipo de teste também o sejam quando aplicados em condições de campo.

### Literatura Citada

Alves, S.B., A. Moino Jr. & J.E.M. Almeida. 1998a. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos, p. 217-238. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. 2ª. ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

Alves, S.B., J.E.M. Almeida, A. Moino Jr. & L.F.A. 1998b. Técnicas de laboratório, p. 637-711. In S. B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. 2ª. ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

Batista Filho, A., J.E.M. Almeida & C. Lamas. 2001. Effect of thiamethoxan on entomopathogenic microorganisms. Neotrop. Entomol. 30: 437-447.

- Cavalcanti, R.S., A. Moino Jr., G.C. Souza & A. Arnosti. 2002.** Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Arq. Inst. Biol. 69:17-22.
- Ghini, R. & H. Kimati. 2000.** Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna, EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 78p.
- Loureiro, E.S., A. Moino Jr., A. Arnosti & G.C. Souza. 2002.** Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. Neotrop. Entomol. 31: 263-269.
- Martínez, M.A. & M. Suris. 2000.** Bases bioecológicas para el manejo de chinches harinosas en el cultivo del café en Cuba. Man. Integ. Plagas 57: 58-64.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2002.** Agrofit. Brasília. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agrofit>>.
- Moino Jr., A. & S.B. Alves. 1998.** Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). An. Soc. Entomol. Brasil 27: 611-619.
- Neves, P.M.O.J., E. Hirose, P.T. Tchujo & A. Moino Jr. 2001.** Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoids inseticides. Neotrop. Entomol. 30: 263-268.
- Rosenheim, J.A. & M.A. Hoy. 1986.** Intraspecific variation in levels of resistance in field populations of a parasitoid, *Aphis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae): the role of past selection pressures. J. Econ. Entomol. 79: 1161-1173.
- Santa-Cecília, L.V.C., J.C. Souza & P.R. Reis. 2000.** Novas constatações da cochonilha-da-raiz *Dysmicoccus cryptus* em lavouras de café no Sul de Minas Gerais. Circular Técnica n. 130. Lavras, EPAMIG. 2p.

Received 10/04/03. Accepted 15/04/04.

---