

BIOLOGICAL CONTROL

Seletividade de Defensivos Agrícolas ao Fungo Entomopatogênico *Beauveria bassiana*

SHEILA A. MOURÃO¹, EVALDO F. VILELA¹, JOSÉ C. ZANUNCIO^{1,3}, LAÉRCIO ZAMBOLIM² E EDMAR S. TUELHER¹

¹Depto. Biologia Animal, Entomologia, ²Depto. Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG

³E-mail: zanuncio@ufv.br

Neotropical Entomology 32(1):103-106 (2003)

Selectivity of Insecticides and Fungicides to the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*

ABSTRACT - The relative toxicity of the insecticides organophosphates methyl-chlorpyrifos, disulfoton, ethion, methyl-parathion, the organochlorinate endosulfan and the mixture of the fungicide triadimenol and the insecticide disulfoton and the sterol demethylation inhibitor fungicide (triadimenol and tebuconazole) to the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin was evaluated. Concentrations which inhibited radial mycelium growth (99%) of *B. bassiana* were 0.42; 1.69; 6.53; 14.42; 31.75; 7,028.96; 10,326.76 e 763,959.86 mg i.a/ml of tebuconazole, methyl-parathion, triadimenol, triadimenol + disulfoton, methyl-chlorpyrifos, ethion, endosulfan and disulfoton, respectively. The effects of these products were evaluated based on percentage of inhibition of radial mycelium growth of *B. bassiana* on potato dextrose-agar impregnated with them, after seven days. Tebuconazole, methyl-parathion and methyl-chlorpyrifos were highly toxic to *B. bassiana*; endosulfan and triadimenol + disulfoton were moderated toxic; while triadimenol, ethion, and disulfoton were selective to this fungi.

KEY WORDS: Toxicity, natural enemy, coffee berry borer, biological control

RESUMO - A toxicidade relativa dos inseticidas organofosforados clorpirifós-metílico, dissulfotom, etiom, paratiom-metílico, do organoclorado endosulfam, da mistura do fungicida triadimenol e do inseticida dissulfotom e dos fungicidas inibidores da demetilação de esteróis triadimenol e tebuconazole ao fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin foi estudada em laboratório. As concentrações dos pesticidas que inibiram 99% do crescimento micelial desse fungo, em miligramas de ingrediente ativo por ml foram: tebuconazole = 0,42; paration-metílico = 1,69; triadimenol = 6,53; triadimenol + dissulfotom = 14,42; clorpirifós-metílico = 31,75; etiom = 7.028,96; endosulfam = 10.326,76 e dissulfotom = 763.959,86. As equações de regressão da inibição do crescimento micelial (%), em função da concentração obtida por ensaio *in vitro* em meio batata-destrose-ágar (BDA) impregnado com os ingredientes ativos desses compostos, foram usadas para se estimar a seletividade das concentrações prescritas para cafezais, pelos seus respectivos fabricantes. Tebuconazole, paratiom-metílico e clorpirifós-metílico foram altamente tóxicos ao fungo *B. bassiana*; endosulfam e triadimenol + dissulfotom apresentaram seletividade moderada e triadimenol, etiom e dissulfotom foram seletivos para esse fungo.

PALAVRAS-CHAVE: Toxicidade, inimigo natural, broca-do-café, controle biológico

A broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) causa prejuízos quantitativos, como perda de peso dos grãos e queda de frutos, além de qualitativos, como a redução da qualidade do café, alteração no tipo e, às vezes, da bebida (Souza *et al.* 1981, IBC 1986).

Os cafezais apresentam muitas espécies de insetos, ácaros e fungos, algumas das quais são pragas de importância econômica, enquanto a maioria não chega a causar prejuízo, por serem mantidas sob controle por

inimigos naturais (Bustillo 1990). O ressurgimento de pragas-chave, o aparecimento de pragas secundárias e a resistência de pragas pelo uso contínuo do controle químico nos agroecossistemas estão relacionados à destruição de agentes de controle natural e levam, inevitavelmente, ao aumento nas doses dos produtos químicos e agravamento da situação (van den Bosch *et al.* 1982, Bustillo 1990).

Fungos entomopatogênicos podem ser inibidos por agrotóxicos, o que pode comprometer o manejo integrado (Fernandes *et al.* 1985, Alves 1986). Por isto, devem-se buscar

soluções que conciliem alta produtividade, baixa relação custo/benefício e preservação do ambiente, pois estudos de impacto ou efeito de inseticidas sobre inimigos naturais de pragas são econômica e ambientalmente importantes. Desta forma, devem-se utilizar defensivos agrícolas seletivos a fungos entomopatogênicos em programas de manejo integrado da broca-do-café.

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 (Pelczar *et al.* 1980). Outros mecanismos de tolerância de microrganismos a pesticidas podem incluir a inibição competitiva entre um metabólito essencial e um análogo (pesticida); ao desenvolvimento de via metabólica alternativa que evite alguma reação normalmente inibida pelo pesticida; à produção de uma enzima alterada para funcionar em benefício da célula, mas não sendo afetada pelo pesticida; à síntese de uma enzima, em excesso, ultrapassando a quantidade que pode ser inativada pelo antimicrobiano; à dificuldade do agrotóxico em penetrar na célula, por alguma alteração da membrana citoplasmática e à modificação estrutural das nucleoproteínas ribossômicas (Pelczar *et al.* 1980, Cook 1985).

Como o fungo entomopatogênico *B. bassiana* é inimigo natural da broca-do-café nos agroecossistemas cafeeiros, objetivou-se estudar a seletividade dos agrotóxicos mais utilizados em cafezais brasileiros, como os inseticidas organofosforados clorpirifós-metílico, dissulfotom, etiom, paratiom-metílico e o organoclorado endosulfam, além da mistura do fungicida e do inseticida triadimenol + dissulfotom e os fungicidas inibidores da demetilação de esteróis triadimenol e tebuconazole ao fungo *B. bassiana*.

Material e Métodos

A estirpe 447 do fungo *B. bassiana*, aquela com maior potencial patogênico à broca-do-café, foi cedida pelo Professor Sérgio Batista Alves, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” em Piracicaba, São Paulo. O fungo foi repicado em tubos de ensaio com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 5\%$, em ausência de luz durante 14 dias. Foram retirados, desses tubos, esporos em suspensão e semeados em placas em meio de cultura BDA, que foram incubadas sob as mesmas condições da etapa anterior.

Foram conduzidos testes preliminares com concentração de 1 mg i.a./ml para todos os agrotóxicos, após o qual, discriminou-se a menor concentração de cada um deles, onde se esperava que ocorresse o menor desenvolvimento do fungo (extremo superior), e a maior concentração, que não interferisse no desenvolvimento dos micélios (extremo inferior). Em seguida, foram traçadas concentrações intermediárias entre esses dois extremos.

Foram determinadas, a seguir, as concentrações utilizadas para as curvas de concentração-resposta de cada um dos tratamentos, que foram (em mg i.a./ml) de:

clorpirifós-metílico (10^{-2} , 10^{-1} , 1, 5, 10); dissulfotom (10^{-1} , 10^{-2} , 10, 5, 1); endosulfam (10^{-2} , 10^{-1} , 1, 5, 10); etiom (1, 5, 10, 50, 100); paratiom-metílico (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 5); tebuconazole (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1}), triadimenol (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 5) e triadimenol+dissulfotom (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 5). Foram feitos então, testes definitivos de concentração-resposta, com cinco placas de Petri para cada concentração, além das consideradas extremas, em processo idêntico ao dos bioensaios preliminares. A equação de regressão da curva de concentração-resposta para cada agrotóxico foi estimada com base nos resultados. As equações de regressão, das curvas de percentual de inibição micelial para a estirpe 447 do fungo *B. bassiana*, foram usadas para se estimar a seletividade de cada pesticida ao entomopatógeno, com as concentrações prescritas para uso comercial desses produtos em cafezais.

Os inseticidas e a acetona, utilizada como solvente, eram em grau técnico. Esse solvente foi utilizado na elaboração de concentrações-estoque de 100 mg/ml, e na obtenção das concentrações desejadas dos pesticidas. As soluções inseticidas foram introduzidas no meio de cultura BDA a 50°C e, em seguida, nas placas de Petri antes da solidificação desse meio para execução dos testes. Após o resfriamento do meio, foi colocado no centro de cada placa, um disco de 4 mm de diâmetro de *B. bassiana*, retirado da borda da colônia fúngica. Isto foi feito aproximadamente, 48 horas após a repicagem, antes da esporulação do fungo, para se evitar a contaminação das unidades experimentais. As placas de Petri foram incubadas a 25°C , em ausência de luz, durante sete dias, sendo a testemunha constituída por placas de Petri com BDA e acetona técnica. Cada tratamento foi avaliado em dois ou três ensaios, com cinco repetições por ensaio.

O diâmetro da colônia fúngica, em cada placa de Petri, foi avaliado sete dias após a incubação em direções perpendiculares, sendo subtraídos 4 mm como fator de correção, correspondente ao diâmetro inicial do disco de cultura. Estimou-se, também, para cada unidade experimental, a percentagem de inibição (I) do crescimento micelial radial com a seguinte equação:

$$I(\%) = \left\{ 1 - \left(\frac{\text{diâmetro da unidade experimental}}{\text{diâmetro médio da testemunha}} \right) \right\} \times 100$$

Foram estimadas as CL_{50} e CL_{99} (concentrações letais que inibem 50% e 99% do crescimento micelial radial do fungo, respectivamente), com equações de regressão da percentagem de inibição em função da concentração [ou log (concentração)] e aplicadas as maiores concentrações de ingredientes ativos prescritas pelos fabricantes para o controle de pragas e/ou doenças em cafezais. As percentagens de inibição $I(\%)$ das doses de cada tratamento dos pesticidas foram submetidas à análise de regressão simples e obtidas as equações das curvas de inibição micelial. Foi aplicado o teste de Tukey (5%) para a inibição em percentagem do desenvolvimento micelial do fungo em presença de concentrações diferentes de acetona técnica, observando-se que as médias não diferiram entre si. A análise estatística foi realizada com o programa SAEG 4.0.

Resultados

As concentrações dos agrotóxicos que inibiram 99% do crescimento micelial de *B. bassiana* (CL₉₉) em miligramas de ingrediente ativo por ml foram: tebuconazole = 0,42; paratiom-metílico = 1,69; triadimenol = 6,53; triadimenol+dissulfotom = 14,42; clorpirifós-metílico = 31,75; etiom = 7.028,96, endossulfam = 10.326,76 e dissulfotom = 763.956,86 (Tabela 1). A DL₉₉ variou, bastante, entre agrotóxicos, com maior poder de inibição dos produtos nas menores concentrações.

As concentrações prescritas para cafezais (I_(PC) %), pelos fabricantes dos agrotóxicos (Tabela 2), ocasionaram diferenças significativas no percentual de inibição do crescimento micelial de *B. bassiana*. Tebuconazole não foi seletivo a *B. bassiana*, pois inibiu 100% do crescimento micelial desse fungo. Paratiom-metílico e clorpirifós-metílico tiveram baixa seletividade ao patógeno, com inibição de 86,4% e 83,8% do crescimento micelial. Níveis intermediários de seletividade foram verificados para endossulfam e triadimenol + dissulfotom com, respectivamente, 46,6% e 36,4% de inibição de desenvolvimento micelial de *B. bassiana*. Etiom, triadimenol e dissulfotom foram seletivos para o fungo, principalmente dissulfotom, enquanto etiom e triadimenol apresentaram seletividade moderada a *B. bassiana*, com inibição de 21,7% e 18,5% do crescimento micelial do fungo (Tabela 2).

Discussão

A inibição do fungo entomopatogênico *B. bassiana* variou entre tratamentos com maior seletividade dos organofosforados. Os mecanismos de inibição do fungo não foram, ainda, adequadamente esclarecidos. Os resultados concordam com os obtidos por Fragozo *et al.* (2001) que constataram elevada toxicidade de paratiom-metílico e de clorpirifós-metílico, além de alta seletividade de dissulfotom e etiom a *Brachygastra lecheguana*, *Polybia paulista* e *Polybia exigua* (Hymenoptera: Vespidae) que à sua presa *Leucoptera coffeella* (Güerin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae).

Embora os inseticidas organofosforados possam apresentar alta toxicidade a muitas espécies de inimigos naturais, esse grupo de inseticida incluindo aqueles testados, apresenta o maior número de casos de seletividade fisiológica a inimigos naturais, como inseticidas sistêmicos organofosforados (Croft 1989), cuja a seletividade fisiológica merece ser melhor estudada. Fukuto (1984) atribuiu a atividade pró-inseticida desses compostos como um dos fatores responsáveis por sua seletividade e ocorre para muitos inseticidas organofosforados, que passam a formas mais tóxicas, como o dissulfotom e paratiom-metílico, após penetrarem nos organismos.

Tabela 1. Equações das curvas de inibição do crescimento micelial radial (CL₅₀, CL₉₉, r²) do fungo entomopatogênico *B. bassiana* por inseticidas e/ou fungicidas. Temperatura (25 ± 1°C) e umidade relativa do ar (70 ± 5%), em ausência de luz durante 14 dias

Fungicidas/Inseticidas	n	Equação	CL ₅₀ (mg.ml ⁻¹)	CL ₉₉ (mg.ml ⁻¹)	r ² (%)	Signf.
Clorpirifós-metílico	5	74,811 + 16,107 log dose	0,03	31,75	99,05	0,0002
Dissulfotom	5	28,109 + 12,025 log dose	65,57	763.959,86	98,58	0,0004
Endossulfam	6	40,079 + 14,679 log dose	4,74	10.326,79	96,91	0,0002
Etiom	6	8,579 + 23,505 log dose	57,84	7.028,96	94,29	0,0012
Paratiom-metílico	5	92,609 + 27,961 log dose	0,03	1,69	87,12	0,0066
Tebuconazole	5	105,464 + 17,179 log dose	0,001	0,42	94,14	0,0061
Triadimenol	5	82,756 + 19,932 log dose	0,02	6,53	96,47	0,0028
Triadimenol + dissulfotom (1:5)	5	79,539 + 16,792 log dose	0,02	14,42	86,18	0,0032

n = Números de colônias de *B. bassiana* e diâmetro por tratamento no ensaio

Tabela 2. Efeito das concentrações prescritas pelos fabricantes e doses dos produtos comerciais (CL_{s_{PC}}, CL₅₀, CL_{s₉₉}) e inibição percentual (I_(PC) %) do crescimento micelial radial de colônias de *B. bassiana*. Temperatura (25 ± 1°C) e umidade relativa do ar (70 ± 5%), em ausência de luz durante 14 dias

Fungicidas/inseticidas	Produto comercial CE (g i.a./l) ou GR (g i.a./kg)	Recomendação (mg i.a./ha)	Diluição (ml/ha) ou (cm ³ /ha)	CL ₅₀ (mg.ml ⁻¹)	CL ₉₉ (mg.ml ⁻¹)	CL _{s_{PC}} (mg.ml ⁻¹)	I _(PC) %
Clorpirifós-metílico	Lorsban CE 480	720.000	200.000	0,03	31,75	3,60	83,77
Dissulfotom	Baysiston GR 70	4.200.000	2,0 x 10 ⁹	65,57	763.959,86	0,0021	-4,09
Endossulfam	Thiodan CE 350	700.000	250.000	4,74	10.326,79	2,80	46,64
Etiom	Ethion CE 500	725.000	200.000	57,84	7.028,96	3,63	21,74
Paratiom-metílico	Folidol CE 600	120.000	200.000	0,03	1,69	0,60	86,41
Tebuconazole	Folicur CE 200	200.000	200.000	0,001	0,42	1,00	100,00
Triadimenol	Photon GR 60	1.200.000	2,0 x 10 ⁹	0,02	6,53	0,0006	18,54
Triadimenol + Dissulfotom (1:5)	Baysiston GR 90	5.400.000	2,0 x 10 ⁹	0,02	14,42	0,0027	36,41

I_(PC) %, CL₅₀ e CL₉₉ estimadas por equações de regressão da inibição (%) do crescimento micelial de *B. bassiana* em função da dose escrita na tabela 1

A alta toxicidade de tebuconazole a *B. bassiana* pode ser atribuída à alta potência desse fungicida, como constatada pela menor quantidade de ingrediente ativo para provocar 99% de inibição do crescimento micelial de *B. bassiana* (Tabela 1) além do seu amplo espectro de ação. Por outro lado, a alta toxicidade do paratiom-metílico e do clorpirifós-metílico pode ser atribuída às grandes inclinações das suas curvas de concentração-inibição do percentual de crescimento micelial. Alves (1986) cita que *B. bassiana* apresenta compatibilidade moderada com endossulfam para as doses prescritas, e tendência de incompatibilidade com aumento de concentração desse inseticida, de forma semelhante ao encontrado nesse trabalho.

A seletividade de *B. bassiana* a etiom, triadimenol e dissulfotom pode ser devida a processos semelhantes aos da resistência de populações de *L. coffeella* e de *Hemileia vastatrix* (Berk et Br), em algumas regiões produtoras de café em Minas Gerais, a esses pesticidas (Alves et al. 1992, Frago 2000). Contudo, são necessários estudos adicionais visando elucidar o aumento da toxicidade da mistura triadimenol + dissulfotom em relação à toxicidade desses produtos isoladamente. Isto é necessário para se confirmar ou não a hipótese da seletividade de *B. bassiana* aos produtos testados e os mecanismos que induzem ao aumento do crescimento micelial desse fungo na presença de subdoses de dissulfotom.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento e Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Literatura Citada

- Alves, S.B. 1986. Fungos entomopatogênicos, p. 73-126. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 407p.
- Alves, P.M.P., J.O.G. Lima & L.M. Oliveira. 1992. Monitoramento da resistência do bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Perileucoptera coffella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), a inseticidas, em Minas Gerais. An. Soc. Entomol. Brasil 21: 77-91.
- Bosch, R. van den, P.S. Messenger & A.P. Gutierrez. 1982. Naturally occurring biological control and integrated control, p. 165-184. In R. van den Bosch (ed.), An introduction to biological control. New York, Plenum Press, 247p.
- Bustillo, A.E.P. 1990. El control biológico como un componente en un programa de manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en Colombia. Memorias del XX Conferencia Congreso de Socolen, Cali, 159-164p.
- Cook, R.J. 1985. Biological control of the pathogens: theory to application. Phytopathology 75: 25-29.
- Croft, B.A. 1989. (ed.) Arthropod biological control agents and pesticides. New York, John Wiley & Sons, 723p.
- Fernandes, P.M., R.E. Lecuona & S.B. Alves. 1985. Patologia de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. à broca do café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) (Coleoptera; Scolytidae). Ecosystema 10: 176-181.
- Fragoso, D.B. 2000. Resistência e sinergismo a inseticidas fosforados em populações de *Leucoptera coffeella* (Guèr-Ménev.) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Dissertação de mestrado, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 35p.
- Fragoso, D.B., P. Jusselino-Filho, R.N.C. Guedes & R. Proque. 2001. Seletividade de inseticidas a vespas predadoras de *Leucoptera coffeella* (Guèr-Ménev.) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Neotrop. Entomol. 30: 139-144.
- Fukuto, T.R. 1984. Propesticidas, p. 97-101. In P.S. Mager & G.K. Kohn (eds.), Pesticides synthesis through rational approaches. Washington, Ed. Amer. Chem. Soc. Publ., 262p.
- IBC- Instituto Brasileiro do Café. 1986. Cultura do café no Brasil, pequeno manual de recomendações. Rio de Janeiro, IBC, 214p.
- Pelczar, M., R. Reids, E.C.S. Chan. 1980. (eds.) Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 566p.
- Souza, J.C., P.R. Reis, L.O. Salgado & C.C.A. Melles. 1981. Pragas do cafeeiro. Belo Horizonte, Epamig. 65p.

Received 24/05/02. Accepted 10/10/02.