

INDICES BIOLÓGICOS E CLASSIFICAÇÃO DO VERISMO®, QUANTO À TOXICIDADE A *Beauveria bassiana* (BALS) VUILL, EM LABORATÓRIO

BUCK, G. DE S.; MORGAN, B.S.; CALAFIORI, M.H.; PARADELA, A. L.

Entomologia e Fitopatologia do Curso de Engenharia Agrônômica “Manoel Carlos Gonçalves” – UniPinhal; Caixa Postal 9 – 13990-000 – Espírito Santo do Pinhal – S.P. gustavodesouzabuck@hotmail.com

RESUMO

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) tem se mostrado uma importante praga no cafezal nos últimos anos, sendo de difícil controle e causando prejuízos enormes na rentabilidade das lavouras. Com isso o lançamento de produtos para essa praga se torna inevitável, porém nem todos apresentam seletividade para controles biológicos. Levando em conta esses aspectos, o trabalho tem por objetivo analisar a compatibilidade do produto à base de metaflumizone (Verismo®) com a *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae), importante entomopatôgeno no controle desse inseto. O trabalho foi realizado no laboratório de Patologia de Inseto do Curso de Engenharia Agrônômica “Manoel Carlos Gonçalves” – UniPinhal, em abril de 2018. O produto foi adicionado ao meio de cultura enquanto ainda líquido e vertido para as placas de Petri. Após sua solidificação, o fungo foi repicado através de disco de 8 mm e colocado no centro das placas, que por sua vez continham BDA e BDA + produto. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 6 repetições. Os tratamentos foram: A – Testemunha (BDA); B – BDA + 1000 mg.L⁻¹ de i.a.; C – BDA + 100 mg.L⁻¹ de i.a.; D – BDA + 10 mg.L⁻¹ de i.a.; E – BDA + 1 mg.L⁻¹ de i.a. As avaliações foram feitas 14 dias após a repicagem, medindo o diâmetro das colônias, número de esporos com o auxílio da câmara de Neubauer e a germinação dos esporos. Foi realizada uma análise de variância para cada fator avaliado e a utilização da fórmula de Índice Biológico: $IB=47(CV) +43(ESP) +10(GER) /100$ para classificação da toxicidade. Foi possível concluir que, nas condições do ensaio, em altas concentrações, 1000 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹, o produto se apresentou tóxico e moderadamente tóxico respectivamente, limitando o crescimento e esporulação, da *B. bassiana*, enquanto, em menores concentrações (100 mg.L⁻¹ e 10 mg.L⁻¹) o produto se mostrou compatível com o fungo, apesar de limitar seu crescimento vegetativo no meio instalado.

Palavras-Chave: Metaflumizone. Compatibilidade. Broca-do-Café

ABSTRACT**BIOLOGICAL INDEX AND CLASSIFICATION OF VERISMO®
REGARDING TO *Beauveria bassiana* (BALS) VUILL TOXICITY, IN
LABORATORY CONDITIONS**

The Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) it's a very important pest in the coffee plantations in recent years, being very difficult to control causing huge damage on the cost-effectiveness. Hence launching new products for this pest is inevitable, however not all of them present selectivity for biological controls. Considering these aspects, this project has a goal that is to analyze the compatibility of the product foundation of Metaflumizone (Verismo®) with the *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae), important entomopathogenic, controlling this insects. This work project was done in the Insect Pathology Lab of the Agronomic Engineering Course "Manoel Carlos Gonçalves" – UniPinhal, in April, 2018. The product was introduced in the growth medium while liquid and poured in the Petri dishes. After solidification, the fungus was replicated through an 8 mm disc and set in the middle of the plates which contained BDA and BDA + product. Treatments was arranged in a completely randomized design with 6 replications. Treatments were: A –control (BDA); B- BDA + 1000mg.L⁻¹ of i.a.; C- BDA + 100mg.L⁻¹ of i.a.; D- BDA + 10 mg.L⁻¹ of i.a.; E- BDA + 1 mg.L⁻¹ of i.a. Evaluations were done after 14 days the transplanting, measuring colonies diameter, number of spores with the assistance of the Neubauer Chamber and the spores germination. An analysis of variance was realized for each factor considered and used the Biological Index formula: $IB=47(CV) +43(ESP) +10(GER)/100$ to toxicity classification. It was possible to conclude, under the test conditions, at high concentrations, 1.000 mg.L⁻¹ and 100 mg.L⁻¹, the product presented to be toxic and mildly toxic respectively, limiting the growth and sporulation, of the *B. bassiana*, while, in lower concentrations (100 mg.L⁻¹ and 10 mg.L⁻¹) the product presented to be compatible with the fungus, although limiting it's vegetative growth in the environment inserted.

Key Words: Metaflumizone. Compatibility. Coffee Berry Borer

INTRODUÇÃO

As pragas e doenças vêm se disseminando cada vez mais rápido e, ultimamente, apresentado resistência a diversos tipos de agroquímicos. Por isso alguns adotam o sistema integrado, associando produtos químicos com produtos biológicos e esse sistema está avançando gradativamente. Este é o caso da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), uma praga-chave para o cultivo de café, sendo de difícil controle e causando prejuízos enormes na produtividade e rentabilidade das lavouras.

Devido ao avanço de pragas resistentes a alguns ingredientes ativos, o mercado químico tem lançado diversos produtos para encontrar um manejo eficiente das pragas-chave, porém, nem sempre é realizada a análise de compatibilidade e índices biológicos, sendo um fator importante para o conhecimento sobre a possibilidade de associação com controles biológicos.

A utilização de microrganismos para o controle de pragas representa um grande avanço ecológico para a solução de

problemas ocasionados pelo uso incorreto de inseticidas, sendo que os microrganismos mais importantes e empregados são os fungos, causando cerca de 80% das enfermidades (ALVES, 1998 apud GARCIA, 2004).

Os fungos entomopatogênicos se destacam entre os agentes de controle biológico no país, representando uma alternativa para o manejo de insetos, especialmente quando os agrotóxicos não são permitidos, como no cultivo orgânico (MICHERFF FILHO et al., 2016).

A utilização de entomopatógenos é vantajosa por evitar o desequilíbrio ecológico nos agroecossistemas, devido ao fato de sua especificidade aos insetos-alvo e seletividade por inimigos naturais. Pode causar desde a morte direta dos insetos até modificar as características biológicas e reprodutivas deles, além da possibilidade de associação com outros métodos e não poluírem o ambiente e apresentarem toxicidade para os homens e animais (ALVES, 1998 apud LAURENTIS, 2017).

Os conídios desses fungos aderem-se e penetram no hospedeiro pelo tegumento, não precisando ser ingeridos para causarem a morte do hospedeiro, diferentemente de outros microrganismos como bactérias e vírus (BUENO, 2005 apud MICHERRFF FILHO et al., 2016).

Frequentemente, depois de instalados no corpo do hospedeiro, os fungos emergem produzindo esporos que são espalhados pelo vento, chuva ou pelo contato com outro inseto, causando o fenômeno de epizootia (VALICENTE, 2009).

Os insetos infectados por fungos, geralmente, param de se alimentar e tornam-se lentos, morrendo de forma mais rápida. O corpo do inseto apresenta consistência emborrachada, porém o corpo firme ou aparência oca, além de apresentarem colorações diferenciadas de acordo com o fungo atacado, devido a coloração desse microrganismo (VALICENTE, 2009).

O gênero *Beauveria* pode ser constantemente encontrado parasitando insetos, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos das mais diferentes ordens. Existem duas espécies desse gênero que

comumente atacam pragas (SAMSON, 1981).

Além disso, podem ocorrer raças dessas espécies que são diferenciadas por características biológicas e bioquímicas. De um modo geral, a germinação dos conídios de *B. bassiana* ocorre em um período de 12h após a inoculação, sendo que o fungo penetra, geralmente via tegumento, no inseto devido à uma ação mecânica e efeitos de enzimas. Decorrido 72h da inoculação o inseto está totalmente colonizado, advindo de grande quantidade de conidióforos e conídios característicos da espécie (ALVES, 1986).

O metaflumizone é o único inseticida bloqueador de canais de sódio que não necessita de bioativação. Embora o sítio de ação dessa molécula é desconhecido, sabe-se que ele atua como bloqueador do sistema nervos dos insetos, independente da voltagem, resultando na paralisia, decorrentes da desativação dos neurônios. Tal paralisia é denominada de “paralisia relaxada”, onde o inseto para de se alimentar, aumentando gradativamente essa paralisia, até a morte do organismo (dentre 1 a 12

horas após o tratamento) (BASF CORPORATION, 2006).

Segundo Hempel et al. (2007), esse ingrediente ativo é praticamente atóxico para mamíferos, pois observou-se que quando ratos albinos são submetidos à aplicação oral e dermal de metaflumizone, não houve mortalidade e nem toxicidade sistêmica em uma DL_{50} maior que 5000 mg/kg.

O controle integrado com agroquímicos seletivos, inseticidas e herbicidas, associados a fungos entomopatogênicos pode ser uma estratégia segura e eficiente (LOUREIRO et al., 2002)

Porém os agrotóxicos podem apresentar efeitos tóxicos sobre esses fungos, comprometendo sua ação sobre as pragas e na estratégia do manejo integrado (BOTELHO; MONTEIRO, 2010).

O objetivo do trabalho foi determinar os índices biológicos do ingrediente ativo metaflumizone para com a *B. bassiana*, determinando a possível associação de ambos, visto que tal ingrediente ativo não apresenta toxicidade à mamíferos e o entomopatógeno é o mais utilizado para o controle de *Hypothenemus hampei*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na sala de Patologia do Curso de Engenharia Agrônoma “Manoel Carlos Gonçalves” – UniPinhal, no município de Espírito Santo do Pinhal, em abril de 2018.

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* foi inoculado em placas de Petri contendo o meio BDA e BDA+ metaflumizone, em concentrações de 1000 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹, 10 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e incubados na B. O. D. a uma temperatura de 25 ± 1°C, fotofase de 12h e umidade relativa de 70=10% durante 14 dias. A mistura BDA + metaflumizone ocorreu enquanto o meio de cultura ainda estava líquido, sendo vertido posteriormente, nas placas de Petri.

Depois de solidificada, em cada placa de petri, foi adicionado um disco de 8 mm do fungo no centro das placas, com o auxílio da alça de platina, com o objetivo de avaliar seu crescimento vegetativo e posteriormente sua esporulação. Foram utilizadas 6 placas por tratamento, e colocadas na B.O.D.

Aos 7 e 14 dias, após a instalação do ensaio, foi medido o crescimento vegetativo dos tratamentos em milímetros, na parte

inferior da placa, com ajuda de uma régua e em dois sentidos transversais, para determinar o diâmetro das colônias.

Para número de esporos, foi utilizado o método de contagem direta em microscópio. Foi utilizada uma lâmina especial de contagem, de Neubauer. Para isso, retirou-se um disco de 8mm da placa de Petri adicionando em um tubo de ensaio contendo H₂O destilada, em seguida agitá-lo, para que os esporos se soltassem e se concentrassem na água. Em seguida foi realizada a suspensão original, onde 10 ml do tubo anterior foram transferidos para esse segundo tubo de ensaio.

Após preparada a suspensão original, foram feitas outras diluições seguidamente até a obtenção da última desejada, sempre homogeneizando cada suspensão antes da transferência para outro tubo. Nesse caso foi utilizada uma diluição de 10⁻⁶.

Depois da obtenção e contagem dos esporos, foi adicionada 1 gota da diluição analisada sobre o papel contact (na face onde possui cola) e levada para a germinação em B.O.D e analisada a porcentagem de esporos

germinados dentro de 24h, com a ajuda de um microscópio.

O fator de conversão utilizado para os esporos contados foi ($n \times 4 \times 10^6$) e com os dados de crescimento da colônia e germinação foram submetidos à análise da variância e teste Tukey 5%, para a comparação entre as médias obtidas do tratamento. Além disso foi utilizada a fórmula do Índice Biológico: $IB=47(CV) +43(ESP) +10(GER) /100$ para classificação da toxicidade, onde: CV = é a porcentagem do crescimento vegetativo; ESP = porcentagem de esporulação das colônias; GER = porcentagem de germinação dos conídios.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados obtidos para o crescimento vegetativo do entomopatógeno, observaram-se diferenças significativas, segundo o teste Tukey 5%, quanto ao desenvolvimento da *B. bassiana* nas placas de petri nos primeiros 14 dias. Sendo que em baixas concentrações do inseticida o dano foi menor do que em altas concentrações, conforme mostram a Tabela 1 e Figura 1.

Tabela 1. Diâmetro das colônias de *B. bassiana* no ensaio com Verismo®. Espírito Santo do Pinhal-S.P.2018

Tratamentos	Diâmetro da Colônia (mm)		
	Média	Média Transf.	% E.F.
A - Testemunha	25,20	4,965 c	—
B - 1000 ppm	13,33	3,650 a	45,95
C - 100 ppm	21,33	4,609 bc	13,51
D - 10 ppm	25,25	5,018 c	-2,37
E - 1 ppm	20,17	4,484 b	18,24
F	29,925 **		
C.V.	5,418%		
Tukey 5%	0,418		

** significativo a 1%. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

O tratamento em concentração de 10 ppm, apresentou um crescimento maior do que o da testemunha, sendo estatisticamente crescimentos

idênticos, porém houve uma certa diferenciação nessa concentração específica. Pode-se evidenciar melhor essa diferença quando analisada na Figura 1.

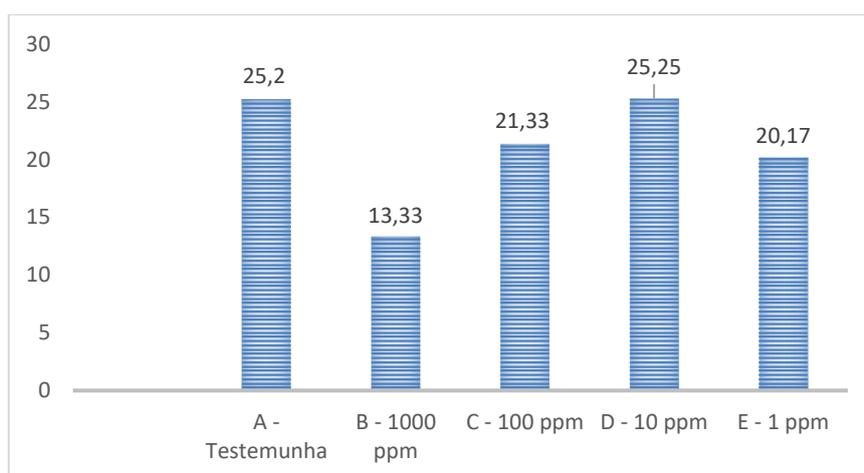


Figura 1. Média do diâmetro (mm) das colônias

Na análise da produção de esporos, na Tabela 2, percebe-se que os tratamentos progrediram conforme as concentrações do i.a., isto é, quando é menor a concentração do produto na calda,

no momento da aplicação, menor foi a influência na esporulação. Ao analisar a Figura 2, a diminuição de esporulação do fungo entomopatogênico fica explícito.

Tabela 2. Média da produção de esporos das colônias de *B. bassiana* no ensaio com Verismo® Espírito Santo do Pinhal –S.P. 2018.

Tratamentos	Contagem de Esporos($\times 4 \times 10^6$)		
	Média	Média Transf.	% E.F.
A – Testemunha	7,67	2,773 c	—
B - 1000 ppm	0,83	1,138 a	89,13
C - 100 ppm	2,67	1,774 ab	65,22
D - 10 ppm	3,17	1,900 b	58,70
E - 1 ppm	4,17	1,136 bc	45,65
F	12,559 **		
C.V.	21,059%		
Tukey 5%	0,625		

** significativo a 1 %. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

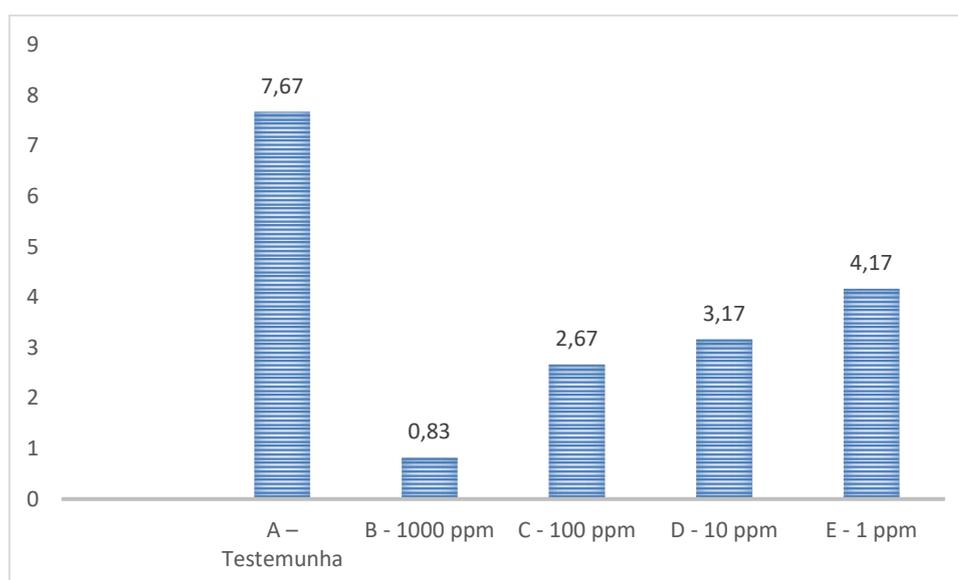


Figura 2. Médias dos esporos da *B. bassiana*

Em relação a germinação dos esporos Figura 3, pode-se perceber o mesmo comportamento da esporulação, porém a única diferença observada é a semelhança entre a testemunha e o tratamento

de menor concentração, mostrando que em baixas concentrações o metaflumizone não provoca alterações na viabilidade dos esporos.

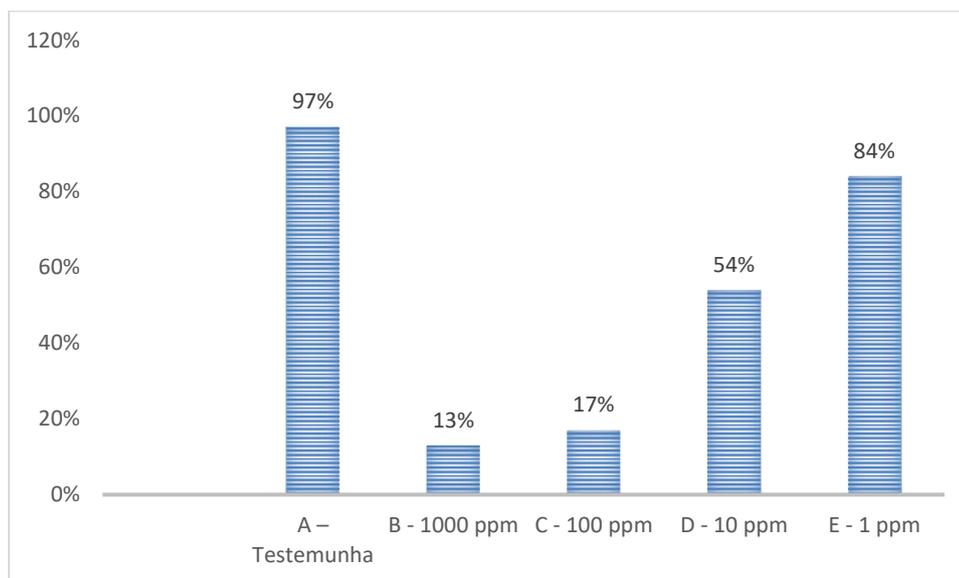


Figura 3. Porcentagem de esporos germinados da *B. bassiana*

A Tabela 4 mostra o resultado da aplicação da fórmula do Índice Biológico para a classificação de

toxicidade no fungo entomopatogêno *B. bassiana*.

Tabela 1. Toxicidade das diferentes concentrações de Verismo sobre *B. bassiana*. Espírito Santo do Pinhal – S.P. 2018

Tratamentos	Valor IB	Compatibilidade
A - Testemunha	—	—
B - 1000 ppm	30.84	Tóxico
C - 100 ppm	56.45	Moderadamente Tóxico
D - 10 ppm	70.25	Compatível
E - 1 ppm	69.38	Compatível

CONCLUSÕES

Foi possível concluir que, nas condições do ensaio, em altas concentrações, 1000 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹, o produto se apresentou tóxico e moderadamente tóxico respectivamente, limitando o crescimento e esporulação, da *B. bassiana*, enquanto, em menores concentrações (100 mg.L⁻¹ e 10 mg.L⁻¹) o produto se mostrou compatível com o fungo, apesar de limitar seu crescimento vegetativo no meio instalado.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. Fungos Entomopatogênicos: *Beauveria bassiana*. In: ALVES, S.B et al. **Controle Microbiano de Inseto**. 1ª. ed. Manole LTDA., 1986. p. 73-124.
- BASF CORPORATION, **Metaflumizone Insecticide**. Worldwide technical brochure, July 2006, 19 p.
- BOTELHO, A. A. A.; MONTEIRO, A. C. **Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar**. 2010. 9 p.. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v70n2/16.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2018.
- GARCIA, M. de O. **Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Ortheziapraelonga* (Sternorrhyncha: Ortheziidae)**. 2004. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – ESALQ/USP, Piracicaba, 2004. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-10092004-151307/.../marcelo.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- HEMPEL, K.; HESS, F. G.; BOGI, C.; FABIAN, E.; HELLWIG, J.; FEGERT, I. Toxicological proprieties of metaflumizone. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 2007.
- LAURENTIS, V. L. de. ***Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): táticas para o Manejo Integrado**. 2017. 136 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - UNESP, Jaboticabal, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/148862>>. Acesso em: 10 nov. 2018.
- LOUREIRO, E. DE S.; MOINO JUNIOR, A.; ARNOSTI, A.; SOUZA, G.C. DE. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemos sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, v.31, p.263-269, 2002.
- MICHERFF FILHO, M.; FARIA, M. R. de; TEIXEIRA, A. C de A; MARQUES, E. J. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Seleção de fungos**

entomopatogênicos para controle de Aphis gossypii (Hemiptera: Aphididae). Brasília, 2016.

Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/146464/1/BPD-134->

SAMSON, R.A. Identification of entomopathogenic deuteromycetes. 1981. In BURGESS, H.D. **Microbial control of pests and Plant**

Diseases. London Academic Press, 1970-1980, p. 93-106.

VALICENTE F. H. **Controle biológico de pragas com entomopatógenos.** Belo Horizonte: [s.n.], 2009. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/574316/1/Controlebiologico.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2018.