

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

Compatibilidade de agrotóxicos e óleos essenciais a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin

Vanessa Pinto Gonçalves

Pelotas, 2017

Vanessa Pinto Gonçalves

Compatibilidade de agrotóxicos e óleos essenciais a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área de conhecimento: Fitopatologia).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cândida Renata Jacobsen de Farias

Coorientadora: Dr^a. Ana Paula Afonso da Rosa

Coorientadora: Dr^a. Renata Moccellin

Pelotas, 2017

Vanessa Pinto Gonçalves

Compatibilidade de agrotóxicos e óleos essenciais a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill
e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Fitossanidade, Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Elise Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 21 de Março de 2017

Banca examinadora:

Professora Dr^a. Cândida Renata Jacobsen de Farias (Orientadora)
Doutora em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

Dr^a. Ana Paula Afonso da Rosa (Coorientadora)
Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

Professora Dr^a. Danielle Ribeiro de Barros
Doutora em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa

Dr. Ismail Teodoro de Souza Junior
Doutor em Fitopatologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Professor Dr. Daniel Bernardi (Suplente)
Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

**Aos meus filhos, Gustavo e Paola.
Ao meu marido Fábio e aos meus pais Vilmar e
Marinez.
Dedico e ofereço**

Agradecimentos

A minha orientadora, Dra. Cândida R. Jacobsen de Farias, pela orientação, ensinamentos compartilhados, e por ter me apoiado até nos momentos mais impossíveis e pela amizade.

A minha coorientadora, Dra. Ana Paula Afonso, pela orientação, pelos conselhos e por ter possibilitado a realização desse trabalho.

A minha coorientadora Renata Moccellini pela disponibilidade, e dedicação em me orientar.

Aos professores do PPGFS pelos ensinamentos repassados nestes dois anos.

Aos funcionários Serginho e Rosaria que sempre estiveram disponíveis a me auxiliar de maneira gentil e prestativa.

As colegas, Victoria Moreira por todo apoio desde o início desta jornada, a Priscila pela disponibilidade e as risadas garantidas, a Viviana pelos conselhos e ajuda, ao colega Wellington pela amizade, e a Monique que me apoiou em todos os momentos.

A minha cunhada e amiga Aline por estar do meu lado me apoiando e me ajudando quando mais precisei.

Aos demais colegas do PPGFS, que dividiram comigo todos os momentos (difíceis, de descontração, de apuro) vivenciados ao longo do curso;

Aos meus filhos por serem minha inspiração e razão de viver;

Ao meu marido Fábio Hipólito, pelos momentos de paciência, companheirismo dedicação;

A minha família, minha maior incentivadora, que sempre acreditou em mim.

Meu carinhoso, sincero e eterno, MUITO OBRIGADA!

Resumo

GONÇALVES, Vanessa Pinto. **Compatibilidade de agrotóxicos e óleos essenciais a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. 2017. 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

O Brasil está entre os países que mais utilizam agrotóxicos no mundo, embora ainda não seja o maior em produção agrícola esta entre os maiores consumidores. Podendo trazer grandes prejuízos à saúde, ao meio ambiente causando aumento de pragas, graças ao desequilíbrio resultante da destruição de inimigos naturais como os fungos entomopatogênicos, importantes no controle natural de diversas pragas agrícolas em inúmeras culturas. No ambiente edáfico tem-se uma riqueza de microrganismos, dentre eles podemos destacar os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. O presente estudo foi realizado em duas partes. A primeira referiu-se à avaliação do efeito dos agrotóxicos utilizados na cultura da soja e do arroz irrigado sobre estes fungos entomopatogênicos. Para isso, os isolados foram inoculados em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) contendo os agrotóxicos e também foram expostos a pulverizações com os produtos, onde foram avaliados através da porcentagem de inibição do crescimento micelial, esporulação e germinação dos esporos. Observou-se que o inseticida à base de clorfantriliprole foi o que obteve os melhores resultados, sendo compatível nos dois métodos de contato do produto aos fungos respectivamente. Com relação à toxicidade, do inseticida flubendiamida foi o mais tóxico aos fungos no método por incorporação. Na segunda parte, foram avaliados in vitro 7 óleos essenciais (OEs) sobre os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, verificando suas atividades antifúngicas e de compatibilidade através das avaliações do índice biológico (IB). O óleo essencial de alho foi o que obteve melhores resultados sendo compatível com os fungos, os óleos essenciais de manjerona e artemisia demonstraram certa compatibilidade com os fungos. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da compatibilidade destes agrotóxicos e óleos essenciais sobre os fungos entomopatogênicos importantes agentes de controle natural de insetos-pragas.

Palavras-Chave: compatibilidade; agrotóxicos; óleos essenciais; controle natural

Abstract

GONÇALVES, Vanessa Pinto. **Compatibility of agrochemicals and essential oils with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin.** 2017. 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Brazil is among the countries that use pesticides the most in the world, although it is not yet the largest in agricultural production among the largest consumers. It can cause great damages to the environment, causing an increase of pests, thanks to the imbalance resulting from the destruction of natural enemies like entomopathogenic fungi, important in the natural control of several agricultural pests in numerous cultures. In the edaphic environment there is a wealth of microorganisms, among them we can highlight the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. The present study was carried out in two parts. The first one was related to the evaluation of the effect of the agrochemicals used in soybean and irrigated rice cultivation on these entomopathogenic fungi. For this, the isolates were inoculated in potato-dextrose-agar (BDA) medium containing the pesticides and also exposed to spraying with the products, where they were evaluated through the percentage of inhibition of mycelial growth, sporulation and spore germination. It was observed that the insecticide based on chlorantraniliprole was the one that obtained the best results, being compatible in the two methods of contact of the product with the fungi respectively. With respect to toxicity, flubendiamide insecticide was the most toxic to fungi in the method by incorporation. In the second part, 7 essential oils (OEs) were evaluated in vitro on the entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae*, checking their antifungal and compatibility activities through of the biological index (BI). The essential oil of garlic was the one that obtained better results being compatible with the fungi, the essential oils of marjoram and artemisia demonstrated some compatibility with the fungi. The results obtained contribute to the knowledge of the compatibility of these pesticides and essential oils on important entomopathogenic fungi, natural insect control agents.

Key-words: compatibility; pesticides; essential oils; natural control

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Agrotóxicos registrados para cultura da soja e arroz irrigado utilizados nos ensaios de seletividade (Agrofit).....	34
Tabela 2	Crescimento micelial das colônias (mm) e número médio de conídios por mL ⁻¹ (x 10 ⁵), e porcentagem de inibição de <i>Beauveria bassiana</i> na presença de agrotóxicos por incorporação e pulverização sobre o fungo entomopatogênico.....	35
Tabela 3	Crescimento micelial das colônias (mm) e número médio de conídios por mL ⁻¹ (x 10 ⁵) de <i>Metarhizium anisopliae</i> na presença de agrotóxicos por incorporação e pulverização sobre o fungo entomopatogênico.....	36
Tabela 4	Valores do índice biológico de toxicidade (IB) e classificação, entre alguns agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado e da soja ao entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i>	36
Tabela 5	Valores do índice biológico de toxicidade (IB) e classificação, entre alguns agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado e da soja ao entomopatógeno <i>Metarhizium anisopliae</i>	37

Artigo 2

Tabela 1	Crescimento micelial das colônias (mm) de <i>Beauveria bassiana</i> na presença de diferentes concentrações de óleos essenciais....	55
Tabela 2	Crescimento micelial das colônias (mm) de <i>Metarhizium anisopliae</i> na presença de diferentes concentrações de óleos essenciais.....	55
Tabela 3	Coeficiente de correlação de Pearson para valores médios das variáveis crescimento micelial e esporulação de <i>Beauveria bassiana</i> sob diferentes óleos essenciais.....	56
Tabela 4	Coeficiente de correlação de Pearson para valores médios das variáveis crescimento micelial e esporulação de <i>Metarhizium anisopliae</i> sob diferentes óleos essenciais.....	56

Tabela 5	Valores do índice biológico de toxicidade (IB) e classificações de toxicidade de sete óleos essenciais sobre <i>Beauveria bassiana</i>	57
Tabela 6	Valores do índice biológico de toxicidade (IB) e classificações de toxicidade de sete óleos essenciais sobre <i>Metarhizium anisopliae</i>	57

Sumário

1 Introdução Geral	11
2 Artigo I – Efeito de agrotóxicos utilizados na cultura da soja e arroz sobre <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill e <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorok. ...	16
2.1 Introdução.....	18
2.2 Material e Métodos.....	20
2.3 Resultados e Discussão	24
2.4 Referências	38
2.5 Considerações finais.....	38
3 Artigo II – Efeito de óleos essenciais no desenvolvimento de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuil e <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorok.....	40
3.1 Introdução	41
3.2 Material e Métodos.....	43
3.3 Resultados e Discussão	46
3.4 Referências	48
3.5 Considerações finais.....	38
4 Referências	58

1 Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma cultura de grande importância no cenário agrícola brasileiro, sendo o produto mais exportado do país atualmente, ocupando cerca de 33 milhões de hectares, com produção de 103 milhões de toneladas em 2015/2016 (CONAB, 2016). Entretanto, alguns fatores limitam o rendimento e o sucesso da produção de soja, a qual está sujeita ao ataque de diferentes insetos pragas durante todo seu ciclo, e também as doenças que podem ocasionar perdas anuais que variam de 10% a 70% de danos, variando de acordo com o patógeno causador da doença (EMBRAPA, 2014).

Com o surgimento da ferrugem asiática causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow (Uredinales: Phakopsoraceae) o uso de fungicidas na cultura aumentou de forma significativa e alguns estudos mostram efeitos negativos desses fungicidas no desenvolvimento de insetos (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2008a). Considerando que a ferrugem asiática se trata de uma doença altamente destrutiva, uma das alternativas de manejo ainda é o uso de fungicidas, em virtude da disponibilidade de cultivares resistentes ainda serem limitadas, e da alta variabilidade deste agente causal, que podem diferenciar-se quanto a sua agressividade em decorrência de populações separadas geograficamente (KATO; YORINORI, 2008; YAMANAKA *et al.*, 2010; SIQUERE *et al.*, 2011; EMBRAPA, 2016).

Em relação aos insetos-pragas nessa cultura, a *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das espécies mais importante e recente no Brasil, possui grande potencial destrutivo em várias culturas de importância econômica, ainda com poucas informações sobre a eficiência de controle de inseticidas químicos nas condições brasileiras, porém alguns estudos realizados sobre o desempenho de inseticidas flubendiamida, clorantraniliprole, espinosade mostram-se eficazes no combate a este inseto-praga, aumentando a demanda por estes produtos (KUSS *et al.*, 2016).

Outra cultura de grande importância no Brasil é o arroz (*Oryza sativa* L.), um cereal difundido largamente no mundo sendo considerado de grande importância dentro da cadeia agrícola. Porém é uma cultura com vários problemas fitossanitários, a ocorrência de doenças ocasionadas pelos fungos são consideradas como fatores limitantes de produção (MICHEREFF, 2001; AGRIOS, 2005). Nas últimas décadas, *Bipolaris oryzae* é mencionado como um dos principais patógenos associados à cultura do arroz, devido à suscetibilidade da maioria das cultivares e pela associação às sementes (AMARAL *et al.*, 1985; FARIAS, 2011).

Outros fatores limitantes na cultura do arroz são as pragas, como o percevejo-do-colmo-do-arroz, o qual tem sua distribuição em todo território nacional, em virtude de seu hábito migratório em busca de alimentos e pelas mudanças climáticas que favorecem sua dispersão, sua ocorrência tem aumentado expressivamente nas lavouras de arroz irrigado, onde a alta densidade de plantas, o clima e o posicionamento das lavouras favorecem o aparecimento e o aumento populacional do inseto apresentando-se como importante praga na cultura do arroz irrigado (PRANDO *et al.*, 1993; MARTINS *et al.*, 2004; BOTTA *et al.*, 2014).

Considerando que no manejo fitossanitário das lavouras de arroz, atualmente, preconiza-se a utilização de agrotóxicos, a avaliação da seletividade a agentes de controle biológico precisa ser considerada, mesmo porque o uso abusivo do controle químico pode acarretar na perda da eficiência sobre o alvo de controle, afetando agentes de controle biológico presentes no ambiente (LOUREIRO *et al.*, 2002).

Isso ocorre, porque a ação destes ingredientes ativos, derivados de grupos químicos como tiametoxam, clorantroliprole, flubendiamida, etofenproxi, espinosade, benzotiazol, estrobirulina, triazol e triazolinthione em certas vias metabólicas de insetos, microrganismos, animais e plantas que se deseja controlar, sendo algumas dessas vias comuns a todos eles, podem atingir organismos não alvos causando um desequilíbrio na natureza (SPADOTTO, 2006).

Devido a estes desequilíbrios, fenômenos como de ressurgência, que ocorre quando, após aplicação de um agroquímico a população da praga aumenta sua densidade populacional nas áreas que não receberam tratamento, outro fenômeno é o surgimento de praga, ou surto de praga secundária, transformando esta praga de menor importância na principal devido à eliminação de seus inimigos naturais (MARTINS *et al.*, 2004; SOSA-GOMEZ, 2004).

Em decorrência desses fatores a demanda por produtos naturais, com baixo impacto ambiental vem sendo cada vez mais estudado. O uso de óleos essenciais, extratos vegetais e metabólitos secundários de plantas, é uma ferramenta a ser agregada nos sistemas alternativos de produção, e nos convencionais como forma de aumentar a sustentabilidade da produção (SILVA *et al.*, 2010).

Anterior á era cristã, os povos já possuíam conhecimento sobre os óleos essenciais. As referências históricas de obtenção e utilização desses óleos estão ligadas originalmente aos países orientais, com destaque para o Egito, Pérsia, Japão, China e Índia. O aperfeiçoamento sobre os óleos essenciais deu-se em meados do século XVIII, onde começou os estudos para suas caracterizações químicas (VITTI & BRITO, 2003).

Os compostos provenientes destes óleos essenciais são considerados biologicamente ativos, quando exercem ação específica sobre um determinado ser vivo, seja ele animal, vegetal ou microrganismo (SILVA *et al.*, 2005). Existe uma imensa gama de compostos orgânicos de origem vegetal que é biologicamente ativa, isto é, tem ação tranquilizante, analgésica, anti-inflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, inseticida entre outras (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais encontram maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos, quando falamos de fitocompostos, o que representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos. Estes óleos podem ser obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta, podendo apresentar composições químicas, caracteres físico-químicos e odores distintos (VITTI & BRITO, 2003; SILVA *et al.*, 2005; BIZI, 2006).

As pesquisas sobre o controle de doenças por meio do emprego de óleos essenciais têm crescido nos últimos anos. O emprego de óleos essenciais de espécies aromáticas, isolados ou em combinação com outros métodos, poderá vir a contribuir com a redução do uso de agrotóxicos e um controle eficiente de fitopatógenos. No entanto, os trabalhos vêm focando somente o uso sobre organismos patogênicos, não considerando os organismos não alvos (MAIA *et al.*, 2015)

Entre os microrganismos não alvos, de extrema relevância para o controle biológico, estão os fungos entomopatogênicos: *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Ascomycota: Hypocreales) e *Metarhizium anisoplae* (Metsch.) Sorokin

(Hypocreales: Clavicipitaceae) cuja elevada capacidade de utilização baseia-se, principalmente, na sua grande variabilidade genética, largo espectro de hospedeiros e a não necessidade de ingestão por parte dos insetos-praga que se deseja controlar, pois sua infecção é, geralmente, via tegumento, diferente de bactérias e vírus, que a infecção é exclusivamente por ingestão (ALVES, 1998).

Metarhizium mostra-se como um importante agente para o controle de pragas, ocorrendo naturalmente em mais de 300 espécies de insetos, podendo ser encontrado em solos de habitats variados pelo mundo (ZIMMERMANN, 2007). Este fungo tem alcançado níveis eficientes no controle de cigarrinhas como *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: cercopidae), estimando-se que sua aplicação tenha ultrapassado os 2 milhões de hectares na cultura da cana de açúcar em 2011 (BETTIOL, 2011).

Diante disso, *M. anisopliae* é a espécie com maior número de registros de produtos no MAPA, é também o fungo entomopatogênico mais comercializado pelas empresas brasileiras, e produzidos em grande escala por usinas de cana-de-açúcar utilizando arroz parboilizado para o controle do complexo de cigarrinhas entre outras (ALVES, 1998).

Outro entomopatógeno não menos importante é o fungo do gênero *Beauveria* a espécie *B. bassiana* (Bals.) Vuill. foi descrita em 1835, pela primeira vez, por Agostino Bassi como *Botrytis bassiana*, que encontrou este fungo causando a doença muscardine branca que atacava *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) o bicho da seda (BENHAM & MIRANDA, 1953), se trata de um gênero de ampla distribuição geográfica, utilizado para controle biológico de insetos-praga (REHNER; BUCKLEY, 2005).

No Brasil, *Beauveria bassiana* é um fungo utilizado no controle de pragas da agricultura, como “broca do café” *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), “moleque da bananeira” *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae), “ácaro da falsa ferrugem” *Phyllocoptruta oleivora* (Acarida: Eriophyidae), “brocado-olho” *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae), “broca da cana-de-açúcar” *Diatraea saccharalis* (Lepdoptera: Crambidae), entre outros (ALVES *et al.*, 2005; NEVES & HIROSE, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2010; ZAPPELINI *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2012).

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são objetos de contínuos estudos no Brasil, constituindo uma alternativa ao uso de defensivos químicos, mesmo que

estes últimos não possam ser completamente dispensados (DALZOTO; UHRY, 2009). A avaliação da toxicidade dos agrotóxicos e também dos óleos essenciais, são de muita importância, para orientar os usuários na escolha de produtos seletivos mais adequados para a condução de um controle sustentável de pragas, sem que agrida estes organismos não alvos.

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo verificar a compatibilidade de agrotóxicos e óleos essenciais sobre os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Artigo 1 - NEOTROPICAL ENTOMOLOGY

**Efeito de agrotóxicos utilizados na cultura da soja e arroz irrigado sobre
Beauveria bassiana (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.**

Vanessa Pinto Gonçalves, Renata Moccasin, Victória Nunes Moreira, Cândida Renata
Jacobsen de Farias, Ana Paula Afonso da Rosa

2 Artigo I – Efeito de agrotóxicos utilizados na cultura da soja e arroz irrigado sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

Effect of pesticides used in soybean and rice cultivation on *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

VP GONÇALVES¹, R MOCCELIN¹, VN MOREIRA¹, CRJ FARIAS¹, APS ROSA²

¹Departamento de Fitossanidade, FAEM - Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. ²Embrapa Clima Temperado - Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Correspondência: Vanessa Pinto Gonçalves, Departamento de Ciência e tecnologia de sementes, FAEM - Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil; vanessapg83@hotmail.com

Abstract

The present work aimed to evaluate, through the percentage of inhibition of mycelial growth, sporulation and germination of spores, the fungitoxic effects of fungicides and insecticides used in soybean and irrigated rice cultivation on entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. The isolates were inoculated in potato-dextrose-agar (PDA) medium containing the pesticides and were also exposed to spraying with the products through Potter's tower. It was observed that the insecticide based on chlorantraniliprole was the one that obtained the best results to the entomopatógenos, being compatible in the two methods of contact of the product with the fungi. However, flubendiamide showed to be toxic to very toxic to fungi, obtaining 100% inhibition by incorporation, but by spraying *M. anisopliae* obtained mycelial growth accompanied by sporulation, being compatible. Tiamethoxam, etofenproxi and spinosad changed their classification according to the toxicity tests applied and method of contact of the product with the fungus. Espinosade showed to be more compatible with *M. anisopliae* than *B. bassiana*, which obtained a very toxic classification. On the other hand, the fungicides based on tricyclazole, trifloxystrobin + proticonazole, trifloxystrobin + tebuconazole and azoxystrobin + cyproconazole proved to be very toxic by the incorporation method. Only tricyclazole obtained compatibility by the fungus spray method. The germination of conidia altered the classification of some of the pesticides in relation to their selectivity to entomopathogens. However, the results show that in vitro agrochemicals such as tricyclazole, thiamethoxam, flubendiamide and etofenproxi are harmful to *B. bassiana* and *M. anisopliae* rather than by spraying, showing that environmental interference minimizes effects on organisms.

Keywords: Entomopathogens, Phytosanitary Products, Compatibility, Selectivity

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo avaliar, através da porcentagem de inibição do crescimento micelial, esporulação e germinação dos esporos, o efeito fungitóxico de fungicidas e inseticidas utilizados na cultura da soja e arroz irrigado sobre os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Os isolados foram inoculados em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) contendo os agrotóxicos e também foram expostos a pulverizações com os produtos. Observou-se que o inseticida à base de clorantraniliprole foi o que obteve os melhores resultados aos entomopatógenos, sendo compatível nos dois métodos de contato do produto aos fungos. Entretanto, flubendiamida mostrou-se de tóxica a muito tóxica aos fungos, obtendo 100% de inibição por incorporação ao meio, porém por aspersão *M. anisopliae* obteve crescimento micelial acompanhado por esporulação, mostrando-se compatível. Tiametoxam, etofenproxi e espinosade alteraram sua classificação de acordo com os testes de toxicidade aplicados e método de contato do produto com o fungo. Espinosade mostrou-se mais compatível com *M. anisopliae* do que *B. bassiana* que obteve classificação muito tóxica. Já os fungicidas a base de triciclazol, trifloxistrobina + proticonazol, trifloxistrobina + tebuconazol e azoxistrobina + ciproconazol, revelaram-se muito tóxicos pelo método de incorporação. Apenas triciclazol obteve compatibilidade pelo método de aspersão aos fungos. A germinação dos conídios alterou a classificação de alguns dos agrotóxicos com relação a sua seletividade aos entomopatógenos. No entanto, os resultados mostram que *in vitro* os agrotóxicos como triciclazol, thiametoxam, flubendiamida e etofenproxi são prejudiciais a *B. bassiana* e *M. anisopliae*, do que por aspersão, mostrando que as interferências do meio ambiente minimizam os efeitos sobre os organismos.

Palavras-chaves: Entomopatógenos, Produtos fitossanitários, Compatibilidade, Seletividade

2.1 Introdução

As vendas de fungicidas e inseticidas para uso fitossanitário aumentaram, de 2014 a 2015 em média, 12,3%, sendo que os fungicidas tiveram uma participação considerável, saindo dos 10,0% em 2014 para 17,0% em 2015, em contra partida, os inseticidas decaíram de 21,0% em 2014 para 17,0% em 2015 (Sindieveg 2016). Como consequência do uso intensivo de agrotóxicos tem-se verificado uma redução na presença dos inimigos naturais, como os entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., 1912 e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, 1883 devido a muitos produtos não apresentarem seletividade, prejudicando o controle natural exercido no ambiente (Loureiro *et al* 2002). Mesmos os produtos considerados de baixo risco,

têm demonstrado efeitos prejudiciais aos organismos não alvo, o que vem fortalecendo estudos à cerca dos efeitos nocivos dos agrotóxicos aos organismos benéficos (Costa *et al* 2014, Moscardini *et al* 2015, Fonseca *et al* 2015).

Fungos entomopatogênicos apresentam grande importância para a cultura da soja e o do arroz irrigado. À exemplo, temos *M. anisopliae* que é parasita facultativo de *Tibraca limbativetrus* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae), praga da cultura do arroz. Na cultura da soja, esse fungo, tem sido observado como parasita facultativo de *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Pentatomidae) e *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hemiptera: Pentatomidae) (Rampelotti *et al* 2007). Em virtude do potencial de controle a estes insetos pragas, *M. anisopliae* é a espécie com maior número de registro de produtos no MAPA (Agrofit 2017) e o mais comercializado pelas empresas brasileiras (Bettiol 2011).

O fungo *B. bassiana*, também está dentro do grupo dos biocontroladores naturais de pragas, sendo utilizado para o controle de diversos insetos-praga, como o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae) as cochonilhas *Dactylopius coccus* (Costa, 1835) (Hemiptera: Dactylopiidae) os cupins *Coptotermes* sp. (Blattodea: Rhinotermitidae), mosca branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) e a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) (Faria & Magalhães 2001, Sun *et al* 2003; Dalzoto & Uhry 2009, Moro *et al* 2011, Svedese *et al* 2013).

A utilização dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopleae*, fundamenta-se especialmente, na alta variabilidade genética, no seu largo espectro de hospedeiros e na não necessidade de ingestão por parte dos insetos-praga, a infecção causada por eles se dá, geralmente, via tegumento, o que os diferencia de bactérias e vírus, cuja infecção se dá apenas por ingestão (Alves *et al* 1998).

Devido à importância desses organismos na agricultura, muitos estudos vêm sendo realizados para avaliar a compatibilidade entre produtos fitossanitários e inimigos naturais, por meio da seletividade (Degrande *et al* 2002, Barbosa *et al* 2009, El Wakeil *et al* 2013). A seletividade consiste na propriedade em que o produto apresenta por controlar a praga alvo, com o menor impacto possível aos componentes do agroecossistema (Fonseca *et al* 2015).

Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo verificar a compatibilidade de fungicidas e inseticidas recomendados para o uso cultura da soja e arroz irrigado sobre os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

2.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes e Fungos Fitopatogênicos do Departamento de Fitossanidade, pertencente à Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS e no Núcleo de Manejo Integrado de Pragas da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

O isolado de *B. bassiana* foi obtido da coleção do laboratório de Patologia de Sementes FAEM/UFPel, e o isolado de *M. anisopliae* (MaCG168) foi obtido junto da coleção de fungos entomopatogênicos da Embrapa Arroz e Feijão. Os isolados foram identificados a partir de características morfológicas (Barnett 1960) e molecular a partir das regiões (ITS) e (EF1- α), (White *et al* 1990; Carbone & Kohn 1999).

As sequências foram analisadas e comparadas com o banco de dados do GenBank, onde ambas as sequências ITS e EF1- α apresentaram 95% e 99% de identidade com *B. bassiana* com os acessos GenBank [KX228572.1](#) e GenBank [JQ434752.1](#), respectivamente. Para *M. anisopliae* as sequências ITS e EF1- α

apresentaram 95% e 99% de identidade com os acessos GenBank [LC200443.1](#) e GenBank [KT360950.1](#), respectivamente.

Os inseticidas e fungicidas utilizados são recomendados para a cultura da soja e do arroz irrigado (Agrofit, 2017) (Tabela 1).

Para verificar o efeito dos agrotóxicos sobre os fungos entomopatogênicos foram realizados dois bioensaios: Bioensaio 1: agrotóxicos incorporados ao meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) e; Bioensaio 2: pulverização sobre a colônia estabelecida em meio BDA.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 10 x 2, onde o fator A foi composto pelos 9 produtos + testemunha (tabela 1) e o fator B pelos 2 métodos de contato (incorporação e pulverização).

As variáveis respostas avaliadas, nos dois bioensaios, foram crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos, sendo utilizado 10 repetições para as duas primeiras variáveis e quatro repetições para a terceira variável, selecionadas ao acaso.

A testemunha consistiu do crescimento dos fungos em meio BDA sem agrotóxico (incorporado) e pulverizadas com água (pulverização).

Bioensaio 1: No contato por incorporação ao meio de cultura, as doses dos agrotóxicos foram adicionadas a 400 mL de meio de cultura BDA a temperatura de ± 45 °C, ainda não solidificado. Após homogeneização foi vertido 10 mL do meio em placas de Petri de 8,5 cm de diâmetro, sendo em seguida inoculado o fungo no centro de cada placa, através de agulha de platina a partir de colônias com sete dias de crescimento micelial. Posteriormente foram mantidos em sala de incubação à temperatura de 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12h.

Biensaio 2: No contato por pulverização, os fungos foram repicados para placas de Petri de 8,5 cm de diâmetro, contendo meio BDA e incubados na mesma condição do Bioensaio 1, por quatro dias. Após, as placas foram submetidas à pulverização por aspersão dos produtos (Tabela 1), utilizando-se Torre de Potter (Burkard Scientific Uxbridge UK) calibrada a pressão de 10 lb pol⁻², resultando em um volume de $0,166 \pm 2,61$ mg cm⁻² de deposição, usando 1 mL de calda por aplicação. Posteriormente as placas foram acondicionadas em sala de incubação à temperatura de 25 °C ± 1 , com fotoperíodo de 12h.

Para o crescimento micelial as colônias foram medidas diariamente, com auxílio de paquímetro digital, até o décimo dia. A mensuração foi realizada em dois sentidos transversais da placa, determinando-se o diâmetro médio das colônias.

A avaliação da esporulação foi realizada no décimo quinto dia de incubação, através do recorte, com auxílio de um vazador (7 mm de diâmetro), de 5 discos de micélio das colônias submetidas aos tratamentos. Os discos foram adicionados em tubos de ensaio contendo 20 mL de água destilada estéril (ADE) com uma gota de Tween 80 (0,1%) (dispersante). Os tubos foram agitados durante um minuto em vortex, com posterior quantificação dos conídios através da contagem em câmara de Neubauer.

Para avaliar a viabilidade dos conídios, foi recortado através de um vazador (7 mm de diâmetro) um disco de micélio no décimo quinto dia de incubação, a o qual foi adicionado 10 mL de água destilada esterilizada (ADE), acrescido de uma gota de Tween 80 (0,1%). Posteriormente, uma alíquota de 3 μ L da suspensão foi transferida para lâminas microscópica contendo um bloco de BDA (0,5 cm²), acondicionadas no interior de uma caixa gerbox e incubadas por 20 horas a uma temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas luz. Após o período de incubação

foi realizada a contagem do número de esporos germinados com auxílio de microscópio óptico com aumento de 400 vezes, sendo observado um total de 300 esporos ao acaso, no bloco de meio de cultura com a suspensão, focalizando em três pontos distintos, de acordo com metodologia adaptada de Neves et al (2001).

Para determinar o efeito tóxico dos agrotóxicos sobre os fungos entomopatogênicos, foi calculado o índice biológico (IB), utilizando-se a fórmula descrita por Rossi-zalaf et al (2008).

Em que:

IB = índice biológico;

CV: porcentagem de crescimento vegetativo da colônia após 15 dias, em relação à testemunha;

ESP: porcentagem de esporulação após 15 dias, em relação à testemunha;

GER: porcentagem de germinação dos conídios após 20 horas, em relação à testemunha.

Com os valores obtidos de IB obteve-se a classificação toxicológica dos agrotóxicos, de acordo com a escala descrita por Rossi-Zalaf *et al* (2008): de 0 a 41 – tóxico; de 42 a 66 – moderadamente compatível; > 66 – compatível.

As variáveis respostas, crescimento micelial e esporulação, foram submetidas a comparação das médias pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade para comparação entre os tratamentos, e o teste de T-Student a 5% de probabilidade para comparação entre os métodos de contato dos agrotóxicos com os fungos. Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa estatístico Statistical Analysis System (SAS).

2.3 Resultados e Discussão

Em relação à compatibilidade dos inseticidas com *Beauveria bassiana* verificou-se que a variável resposta crescimento micelial (CM) diferenciou-se da testemunha para todos os tratamentos com exceção do tratamento com clorantraniliprole, o qual não diferiu significativamente. Este efeito foi observado nas duas formas de contato do produto incorporado ao meio de cultura BDA e por pulverização (Tabela 1), indicando que a aplicação do inseticida clorantraniliprole não afeta o fungo. Por outro lado, para clorantraniliprole, a taxa de esporulação diferiu da testemunha apresentando, uma redução de 47,0% no método incorporação e 53,0% pelo método de pulverização, a maior taxa de esporulação foi observada para espinosade quando este foi incorporado ao meio, já a pulverização foi significativamente diferente para todos os tratamentos em relação a testemunha. Em relação ao índice biológico (IB), independentemente do modo de contato dos inseticidas com *B. bassiana*, flubendiamida foi o agrotóxico considerado, de acordo com a escala utilizada, tóxico, já clorantraniliprole, foi considerado compatível ao desenvolvimento do fungo entomopatogênico (Tabela 4).

O inseticida espinosade reduziu o crescimento micelial do entomopatógeno, no entanto, não reduziu de forma significativa a taxa de esporulação pelo método de incorporação. Por outro lado, no método por pulverização, ocorreu uma redução significativa em ambas as variáveis analisadas, reduzindo 10,31 mm o diâmetro das colônias e 87,49% na taxa de esporulação. No método por aspersão a redução na taxa de esporulação fez com que ocorresse uma mudança na classificação do produto de compatível quando incorporado ao meio para muito tóxico, condição que se assemelha as pulverizações do produto ao campo (Tabela 4).

Thilagam *et al* (2010) em experimento *in vitro* conduzido para avaliar a compatibilidade sobre diferentes doses de flubendiamida a *B. bassiana* verificaram uma inibição significativa do crescimento do fungo em todas as doses testadas, da mesma forma ao observado neste experimento.

Em relação ao inseticida tiametoxam observou-se uma inibição no desenvolvimento de *B. bassiana*, com uma redução do crescimento micelial de 11,25 mm e uma redução na taxa de esporulação de 64,7 % e no método por incorporação de 9,61 mm no crescimento micelial e 57,18% na esporulação na pulverização, em relação à testemunha (Tabela 2), mostrando-se moderadamente compatível pelo índice biológico (Tabela 4). Neves *et al* (2001) analisaram a compatibilidade dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* a diferentes inseticidas, entre eles tiametoxam e, verificaram redução significativa do crescimento vegetativo de *B. bassiana*, nos tratamentos com acetamiprido e tiametoxam, nas doses recomendadas. Fregonesi *et al* (2016) verificou que tiametoxam afetou isolados de *B. bassiana*, porém não promoveu mudança significativa na esporulação, apesar de ter reduzido o crescimento vegetativo o produto foi classificado como compatível.

Diferentes resultados encontrados pelos autores citados acima, e neste trabalho, em relação ao inseticida tiametoxam, demonstram que esse tipo de variação pode ocorrer naturalmente, pois isolados obtidos de diferentes origens provavelmente adquirem, ao longo do tempo, características genéticas específicas que as distinguem dos demais isolados da mesma espécie, onde a germinação é iniciada quando as condições do meio são favoráveis para o crescimento vegetativo, porém, algumas linhagens possuem a característica de germinarem em condições desfavoráveis (Carlile *et al* 2001).

Para o inseticida etofenproxi, observou-se também uma redução significativa no crescimento micelial e na taxa de esporulação nos dois métodos utilizados, incorporação ao meio e pulverização, de 5 mm no diâmetro da colônia e 64,67% na taxa de esporulação e de 9,61mm e 57%, respectivamente. Quando avaliado o índice biológico desse produto observou-se que o fungo entomopatogênico *B. bassiana* é moderadamente compatível ao produto entre os métodos (Tabela 4).

Embora os inseticidas atuem de maneira geral nos insetos, em pontos específicos da sua fisiologia (Omoto, 2000), o modo de ação não determina que produtos pertencentes a estes grupos sejam seletivos a *B. bassiana*, em trabalhos semelhantes os autores classificaram etofenproxi como muito tóxico ao fungo (Tamai *et al* 2002). Este resultado nos leva a considerar que outros fatores devem estar envolvidos como: os sítios secundários de ação, quantidade e componentes da formulação e capacidade de alterar o pH do meio de cultura. O que pode ajudar a entender esta variação, foram os dois produtos testados neste trabalho com o mesmo sub-grupo químico das diamidas, onde o ingrediente ativo flubendiamida controlou totalmente o entomopatógeno e o clorantroliprole teve comportamento significativamente igual ao da testemunha.

Para o fungo *M. anisopliae* verificou-se que a aplicação do inseticida à base de espinosade, não promoveu diferença significativa de crescimento micelial em relação à testemunha, nos dois métodos testados, ocorrendo diferença apenas para variável esporulação quando o produto foi incorporado ao meio, apresentando uma redução de 30,70% na produção dos esporos. Esse resultado está de acordo com o obtido por Soares & Monteiro (2011), onde verificaram que carrapaticida contendo espinosade, não reduziu o crescimento micelial e a esporulação de maneira significativa de *M. anisopliae*.

A compatibilidade de produtos à base de espinosade com *M. anisopliae* deve estar relacionada à origem natural dos ingredientes ativos, que provém de fermentação realizada pelo actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa*. Os produtos derivados deste ingrediente ativo possuem baixa toxicidade aos mamíferos e aos organismos não alvo e com rápida degradação no ambiente (Cleveland, 2007).

O mesmo ocorreu para o inseticida clorrantraniliprole, onde o crescimento micelial e a taxa de esporulação não diferiu significativamente da testemunha, para ambos os métodos de contato do fungo com o produto (Tabela 3).

Trabalhos de compatibilidade realizados com inseticidas à base de clorrantraniliprole utilizando diferentes doses em relação ao fungo, também demonstraram compatibilidade com o entomopatógeno (Sittaet al 2009), corroborando com os resultados obtidos neste experimento. Com base no índice biológico (IB) (Tabela 5) constatou-se que os inseticidas espinosade e clorrantraniliprole foram compatíveis com o isolado de *M. anisopliae*, segundo a classificação determinada por Rossi-Zalaf et al (2008).

Os inseticidas formulados com etofenproxi e flubendiamida inibiram o crescimento micelial e a taxa de esporulação em relação à testemunha. Sendo que o produto a base de flubendiamida reduziu em 100,0% ambas variáveis analisadas no método de incorporação do inseticida ao meio de cultura e, no método por pulverização reduziu apenas o crescimento micelial em 17,88 mm. Etofenproxi reduziu 20 mm o crescimento micelial e quase 100,0% a taxa de esporulação no método por incorporação, não apresentando diferença significativa em relação essas variáveis no método por pulverização (Tabela 5).

De acordo com Ghini & Kimati (2000) a ação de inseticidas que agem no sistema nervoso e muscular dos insetos, mas que nos fungos, interferem na parede

celular, devido a ação desses compostos sobre a enzima que converte fosfatidiletanolamina para fosfatidilcolina e inibe a síntese de quitina, componente da parede celular destes organismos.

Ao utilizar o índice biológico para avaliar a toxicidade da flubendiamida ao microrganismo pelo método de incorporação, observou-se que o fungo leva o ingrediente ativo durante seu desenvolvimento vegetativo para seu organismo, através da emissão do tubo germinativo para absorção de nutrientes, agindo assim diretamente no seu interior, inibindo-o totalmente ou parcialmente sendo classificado como tóxico ao fungo.

O inseticida a base de tiametoxam não reduziu o crescimento micelial no método por incorporação, mas houve redução na esporulação (78,39%) quando comparado à testemunha, de forma contrária quando houve pulverização sobre as colônias de *M. anisopliae*.

Através do índice biológico (IB) etofenproxi e tiametoxam, pode-se considerar que os produtos foram moderadamente compatíveis ao fungo pelo método onde houve incorporação. Já no método por aspersão, a classificação toxicológica, apresentou compatibilidade do isolado aos inseticidas (Tabela 5). Ainda há poucos trabalhos de seletividade de inseticidas a base de etofenproxi a *M. anisopliae*, por isso a importância destas avaliações.

Batista Filho *et al* (2001) evidenciaram a compatibilidade de tiametoxam com 10 microrganismos entomopatogênicos testados, incluindo *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Cabe ressaltar que os testes *in vitro* mantêm o fungo exposto ao máximo com produto fitossanitário, o que não ocorre em condições de campo, onde fatores externos agem diretamente sobre o produto, principalmente radiação solar, deriva e ventos, atenuando a ação do princípio ativo sobre o fungo (Cavalcanti *et al* 2002).

De acordo com Azevedo *et al* (2002) o contato do fungo com certos produtos fitossanitários, durante um determinado período ou fase de desenvolvimento, permitiu que o entomopatógeno produzisse conídios viáveis, sugerindo que diante de fonte de estresse o microrganismo recupera-se, o que poderia demonstrar a capacidade adaptativa em relação ao meio.

No método por aspersão, o entomopatógeno se desenvolveu mostrando-se compatível ao fungo. Estes resultados podem estar relacionados à germinação do fungo, ao qual pode ser iniciada quando as condições do meio são favoráveis para o crescimento vegetativo, porém, algumas linhagens possuem a característica de germinarem em condições desfavoráveis (Fregonesi *et al* 2016). Sendo assim, essa é uma possível explicação para os bons resultados obtidos nesta metodologia.

A partir destes resultados, é possível que, para os inseticidas que evidenciaram resultados positivos de compatibilidade na metodologia por aspersão, possam ser aplicados na agricultura sem alterar o desenvolvimento natural dos entomopatógenos, já que a toxicidade de um produto *in vitro* nem sempre indica a sua toxicidade em campo, mas sim a possibilidade de ocorrência de efeito tóxico (Moino Jr & Alves 1998), afinal, as condições de laboratório não refletem com rigor as condições naturais de campo (Mochi *et al* 2005).

É importante salientar que, de maneira geral, a aplicação para ambos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, o método por incorporação apresentou-se mais tóxico, devido ao fungo quando inicia processo germinativo, já entra em contato com o produto, reduzindo seu crescimento micelial e esporulação.

Em relação aos fungicidas testados sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae*, observou-se inibição em relação aos ingredientes ativos utilizados, onde no método por incorporação do fungicida ao meio de cultura, todos os tratamentos testados

impediram o crescimento micelial, conseqüentemente, a esporulação dos entomopatógenos (Tabelas 2 e 3).

O fungicidatriciclazol não afetou totalmente o crescimento micelial e esporulação dos isolados *B. bassiana*, permitindo um crescimento médio de 12,19 mm e esporulação de 18,21%, diferenciando significativamente da testemunha. Tamai *et al* (2002) testaram fungicidas à base de *B. bassiana* e confirmaram a toxicidade de alguns grupos químicos avaliados neste trabalho como estrobilurina e triazol, os quais foram muito tóxicos ao fungo.

Na aplicação de fungicidas por aspersão, *M. anisopliae* teve crescimento micelial em todos os tratamentos, porém o único que não diferiu significativamente da testemunha foi triciclazol, com 47,58 mm de crescimento o qual também não diferenciou da testemunha na esporulação, com 70,2% de produção de conídios, os demais produtos não obtiveram índices de esporulação. Resultados semelhantes para triciclazol e azoxistrobina foram observados para *M. anisopliae* por Rampelotti e colaboradores (2010).

De acordo com o teste índice biológico de toxicidade (IB), *B. bassiana* e *M. anisopliae* obtiveram a mesma classificação para todos os fungicidas, independentemente do método utilizado, sendo os tratamentos considerados tóxicos para os isolados segundo o critério adotado, com exceção de triciclazol que foi classificado como compatível quando pulverizados (Tabelas 4 e 5).

2.4 Referências

Agrofit (2017) Phytosanitary Agrochemicals System – Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, Brazil, 2016. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Accessed 28 January 2017.

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

- Azevedo J.L De, Pizzirani-Kleiner A. A (2002) Melhoramento de fungos de importância na agricultura. In: Melo I.S De, Valadares-Ingliš M.C, N Ass L.L, Valois A.C.C (ed.) Recursos genéticos e melhoramento – microrganismos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 12: 323-355.
- Barbosa P, Hines J, Kaplan I, Martinson H, Szczepaniec A, Szendrei Z (2009) Associational resistance and associational susceptibility: having right or wrong neighbors. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Palo Alto, 40: 1–20.
- Barnett H. L (1960) *Illustrated genera of imperfect fungi*. 2(ed.) Burgess Publishing Company, 225p.
- Batista F.A, Almeida, J.E.M.; Lamas, C (2001) Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, Londrina, 30: 437-447.
- Bettiol W (2011) Biopesticide use and research in Brazil. *Outlooks on Pest Management* 22: 280-283.
- Carbone I & Kohn L.M (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553–556.
- Carlile M.J, Watkinson S.C, Gooday G.W (2001) *The Fungi*. 2th. (ed.) London: Academic Press, p 578.
- Cavalcanti R.S, Moino Jr. A, Souza G.C, Arnosti A (2002) Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 69: 17-22.
- Costa M. A, Moscardini V. F, Gontijo P. C, Carvalho G. A, Oliveira R. L, Oliveira H. N (2014) Sublethal and transgenerational effects of insecticides in developing *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ecotoxicology*, New York, 23: 1399–1408.
- Cleveland C.B (2007) Environmental and health assessments for spinosad against the backdrop of organic certification. *ACS Symposium Series*, 947: 109-130.
- El-Wakeil N, Gaafar N, Sallam A, Volkmar C (2013) Side effects of insecticides on natural enemies and possibility of their integration in plant protection strategies. In: Trdan S (ed.) *Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies*. INTECH Open, Massachusetts, cap 1.
- Dalzoto P.R & Uhry K. F (2009) Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 71: 37-41.
- Degrande P.E, Reis P.R, Carvalho G.A, Belarmino L.C (2002) Metodologia para avaliar o impacto de pesticidas sobre inimigos naturais. In: Parra J.R.P, Botelho P. S.M, Correa-Ferreira B.S, Bento J.M.S (Eds.) *Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores*. São Paulo: Manole, p 71-93.

- Faria M. R. De, Magalhães B. P (2001) O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual e perspectivas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 22: 18-21.
- Fonseca A. P. P, Marques E. J, Torres J. B, Silva L. M, Siqueira H. A (2015) Lethal and sublethal effects of lufenuron on sugarcane borer *Diatraea flavipennella* and its parasitoid *Cotesia flavipes*. *Ecotoxicology*, New York, v. 24.
- Fregonesi A. F, Mochi D. A, Monteiro, A. C (2016) Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* a inseticidas, herbicidas e maturadores em condições de laboratório. *Arquivos do Instituto Biológico*, 83: 01-08.
- Ghini R, Kimati H (2000) Resistência de fungos a fungicidas. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, p 78.
- Loureiro E.S, Moino A. Jr, Arnosti A, Souza G. C (2002). Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. *Neotrop. Entomol.* 31: 263-269.
- Mochi D.A, Monteiro A.C, Barbosa A.C (2005) Action of pesticides to *Metarhizium anisopliae* in soil. *Neotropical Entomology*, Londrina, 34: 961-971.
- Moino Jr. A, Alves S.B (1998) 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*, 27: 611-619.
- Moro L. B, Polanczyk R. A, Pratisoli D, Carvalho J. R. & Franco C. R (2011) Potencial do uso de fungos entomopatogênicos no controle de *Tetranychus urticae* Kock (Acari: Tetranychidae) em mamoeiro: efeito de cultivares sobre a patogenicidade. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78: 267-272.
- Moscardini V. F, Gontijo P. C, Michaud J. P, Carvalho G. A (2015) Sublethal effects of insecticide seed treatments on two nearctic *Lady beetles* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecotoxicology*, New York, 24: 1152-1161.
- Neves P.M.O.J, Hirose E, Tchujo P.T, Moino Jr. A (2001) Compatibility of Entomopathogenic Fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology*, 30: 263-268.
- Omoto C (2000) Modo de ação de inseticidas e resistência de insetos a inseticidas. In: Guedes JC, Costa I.D, Castiglioni E (Org.) *Bases e técnicas do manejo de insetos*. Santa Maria: Pallotti, p 31-49.
- Rampelotti-Ferreira F.T, Ferreira A, Prando H. F, Tcacenco F. A, Grützmacher A. D, Martins J.F da S, Mattos M.L.T (2007) Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo, 74: 141-148.

Rampelotti-Ferreira F.T, Ferreira A, Prando H. F, Tcacenco F. A, Grützmacher A. D, Martins J.F da S (2010) Seletividade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado ao fungo *Metarhizium anisopliae*, agente de controle microbiano de *Tibraca limbativentris*. *Ciência Rural* [online]. 40:745-751.

Rossi-Zalaf L.S, Alves S.B, Lopes R.B, Silveira Neto S, Tanzini M.R (2008) Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: Alves S. B, Lopes R. B (ed.) *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Piracicaba: FEALQ, p 270-302.

Sindieveg (2016) Setor de agroquímicos confirma queda nas vendas <http://sindieveg.org.br/sindieveg-news/> Acessado em Janeiro 5, 2017.

Sitta R. B, Gouveia L, Sosa-Gomez D. R (2009) Compatibilidade de inseticidas com fungos entomopatogênicos. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/72358/1/ID-29937.pdf> Acessado em Janeiro 5, 2017.

Soares F.B, Monteiro A. C (2011). Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com carrapaticidas químicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78: 385-391.

Sun J, J.R Fuxa and G Henderson (2003) Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. *Journal Invertebrate Pathology*, 84:38-46.

Svedese V.M, Lima E.A.L.A.L, Porto A.L.F (2013) Horizontal Transmission and Effect of the Temperature in Pathogenicity of *Beauveria bassiana* Against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56: 413-419.

Tamai M.A, Alves S.B, Lopes R.B, Faion M, Padulla L.F.L (2002) Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v: 69.

Thilagam P, Sivasubramanian P, Kuttalam S, Kubendran G (2010). Compatibility of Flubendiamide 480 SC (Fame) against *Trichoderma viride* (Persoon) and *Beauveria bassiana* (Balsamo). *Pestology*, 34: 53-55.

White T.J, Bruns T, Lee S. & Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (ed.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic, San Diego, p 315-322.

Tabela 1. Agrotóxicos registrados para cultura da soja e arroz irrigado utilizados nos ensaios de seletividade (Agrofit).

Ingrediente Ativo	Grupo químico	Cat	Vol. calda	Dose (ha⁻¹)
Tiametoxam	Neonicotinoide	I	100-150g/ha	100*
Clorantraniliprole	Antranilamida	I	100-200L/ha	100*
Flubendiamida	Diamida	I	200-300L/ha	200*
Etofenproxi	Éter difenílico	I	150 L/ha	150*
Espinosade	Espinosina	I	100-200L/ha	100*
Triciclazol	Benzotiazol	F	200-300L/ha	200*
Trifloxistrobina + Protioconazol	Estrobirulina + triazolinthione	F	200 L/ha	200*
Trifloxistrobina + Tebuconazol	Triazol + estrobirulina	F	200 L/ha	200*
Azoxistrobina + Ciproconazol	Estrobilurina + triazol	F	100-200L/ha	100*

*Dados obtidos no Agrofit (2016). Cat = Categoria I = inseticida e F = fungicida

Tabela 2. Crescimento micelial das colônias (mm) e número médio de conídios por mL⁻¹ (x 10⁵), e porcentagem de inibição de *Beauveria bassiana* na presença de agrotóxicos por incorporação e pulverização sobre o fungo entomopatogênico.

INSETICIDAS								
Tratamento I.A	Incorporação				Pulverização			
	CM (mm)		ESP x 10 ⁵ (mL ⁻¹)		CM (mm)		ESP x 10 ⁵ (mL ⁻¹)	
Clorantraniliprole	27.37 ± 2.02	Ab	273.63 ± 133.05	BCa	32.22 ± 3.95	Aa	98.25 ± 74.58	Ba
Espinosade	21.36 ± 2.00	Ba	360.63 ± 82.52	ABa	21.42 ± 8.40	Ba	26.00 ± 10.54	BCb
Etofenproxi	13.72 ± 1.09	Ca	173.75 ± 86.44	Ca	18.30 ± 8.10	BCa	47.13 ± 18.10	BCb
Flubendiamida	0.00 ± 0.00	Db	0.00 ± 0.00	Da	11.86 ± 3.95	Ca	0.75 ± 0.64	Ca
Tiametoxam	15.13 ± 0.75	Cb	182.37 ± 78.92	Ca	22.12 ± 8.09	Ba	89.00 ± 63.45	Ba
Testemunha	26.38 ± 2.37	Ab	516.25 ± 181.53	Aa	31.73 ± 2.40	Aa	207.87 ± 49.81	Ab
CV	23.76		38.44		23.76		38.44	
FUNGICIDAS								
Tratamento	Incorporação				Pulverização			
	CM (mm)		ESP x 10 ⁵ (mL ⁻¹)		CM (mm)		ESP x 10 ⁵ (mL ⁻¹)	
Azoxistrobina+ciproconazol	0.00 ± 0.00	Ba	0.00 ± 0.00	Ba	0.00 ± 0.00	Ca	0.00 ± 0.00	Ba
Protioconazol+trifloxistrobina	0.00 ± 0.00	Ba	0.00 ± 0.00	Ba	0.00 ± 0.00	Ca	0.00 ± 0.00	Ba
Tebuconazol+trifloxistrobina	0.00 ± 0.00	Ba	0.00 ± 0.00	Ba	0.00 ± 0.00	Ca	0.00 ± 0.00	Ba
Triciclazol	0.00 ± 0.00	Bb	0.00 ± 0.00	Ba	12.19 ± 4.15	Ba	37.87 ± 34.04	Ba
Testemunha	26.38 ± 2.37	Ab	516.25 ± 181.53	Aa	31.73 ± 2.40	Aa	207.87 ± 49.81	Ab
CV	24.08		37.12		24.08		37.12	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$), para comparação entre princípios ativos, médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste T de Student, para comparação de métodos dentro da mesma variável, ao nível de 5%. CM = Crescimento micelial, ESP = Esporos.

Tabela 3. Crescimento micelial das colônias (mm) e número médio de conídios por mL⁻¹ (x 10⁵) de *Metarhizium anisopliae* na presença de agrotóxicos por incorporação e pulverização sobre o fungo entomopatogênico.

INSETICIDAS								
Tratamento I.A	Incorporação				Pulverização			
	CM (mm)		ESP x 10⁵(mL⁻¹)		CM (mm)		ESP x 10⁵(mL⁻¹)	
Clorantroliprole	43.31 ± 9.38	Aa	90.75 ± 12.54	ABa	43.67 ± 16.96	ABa	50.25 ± 20.60	Ab
Espinosade	47.12 ± 10.11	Aa	73.37 ± 18.39	Ba	47.44 ± 8.13	ABa	40.75 ± 13.90	Ab
Etofenproxi	30.56 ± 7.65	Bb	0.13 ± 0.25	Db	52.17 ± 8.88	Aa	49.75 ± 21.64	Aa
Flubendiamida	0.00 ± 0.00	Cb	0.00 ± 0.00	Db	34.42 ± 10.50	Ca	65.37 ± 24.42	Aa
Tiametoxam	39.92 ± 7.34	Aa	22.87 ± 7.87	Cb	34.60 ± 13.79	BCa	47.75 ± 4.09	Aa
Testemunha	50.56 ± 8.49	Aa	105.87 ± 24	Aa	52.30 ± 4.44	Aa	69.12 ± 29.03	Aa
CV	24.43		34.51		24.43		34.51	
FUNGICIDAS								
Tratamento	Incorporação				Pulverização			
	CM (mm)		ESP x 10⁵(mL⁻¹)		CM (mm)		ESP x 10⁵(mL⁻¹)	
Azoxistrobina+ciproconazol	0.00 ± 0.00	Bb	0.00 ± 0.00	Ba	21.80 ± 1.89	Ca	0.00 ± 0.00	Ba
Protioconazol+trifloxistrobina	0.00 ± 0.00	Bb	0.00 ± 0.00	Ba	32.66 ± 15.09	Ba	0.00 ± 0.00	Ba
Tebuconazol+trifloxistrobina	0.00 ± 0.00	Bb	0.00 ± 0.00	Ba	18.09 ± 2.33	Ca	0.00 ± 0.00	Ba
Triciclazol	0.00 ± 0.00	Ba	0.00 ± 0.00	Bb	47.58 ± 5.57	Aa	48.50 ± 34.24	Aa
Testemunha	50.56 ± 8.49	Aa	105.87 ± 24.00	Aa	52.30 ± 4.44	Aa	69.12 ± 29.03	Aa
CV	26.89		28.22		26.89		28.22	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$), para comparação entre princípios ativos, médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste T de Student, para comparação de métodos dentro da mesma variável, ao nível de 5%. CM = Crescimento micelial, ESP = Esporos.

Tabela 4. Valores do índice biológico de toxicidade (IB) e classificação, entre alguns agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado e da soja ao entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

Produto	Incorporação		Pulverização	
	IB	Classificação	IB	Classificação
INSETICIDA				
Clorantraniliprole	93.78	C	93.25	C
Espinosade	117.29	C	89.43	C
Etofenproxi	63.41	MC	61.07	MC
Flubendiamida	3.33	T	19.00	T
Tiametoxam	45.89	MC	57.08	MC
FUNGICIDA				
Azoxistrobina+ciproconazol	0.00	T	0.00	T
Triciclazol	0.00	T	78.20	C
Trifloxistrobina+proticonazol	0.00	T	8.33	T
Trifloxistrobina+tebuconazol	0.00	T	0.00	T

Valores de IB e classificação do produto: 0-41 Tóxico(T); 42-66 moderadamente compatível (MC); >66 compatível (C), determinados segundo ROSSI-ZALAF et al (2008).

Tabela 5. Valores do índice biológico de toxicidade (IB) e classificação, entre alguns agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado e da soja ao entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.

Produto	Incorporação		Pulverização	
	IB	Classificação	IB	Classificação
INSETICIDA				
Clorantraniliprole	85.52	C	97.47	C
Espinosade	87.75	C	105.98	C
Etofenproxi	42.78	MC	108.59	C
Flubendiamida	33.93	T	103.42	C
Tiametoxam	50.71	MC	88.66	C
FUNGICIDA				
Azoxistrobina+ciproconazol	0.00	T	0.00	T
Triciclazol	0.00	T	73.44	C
Trifloxistrobina+proticonazol	35.00	T	35.00	T
Trifloxistrobina+tebuconazol	0.00	T	0.00	T

Valores de IB e classificação do produto: 0-41 Tóxico(T); 42-66 moderadamente compatível (MC); >66 compatível (C), determinados segundo ROSSI-ZALAF et al(2008).

2.5 Considerações finais

Os resultados obtidos neste trabalho são promissores, uma vez que a avaliação da seletividade a agentes de controle biológicos é de grande importância nos dias atuais. O uso inadequado de agrotóxicos nas grandes culturas causa perda de eficiência sobre o alvo biológico, afetando diretamente estes organismos que estão presentes na natureza, desempenhando um papel de biocontroladores naturais de pragas. Dos agrotóxicos testados, o inseticida clorantraniliprole foi compatível com a *B. bassiana* e *M. anisopliae*, depois dele, o inseticida espinosade também se mostrou compatível sob os dois métodos de contato, incorporação e aspersão, mostrando-se seletivos a estes microrganismos. Dos fungicidas testados, tricyclazole foi o único que apresentou compatibilidade com os fungos pelo método por aspersão.

Artigo 2 – NEOTROPICAL ENTOMOLOGY

**Efeito de óleos essenciais no desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (Bals.)
Vuil. e *Metarhizium anispliae* (Metsch.) Sorok.**

Vanessa Pinto Gonçalves; Renata Moccellini; Victória Nuñez Moreira; Wellington
Rodrigues; Cândida Renata Jacobsen de Farias

3 Artigo II – Efeito de óleos essenciais sobre o desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

Effect of essential oils on the development of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. And *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

VP GONÇALVES¹, R MOCCELLIN¹, VN MOREIRA¹, W RODRIGUES¹ CRJ FARIAS¹

¹Departamento de Fitossanidade, FAEM - Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

Correspondência: Vanessa Pinto Gonçalves, Departamento de Ciência e tecnologia de sementes, FAEM - Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil; vanessapg83@hotmail.com

Abstract

Knowledge about undesirable effects of conventional pesticides, Associated with environmental concern and food quality, have encouraged the research on new alternatives for controlling plant diseases. The objective of this work was to evaluate in vitro, if essential oils interfere in the development of entomopathogenic fungi. The essential oils of garlic, artemisia, citronella, clove, marjoram, melaleuca and oregano were used. The oils were added in potato-dextrose-agar (BDA) medium at concentrations of 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0% (v / v). Evaluation of mycelial growth and sporulation. The toxicity of essential oils to the entomopathogen was also verified through the Biological Index. The essential oils most compatible with *Beauveria bassiana* (Bals.) Were garlic oil at all concentrations and 0.2% marjoram for *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. garlic oil has been shown to be compatible with IB. The most harmful oils to *B. bassiana* were oregano oil at all concentrations tested, citronella oil which was moderately compatible only at the 0.2% concentration. Clove oil was toxic to both fungi, and at concentrations 0.2% moderately compatible. For *M. anisopliae* the compatible oils were garlic, marjoram, and melaleuca, being toxic only at the highest concentration 1.0% by IB. Essential oils with the exception of oregano and clove oils have potential for use in disease control.

Keywords: alternative control; compatibility; entomopathogens; toxicity.

Resumo

O conhecimento sobre os efeitos indesejáveis do uso de agrotóxicos convencionais, associado à preocupação ambiental e a qualidade dos alimentos, tem estimulado a busca por novas alternativas para o controle de doenças de plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* se óleos essenciais interferem no desenvolvimento de fungos entomopatogênicos. Foram utilizados os óleos essenciais de alho, artemisia, citronela, cravo, manjerona, melaleuca e orégano. Os óleos foram adicionados em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) nas concentrações de 0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0% (v/v). Foram realizadas as avaliações de crescimento micelial, esporulação. Foi também verificado a toxicidade dos óleos essenciais aos entomopatogênicos, através do Índice Biológico. Os óleos essenciais mais compatíveis a *Beauveria bassiana* (Bals.) foram o óleo de alho em todas as concentrações e a manjerona na concentração 0,2%, para *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. o óleo de alho demonstrou-se compatível pelo IB. Os óleos mais prejudiciais a *B. bassiana* foi o óleo de orégano em todas as concentrações testadas, óleo de citronela o qual foi moderadamente compatível somente na concentração 0,2%. O óleo de cravo mostrou-se tóxico aos dois fungos, e nas concentrações 0,2% moderadamente compatível. Para *M. anisopliae* os óleos compatíveis foram os de alho, manjerona, e de melaleuca, sendo tóxico apenas na concentração mais alta 1,0% pelo IB. Os óleos essenciais com exceção dos óleos de orégano e cravo apresentam potencial para serem utilizados no controle de doenças.

Palavras-chaves: controle alternativo; compatibilidade; entomopatogênicos; toxicidade.

3.1 Introdução

O aumento da produtividade no setor agrícola brasileiro está diretamente relacionado ao aumento do uso de produtos sintéticos como fertilizantes, herbicidas, fungicidas e inseticidas (Ferreira 2015). O uso destes produtos em larga escala, e sem nenhum tipo de controle tem provocado além de problemas de saúde ao produtor e ao consumidor, problemas ambientais, como contaminação de lenções freáticos, impacto aos organismos benéficos como fungos entomopatogênicos que fazem o controle natural de diversos insetos-pragas (Botelho & Monteiro 2011).

Em vista de minimizar estes efeitos, a procura por técnicas alternativas de controle de pragas e doenças vem aumentando, sendo assim, indicado a utilização de controle biológico e de produtos de origem não sintética, com propriedades bioativas (Bettioli, Gonçalves, Morais 2009).

O uso de óleos essenciais, extratos vegetais e metabólitos secundários de plantas, vêm sendo uma ferramenta a ser agregada nos sistemas alternativos de produção, e nos convencionais, como forma de aumentar a sustentabilidade da produção (Silva *et al* 2010). Estudos mostram que muitas plantas apresentam uma grande diversidade de substâncias em sua composição. Algumas delas com potencial fungicida e fungistático. Por isso, a importância de serem estudadas, para que possam servir de matéria-prima para síntese de novos produtos para o controle fitossanitário na agricultura (Celoto *et al* 2008).

Zanandrea *et al.* (2004) demonstraram que o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) inibiu o crescimento micelial de *Alternaria sp.*, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia sp.*, *Gerlachia oryzae*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* isolados de sementes de arroz. Todos estes fungos foram sensíveis ao composto majoritário do óleo essencial do orégano carvacrol, destacando-se a redução do crescimento micelial de *Bipolaris oryzae*. Outros óleos essenciais tem poder de inibição na germinação de urediósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, reduzindo a severidade da ferrugem em soja, como é o caso da citronela (*Cymbopogon nardus*) (Medice *et al* (2007). O uso de óleo essencial de alho ou o extrato de alho reduziu a severidade de míldio na videira, sendo uma boa alternativa para o controle de *Plasmopora viticola* em vinhedos orgânicos (Leite *et al.* 2011).

Há inúmeros exemplos da eficácia dos óleos essenciais no controle de fitopatógenos. Por outro lado, são escassas as informações sobre o impacto desses produtos, entre eles os óleos essenciais, sob aqueles fungos de relevância na agricultura como os entomopatogênicos, que auxiliam no controle de pragas de diferentes culturas de interesse agrônômico.

Entre os fungos entomopatogênicos destacam-se *Metharizhium anisopliae* (Metsch) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. Estes são relatados para o controle de insetos-pragas como: *Mahanarva posticata* (Hemiptera: Cercopidae) cigarrinha da cana, *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) percevejo-vede da soja (Michereff Filho *et al* 2011), *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) broca do café (Mourão *et al* 2003) e *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) huanglongbing em citrus (Pinto *et al* 2012).

Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar a seletividade de óleos essenciais sob o desenvolvimento de *Metharizhium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

3.2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes Fungos Fitopatogênicos (LPSFF) do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, em Pelotas/RS. Foram utilizados duas espécies de fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* da coleção do LPSFF. Os óleos essenciais (OEs) utilizados foram obtidos na Ferquímica Ind. E Com. Ltda. (SP) mantidos em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca à 25°C.

Para avaliar a seletividade dos OEs sob os fungos foram conduzidos ensaios em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 7x6, em que o fator A consistiu em sete OEs: alho (*Allium sativum* L.), artemisia (*Artemisia vulgares*) citronela (*Cymbopogon winterianus*), cravo (*Eugenia caryophyllu*), manjerona (*Origanum majorana*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e orégano (*Origanum vulgare*), e o fator B por seis concentrações dos OEs: 0,0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%

e 1,0%, com cinco repetições independentes para cada espécie de fungo. Foram avaliados o crescimento micelial e o índice biológico de toxicidade.

Para avaliar o crescimento micelial dos fungos entomopatogênicos, as diferentes doses dos OEs foram incorporados ao meio de BDA não solidificado, a 45°C, para que não houvesse alterações em suas propriedades. Posteriormente os fungos foram inoculados no ponto central da placa, utilizando uma agulha de platina, a partir de colônias jovens do fungo com dez dias de crescimento. As placas foram mantidas em sala de incubação (25°C) com fotoperíodo de 12h.

O crescimento micelial foi avaliado diariamente com um paquímetro digital, sendo realizadas medições em dois sentidos (verticalmente e horizontalmente), determinando o crescimento médio do diâmetro das colônias até o décimo dia de crescimento.

A avaliação da esporulação foi realizada no décimo quinto dia de incubação. Para isso, foram retirados discos de micélios de cinco pontos das placas de petri contendo as colônias fúngicas, com auxílio de um vazador de 7 mm de diâmetro. Estes discos foram acondicionados em tubo de ensaio contendo 20 mL de água destilada estéril (ADE) e uma gota de espalhante adesivo Tween 80 (0,1%). Para a quantificação dos conídios os tubos foram agitados por cerca de um minuto em vortex, sendo quantificados com auxílio de uma câmara de Neubauer (400X), conforme metodologia descrita por Fregonesi *et al* (2016) adaptado. Foram utilizados quatro repetições por tratamento.

Para quantificar a viabilidade (germinação) dos esporos foi realizado a retirada de uma alíquota de 3 µL dos tubos de ensaios (utilizadas para quantificar os esporos), sendo essa espalhada sob uma lamina contendo um bloco de 5 mm² de BDA. As laminas foram armazenada no interior de uma caixa de gerbox e incubado

à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12h por 20 h. A partir desse período foi quantificado com auxílio de um microscópio óptico com aumento de 400x, a porcentagem de conídios germinados, sendo contado 100 conídios ao acaso.

Foi feita uma correlação de Pearson a partir dos dados obtidos de crescimento micelial e esporulação dos fungos.

Estas avaliações deram suporte para calcular o índice biológico de toxicidade proposto por Rossi-Zalaf *et al* (2008),

Em que:

IB = índice biológico;

CV: porcentagem de crescimento vegetativo da colônia após 15 dias, em relação à testemunha;

ESP: porcentagem de esporulação após 15 dias, em relação à testemunha;

GER: porcentagem de germinação dos conídios após 15 horas, em relação à testemunha.

A partir dos valores de IB classificou-se os OEs de acordo com sua toxicidade a partir de uma escala em que valores entre 0 - 41 o OEs foi considerado tóxico; de 42-66, moderadamente compatível e maior 66 – compatível (ROSSI-ZALAF *et al*, 2008).

Os dados foram submetidos à análise de variância as variáveis respostas, crescimento micelial foram submetidas a comparação das médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade para comparação entre os tratamentos, os dados foram analisados estatisticamente mediante a utilização dos testes paramétricos.

3.3 Resultados e Discussão

Para o crescimento micelial Fig. 1 e 2 pode-se verificar que ambos os fungos, *Beauveria bassiana* e *Metharizhium anisopliae*, apresentaram diferenças em relação aos OEs e as concentrações testadas. Observa-se que para os OEs de alho e melaleuca em *M. anisopliae* não ocorreu o ajuste ao modelo de regressão significativo. Observa-se também que para os OEs orégano e cravo, para ambos os fungos apresentaram respostas semelhantes, em que o crescimento micelial (CM) foi reduzido a partir da concentração 0.2% do OE de orégano e 0,4% de cravo, mostrando que os fungos apresentam maior sensibilidade a estes OEs (Tabela 1 e 2).

Os OEs de orégano e cravo caracterizam-se por apresentarem atividade antifúngica, controlando o desenvolvimento de espécies de fungos fitopatogênicos como o agente causal da ferrugem em videira, *Phakopsora euvitis* (Fialho *et al* 2015) *Botrytis cinerea*, causadores de podridão de pós-colheita (Combrinck *et al* 2011) e de patógenos de solo como a *Rhizoctonia solani* (Costa *et al* 2011). Isso deve-se principalmente á sua composição sendo basicamente constituído de compostos fenólicos, monoterpenos e terpenóides (Gilles *et al* 2010). Estes por sua vez tem ação sobre a estrutura e a função da membrana celular, alterando a assim a funcionalidade do metabolismo do fungo (Oliveira *et al* 2011, Seixas *et al* 2011).

Os demais OEs citronela, melaleuca, manjerona e artemisia também tiveram efeito significativo sobre o desenvolvimento dos fungos, apresentando variações na sensibilidade dos mesmos (Tabela 1 e 2), em que o óleo de citronela apresentou diferença significativa entre as doses. Este óleo é composto por 40% de citronelol que apresenta uma alta ação antimicrobiana e acaricida (Marco *et al* 2007), sendo muito testado no controle de fungos fitopatogênicos como a *Pyricularia grisea* em

arroz, apresentando resultados satisfatórios na concentração de 8% (Perini *et al* 2011).

Já OEs melaleuca, manjerona e artemisia, obtiveram um efeito inibitório moderado ao fungo *B. bassiana*, não tendo diferenças estatísticas entre as concentrações (Tabela 1 e 2). Estes resultados demonstram certa compatibilidade dos óleos com os fungos, porém os efeitos variam conforme o aumento ou a redução nas concentrações. No entanto, para o óleo essencial de melaleuca, pode-se observar que na concentração 0,6%, o CM de *M. anisopliae*, teve um aumento no seu desenvolvimento, não podendo ser calculado as porcentagens de inibição em virtude do não ajuste do modelo de regressão para este tratamento (Tabela 2).

Já o óleo essencial de alho, foi o que apresentou a menor influência sobre os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* não prejudicando o CM em todas as concentrações testadas, mostrando-se compatível aos fungos testados (Figura 1 e 2). Apesar do OEs de alho ter apresentado menor ação sobre estes fungos benéficos, há vários relatos na literatura sobre o efeito inibitório no desenvolvimento de fungos fitopatogênicos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp. (Venturoso *et al* 2011), *Penicillium* sp (Brand *et al* 2009), *Curvularia* sp. e *Alternaria* sp. (Barros *et al* 1995).

Para *B. bassiana* observa-se uma forte correlação positiva significativa entre o crescimento micelial e esporulação quando submetidos aos óleos essenciais de orégano (0.99), citronela (0.79), cravo (0.88), melaleuca (0.79), uma correlação moderada para o óleo de artemísia (0.64). Em relação aos óleos essenciais de alho e manjerona, a correlação não foi significativa (Tabela 3).

Para *M. anisopliae* também verifica-se uma forte correlação positiva significativa entre o crescimento micelial e esporulação quando submetidos aos

óleos essenciais de orégano (0.98), cravo (0.98), artemísia (0.80), citronela (0.70), uma correlação moderada para o óleo de manjerona (0.68). Os OEs de alho e melaleuca, apresentaram uma correlação não significativa (Tabela 4).

Pode-se deduzir que, conforme aumenta o crescimento micelial a esporulação também aumenta, demonstrando que estes óleos essenciais não estariam influenciando no desenvolvimento destes fungos entomopatogênicos.

Em relação ao índice biológico (IB) tanto para *B. bassiana* quanto para *M. anisoplae* (Tabela 5 e 6) pode-se observar que o OEs de alho não foi prejudicial aos fungos, sendo classificado como compatível. Para os demais OEs ocorreram diferenças para cada fungo testado, em que o óleo de manjerona a partir da concentração 0,8% e 0,2%, mostrou-se moderadamente compatível para *M. anisoplae*, e para a *B. bassiana* respectivamente.

O óleo de artemisia foi tóxico a *B. bassiana* na concentração 0,6% as demais concentrações foram moderadamente compatíveis. Já citronela e cravo foram moderadamente compatíveis somente para as doses 0,2%, para o restante foram tóxicas. Por outro lado, o que mais se mostrou tóxico aos fungos testados foi o óleo de orégano, sendo classificado em todas as concentrações como tóxico, por esse motivo é considerado como potente bactericida e fungicida reconhecido cientificamente (Castro, 2004).

3.4 Referências

Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P (2007) Active antifungal substances from natural sources. Arkivoc. University Complutense. Madrid. p.116-145.

Alves SB, Moino Jr A, Almeida JEM (1998a) Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: Alves S.B. Controle microbiano de insetos. (ed.) Piracicaba: FEALQ, p 217-238.

Antunes MDC, Cavacob A (2010) The use of essential oils for postharvest decay control. A review. Flavour Fragrance Journal. 25: 351-366.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446–475.

Bettiol W, Morandi MAB, Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 314p

Brasil Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2016) Projeções do Agronegócio: Brasil e Mundial até 2016/2017, Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília. Acessado em 8 março, http://www.agroprecisa.com.br/site/noticias/download/Agronegocio_10anos.pdf

Bollen J & Fucks A (1970) On the specificity of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of benomyl. *Netherland Journal of Plant Pathology*, 76: 299-313

Bolkhan HA, Ribeiro WL (1981) Efeito do extrato de alho em *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*, *Fitopatologia Brasileira*, 6: 565-566.

Brand SC, Junges E, Milanesi P, Blume E, Muniz M F B (2009) Extratos vegetais no controle de patógenos em sementes de cebola, 2006. Disponível em: www.ufpel.edu.br/cic/2006/arquivos. Acessado em 12 de março de 2017

Barros ST, Oliveira NT, Maia LC (1995) Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* sp., *Summa Phytopathologica*, 21: 168-170

Bastos CN (1992) Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palmivora* por extrato de bulbo de alho, *Fitopatologia Brasileira*, 17: 454 – 457

Baydarh A, Sagdiç O, Zkan G (2004) Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15: 169-172

Botelho AAA & Monteiro ACS (2011) Toxicidade de agrotóxicos usados no cultivo da cana-de-açúcar para fungos entomopatogênicos no solo. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, 21: 73-84

Castro H.G De, Ferreira F.A, Silva D.J.H, Mosquim P.R (2004) Metabólitos secundários – contribuição ao estudo das plantas medicinais. 2ª(ed.) Visconde do Rio Branco: SUPREMA, p.113

Carriconde C, Mores D (1988) *De volta às Raízes*, Olinda: GCL Gráfica e Editora Ltda. p.13

Combrinck S, Regnier T, Kamatou G.P.P (2011) *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, 33: 344-9

Costa ART, Amaral MFZJ, Martins PM, Paula JAM, Fiuza TS, Resvenzol LMF, Paula JR, Bara MTF (2011) Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*.13: 240-245

Ferreira MLPC (2015) A pulverização área de agrotóxicos no Brasil: Cenário atual e desafios. *Revista de Direito Sanitário*. São Paulo. 15: 18-45

Fialho RO, Papa MFS, Pereira DAS (2015) Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Phakopsora euvitis*, agente causal da ferrugem da videira. *PLANT PATOLOGY*. Arq. Inst. Biol. São Paulo. 82: 1-7

Gilles M, Zhao J, An M, Agboola S (2010) Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*. 119: 731-737

Gonçalves GG, Mattos LPV, Morais LAS (2009) Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de soja. *Hortic. bras*. 27: 102-107

Hammer KA *et Al* (2004) Antifungal Effects Of Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil And Its Components On *Candida Albicans*, *Candida Glabrata* And *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 53: 1081–1085

Kataria HR, Grover RK (1978) Comparison of fungicides for the control of *Rhizoctonia solani* causing damping-off of mung bean (*Phaseolus aureus*). *Annual Applied Biology*, Camberra, 88: 257-263

Katzung BG (2003) *Farmacologia Básica e Clínica*. 8. (ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.1008

Kundu, A. et al. (2013a) Antioxidant and antifungal properties of the essential oil of *Anisomeles indica* from India. *Journal of Medicinal Plants Research*, Ilha Victoria. n. 24, 7: 1774-1779.

Lorenzetti, E.R. et al. (2011) Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu. 13: 619-627

Marco C.A, Innecco R, Mattos S.H, Borges N.S.S, Nagão E.O (2007) Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. *Horticultura Brasileira*, 25: 429-32

Medice R, Alves E, Assis R.T, Junior R.G.M, Lopes E.A.G.L (2007) Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência Agrotecnica*, 31: 83-90

Michereff MFF, Laumann RA., Borges M, Michereff-Filho M, Diniz IR, Farias Neto AL, Moraes MCB (2011) Volatiles mediating a plant-herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. *J. Chem. Ecol*. 37: 273–285

- Morais LAS (2009) Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: Bettiol, W.; Morandi, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. 1ª (ed.) Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente, pp 139-152
- Mourão AS, Vilela EF, Zanuncio JC, Zambolim L, Tuelher ES (2003) Seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Neotropical Entomology. 32: 103-106
- Mccalley D & Torres-Grifol JF (1992) Analysis of volatiles in good and bad conditions by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. Analyst, Washington, 117: 721-725
- Oliveira MMM, Brugnera DF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Piccoli RH (2011) Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. Botucatu-SP. 13: 8-16
- Pereira AS, Sarmiento-Brum RBC, Gonçalves AH, Cardon CH, Guimarães LGL, Santos GR (2012) Fitotoxicidade de óleos essenciais em plantas de melancia, feijão e arroz. Tropical Plant Pathology, v.38
- Perini VB De M, Castro HG De, Santos GR Dos, Aguiar RW De S, Leão EU, Seixas PTL (2011) Avaliação do efeito curativo e preventivo do óleo essencial do capim citronela no controle de *Pyricularia grisea*. Journal of Biotechnology and Biodiversity, 2: 23-27
- Pinto APF, Batista Filho A, Almeida JEM, Wenzel IM (2012) Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psilídeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília. 47: 1673–1680
- Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A (2006) Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*. Food Control. 17: 359-364
- Rossi-Zalaf LS, Alves SB, Lopes RB, Silveira Neto S, Tanzini MR (2008) Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: Alves S. B, Lopes R. B (ed.) Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, p 270-302
- Silva MB, Morandi MAB, Junior TJP, Venzon M, Fonseca MCM (2010) Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas In: Venzon M, Júnior TJP, Pallini (coord.). Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Viçosa: EPAMIG. p 33-54
- Seixas PTL, Castro HC, Santos GR, Cardoso DP (2011) Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 13: 513-517
- Simões CMO & V Spitzer (1999) Óleos voláteis. In C.M.O. Simões, Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis, UFRS/UFSC, p 416

Souza AEF, Araujo E, Nascimento LC (2007) Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. Fitopatologia Brasileira. São Paulo-SP. 32: 465-471

Talamini V, Stadnik MJ (2004) Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: Manejo Ecológico de Doenças de Plantas, Florianópolis. SC: CCA/UFSC, p 45-62

Venturoso L Dos R, Bacchi LMA, Gavassoni LW, Conus LA, Pontin C A B, Bergamin CA (2011) Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. Summa Phytopathologica.37: 18-23

Vieira AMFD (2016) Óleos essenciais e substâncias alternativas no manejo de podridões pós-colheitas de Maça Fuji. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Universidade Estado de Santa Catarina. Lages-SC p. 87

Wilson CL, Solar JM, Ghaouth AE, Winiewski ME (1997) Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*, Plant Disease. 81: 204-210

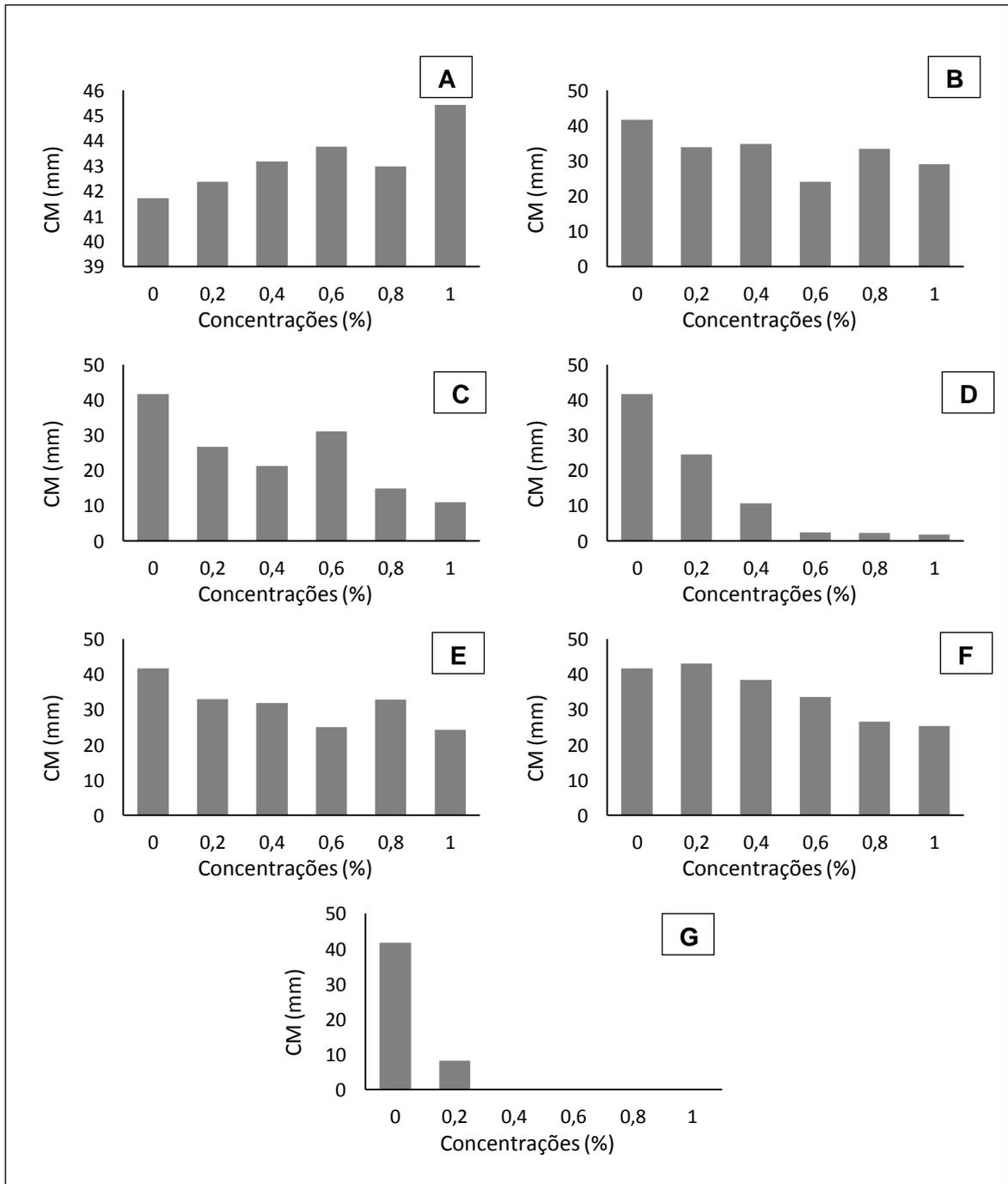


Fig 1. Crescimento micelial de *Beauveria bassiana*, nas diferentes concentrações de óleos essenciais. A - Alho; B - Artemísia; C - Citronela; D - Cravo; E - Manjerona; F - Malaleuca; G - Orégano.

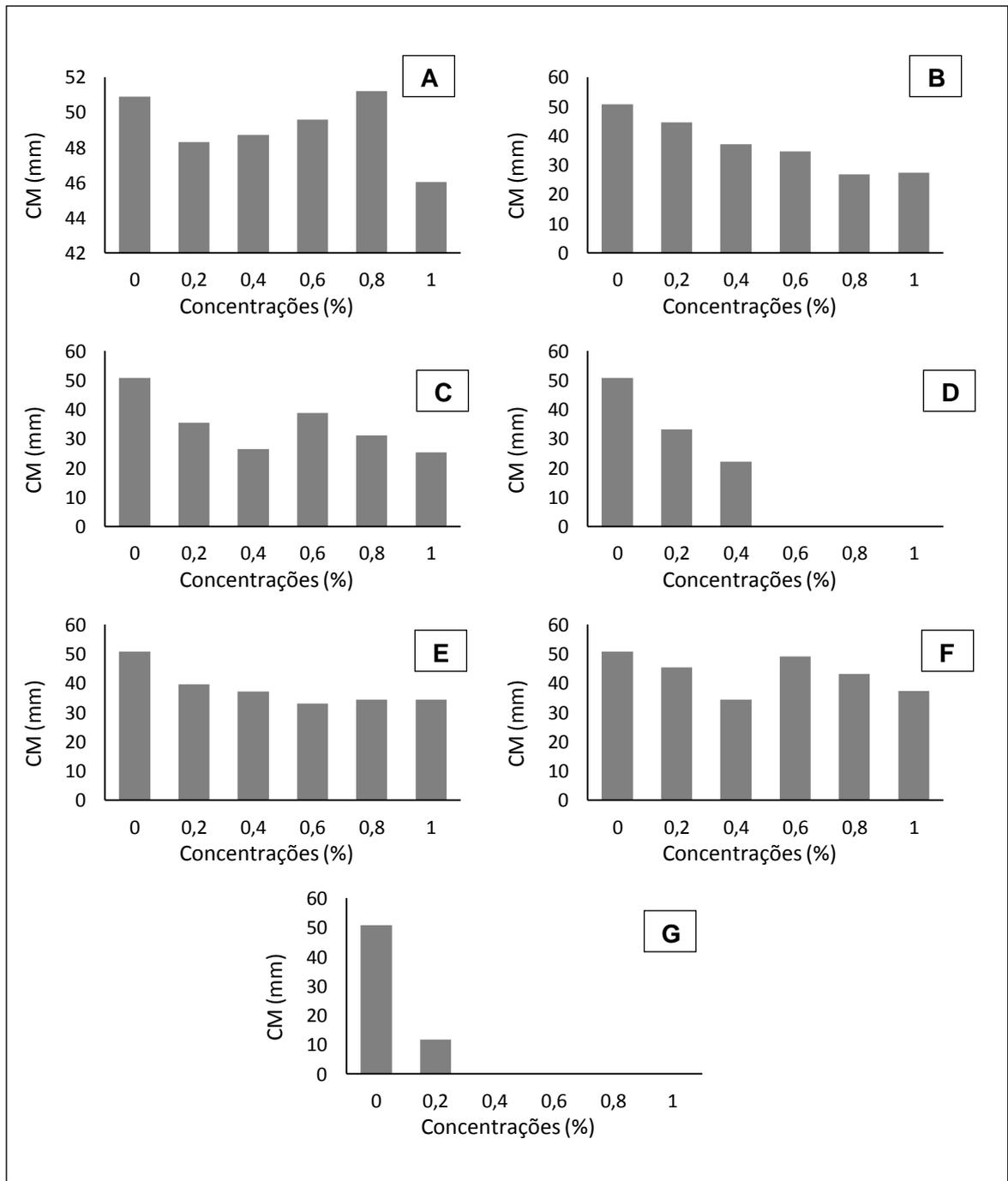


Fig 2. Crescimento micelial de *Metarhizium anisopliae*, nas diferentes concentrações de óleos essenciais. A - Alho; B - Artemísia; C - Citronela; D - Cravo; E - Manjerona; F - Malaleuca; G - Orégano.

Tabela 1. Crescimento micelial das colônias (mm) de *Beauveria bassiana* na presença de diferentes concentrações de óleos essenciais.

OE	Concentrações (%)										Equação		
	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0							
Alho	41,72	A*	42,37	AB	43,18	A	43,77	A	42,99	A	45,44	A	$y = 3,00x + 41,74$ $R^2 = 0,76$
Artemísia	41,72	A	33,95	BC	34,82	BC	24,06	C	33,42	B	29,15	B	$y = 22,98x - 33,72x + 41,29$ $R^2 = 0,70$
Citronela	41,72	A	26,79	CD	21,3	D	33,1	B	14,86	D	11,02	C	$y = -25,65x + 37,29$ $R^2 = 0,73$
Cravo	41,72	A	24,65	D	10,68	E	2,41	D	2,34	E	1,93	D	$y = 61,98x - 101,15x + 41,80$ $R^2 = 0,95$
Manjerona	41,72	A	32,97	CD	31,84	C	25,05	C	32,78	BC	24,34	B	$y = -13,47x + 38,18$ $R^2 = 0,63$
Melaleuca	41,72	A	43,16	A	38,49	BA	33,66	B	26,65	C	25,35	B	$y = -10,29x - 9,16x + 43,16$ $R^2 = 0,94$
Orégano	41,72	A	8,29	E	0,00	F	0,00	D	0,00	E	0,00	D	$y = 89,42x - 122,78x + 36,93$ $R^2 = 0,90$

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$), para comparação entre os óleos essenciais. OE = Óleo Essencial.

Tabela 2. Crescimento micelial das colônias (mm) de *Metarhizium anisopliae* na presença de diferentes concentrações de óleos essenciais.

OE	Concentrações (%)										Equação		
	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0							
Alho	50,89	A*	48,31	A	48,73	A	49,59	A	51,2	A	46,05	A	---
Artemísia	50,89	A	44,69	BA	37,09	B	34,67	B	26,82	D	27,5	BC	$y = 16,14x - 39,68x + 50,41$ $R^2 = 0,97$
Citronela	50,89	A	35,56	C	26,58	C	38,8	B	31,16	DC	25,44	C	$y = 23,85x - 42,17x + 47,08$ $R^2 = 0,73$
Cravo	50,89	A	33,15	C	22,13	C	0,00	C	0,00	E	0,00	D	$y = 58,28x - 11,30x + 52,46$ $R^2 = 0,94$
Manjerona	50,89	A	39,51	BC	37,13	B	33,05	B	34,33	C	34,28	BC	$y = 31,83x - 46,49x + 49,77$ $R^2 = 0,95$
Melaleuca	50,89	A	45,46	BA	34,37	B	49,12	A	43,18	B	37,35	AB	---
Orégano	50,89	A	11,78	D	0,00	D	0,00	C	0,00	E	0,00	D	$y = 108,33x - 149,74x + 45,59$ $R = 0,92$

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$), para comparação entre os óleos essenciais. OE = Óleo Essencial.

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson para valores médios das variáveis crescimento micelial e esporulação de *Beauveria bassiana* sob diferentes óleos essenciais.

	Coeficiente de correlação de Pearson						
	Alho	Artemísia	Citronela	Cravo	Manjerona	Melaleuca	Orégano
Correlação Pearson	-0,22	0,64	0,79	0,88	0,36	0,75	0,99
p-valor*	0,23	0,0006	<0,001	<0,0001	0,07	<0,0001	<0,0001

* Valores < 0,05 são significativos.

Tabela 4. Coeficiente de correlação de Pearson para valores médios das variáveis crescimento micelial e esporulação de *Metarhizium anisopliae* sob diferentes óleos essenciais.

	Coeficiente de correlação de Pearson						
	Alho	Artemísia	Citronela	Cravo	Manjerona	Melaleuca	Orégano
Correlação Pearson	-0,010	0,80	0,70	0,98	0,68	0,48	0,98
Valor-p*	0,96	<0,000	0,0001	<0,0001	0,0002	0,016	<0,0001

* Valores < 0,05 são significativos.

Tabela 5. Valores do índice biológico de toxicidade (IB) e classificações de toxicidade de sete óleos essenciais sobre *Beauveria bassiana*.

OE	Concentrações									
	0,2%	Classificação	0,4%	Classificação	0,6%	Classificação	0,8%	Classificação	1%	Classificação
Alho	103,91	C	104,42	C	94,87	C	79,66	C	95,30	C
Artemisia	48,68	MC	55,32	MC	38,11	T	54,38	MC	43,27	MC
Citronela	41,75	MC	27,68	T	38,15	T	18,40	T	12,98	T
Cravo	43,09	MC	22,46	T	14,04	T	2,64	T	2,17	T
Manjerona	76,63	C	57,72	MC	41,50	MC	49,92	MC	40,12	T
Melaleuca	65,58	MC	57,33	MC	54,36	MC	43,99	MC	61,97	MC
Orégano	23,94	T	0,00	T	0,00	T	0,00	T	0,00	T

Valores de IB e classificação do produto: 0-41 Tóxico(T); 42-66 moderadamente compatível (MC); >66 compatível (C), determinados segundo ROSSI-ZALAF et al. (2008).

Tabela 6. Valores do índice biológico de toxicidade (IB) e classificações de toxicidade de sete óleos essenciais sobre *Metarhizium anisopliae*

OE	Concentrações									
	0,2%	Classificação	0,4%	Classificação	0,6%	Classificação	0,8%	Classificação	1%	Classificação
Alho	70,71	C	86,08	C	74,29	C	62,73	MC	66,30	C
Artemisia	62,28	MC	53,42	MC	48,00	MC	41,00	T	43,20	MC
Citronela	51,04	MC	36,71	T	45,19	MC	50,82	MC	26,91	T
Cravo	55,63	MC	39,26	T	1,61	T	0,00	T	0,00	T
Manjerona	74,83	C	73,25	C	69,23	C	63,64	MC	52,84	MC
Melaleuca	69,47	C	53,68	MC	74,90	C	53,04	MC	41,10	T
Orégano	23,59	T	0,00	T	0,00	T	0,00	T	0,00	T

Valores de IB e classificação do produto: 0-41 Tóxico(T); 42-66 moderadamente compatível (MC); >66 compatível (C), determinados segundo ROSSI-ZALAF et al. (2008).

3.5 Considerações Finais

De acordo com os dados apresentados neste estudo pode se observar que o óleo essencial obtido a partir do alho é o mais indicado para ser utilizado em manejos integrado com o uso de fungos entomopatogênicos, pois foi o OEs que apresentou-se compatível sobre *B. bassiana* e *M. anisoplae*. Os demais OEs como manjerona e melaleuca, mostraram-se pouco seletivos sendo necessário maiores estudos em relação às doses que devem ser utilizadas para serem efetivos contra os microrganismos alvos, sem ter ação prejudicial sobre os não alvos.

Referências

ALVES, S.B.; MOINO JR., A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: Alves S.B. **Controle microbiano de insetos**. (ed.) Piracicaba: FEALQ, p 217-238, 1998.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; TAMAI, M.A.; MOINO JUNIOR, A.; ALVES, L.F.A. **Compatibilidade de produtos fitossanitários com entomopatógenos em citros**. Laranja, v.21, n.2, p. 289-294, 2005.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**.5th edn. San Diego,CA: Elsevier Academic Press. p.922, 2005.

ANDRADE P.J.M.; ANDRADE, D.F.A. **A Ferrugem asiática: uma ameaça a soja cultura brasileira**. Brasília, DF: Embrapa Agropecuária Oeste, Circular técnico 11, p.11, 2002.

ALMEIDA DE A.M.B.; BATISTA FILHO, A.; TAKADA, H.M.; LEITE, L.G.; ZAPPELINI, O.; WENZEL, I.M.; ALMEIDA, J.E.M.; CARVALHO, A.G. Susceptibilidade de *Rhynchophorus palmarum* à ação de *Metarhizium anisopliae* e compatibilidade do entomopatógeno com agrotóxicos utilizados na cultura da banana. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.77, n.4, p.661-668, 2010.

AMARAL, H.M; FURLAN S.H; MENTEN J.O. Localização de *Drechslera oryzae*, *Rhizosporium oryzae* e *Trichoconiella padwickii* em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.). In: Congresso brasileiro de sementes, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, p. 118, 1985.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p446–475, 2008.

BETTIOL W. **Biopesticides use and research in Brazil**. Outlooks on Pest Management. p.280-283, 2011.

BENHAM, R.W.; MIRANDA, J.L. The genus *Beauveria*, morfological and taxonomical studies of several species and of two strains isolated from wharf-piling bores. **Mycologia**, v.45, p.727-746, 1953.

BIZI, R.M. **Alternativas de controle do mofo cinzento e do oídio em mudas de eucalipto**. 2006. 67f. Dissertação (Mestrado) – Pós - Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). Série Histórica de Produção 2015/2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 12janeiro2017.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Embrapa lança livro sobre *Macrophomina phaseolina* em soja. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/2028971/embrapa-lanca-livro-sobre-macrophomina-phaseolina-em-soja>>. Acesso em: 13 de janeiro 2017.

FARIAS, C.R.J; AFONSO, A.P.S; PIEROBOM, C.R, DEL PONT, E. M. Regional survey and identification of *Bipolaris* spp. associated with rice seeds in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Ciência Rural**, v.41, p.369-372, 2011.

HARTMAN, G.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. **Compendium of soybean diseases**. Saint Paul: APS, 1999, p. 128, 1999.

LOUREIRO, E. De S. et al. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, v.30, p.263-269, 2002.

KATO, M.; YORINORI, J.T. A study on a race composition of *Phakopsora pachyrhizi* in Brazil: a difficulty of race identification. In: KUDO, H.; SUENAGA, K.; SOARES, R. M.; TOLEDO, A. (Ed.). **Facing the challenge of soybean rust in South America**. Tsukuba: JIRCAS; Londrina: Embrapa Soybean, 2008.p. 94-98. (JIRCAS Working Report, 58).

MARTINS J.F. et al. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.34, p.1681-1688, 2004.

MICHEREFF, S.J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife, p.133, 2001.

NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E. Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* Para o Controle Biológico da Broca-do-Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.1, p.077-082, 2005.

PRANDO, H.F. et al. Ciclo de vida de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo. v.37, p.335-339, 1993.

REHNER, S.A.; BUCKLEY E.A. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. **Mycologia**, Albuquerque. v.97, p.84–98, 2005.

SILVA, M.B.; ROSA, M.B.; BRASILEIRO, B.G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C.A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON M.; PAULAJÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle Alternativo de Pragas e Doenças**. Viçosa: Epamig/CTZM, p.221-246, 2005.

SILVA, M.L.R.B. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares em microrganismos. In: FIGUEIREDO, M. V. B., et al. **Biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília/DF, Recife/PE: Embrapa Informação Tecnológica, Instituto Agrônômico de Pernambuco. 1ª (ed) p.125-152, 2010.

SINDIEVEG. **Setor de agroquímicos confirma queda nas vendas 2016**. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/sindiveg-news/>>. Acessado em: 5 de Janeiro de 2017.

SPADOTTO, C.A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, São Manuel, 9 p., 2006.

SÓSA-GÓMEZ, D.R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetic Molecular Biology**, v.27, p.378-384, 2004.

VITTI, A.M.S; BRITO, J.O. **Óleo Essencial de Eucalipto**. Documentos florestais n.17, Agosto, 2003.

YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N.G.; PASSIANOTTO, A.L. de L.; SANTOS, J.V.M dos; BENITEZ; E.R.; ABDELNOOR, R.V.; SOARES, R.M.; SUENAGA, K. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v.35, n.3, p.153-162, 2010.

YORINORI, J.T. Situação atual das doenças potenciais no Cone Sul. In: Congresso brasileiro de soja e mercosoja. Foz do Iguaçu, **Anais...** 2002, p.171-186, 2002.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology, Oxford**. v.17, p.879, 2007.