

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO DE NIM NO CRESCIMENTO MICELIAL DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E *TRICHODERMA HARZIANUM*

Lilia Aparecida Salgado de Moraes¹; Liliana Patrícia Vital de Mattos²; Gabriela Granghelli Gonçalves¹; Wagner Bettiol¹.

¹Embrapa Meio Ambiente, CP 69, CEP: 13820-000, Jaguariúna/SP, ²Universidade Estadual Paulista, CP 237, 18610-307 Botucatu/SP. E-mails: lilia@cnpma.embrapa.br, lilianapatriciav@yahoo.com.br, gg.goncalves@uol.com.br, bettiol@cnpma.embrapa.br.

RESUMO

A associação de extratos de origem vegetal com fungos entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle biológico de pragas e doenças de plantas e ainda reduzir custos e impactos ambientais. No presente trabalho foi avaliado o efeito do óleo de nim, incorporado ao meio BDA (Batata-dextrose-ágar) nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1.000, 10.000 e 100.000 µ/L, sobre o crescimento micelial de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* e *Lecanicillium lecanii*. O óleo de nim foi adicionado ao meio antes e após a esterilização em autoclave por 20 min. e 1 atm. Na parte central das placas de Petri contendo os meios foi transferido um disco de micélio dos agentes de biocontrole e mantidas em sala de incubação a 27 ± 2°C. O crescimento da colônia foi avaliado diariamente por seis dias, considerando dois sentidos do diâmetro. Cada placa correspondeu a uma repetição sendo cinco placas por tratamento. O óleo de nim adicionado antes e após autoclavagem em todas as concentrações testadas, estimularam o crescimento micelial de todos os agentes de biocontrole. Esta associação é de grande valia para o controle biológico, pode aumentar a eficiência destes fungos e reduzir impactos ambientais.

PALAVRAS-CHAVE: *Azadirachta indica*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, agente de biocontrole e defensivos naturais.

ABSTRACT

The combination of extracts of plant origin with entomopathogenic fungi can increase the efficiency of biological control of pests and diseases of plants and to reduce costs and environmental impacts. This work was evaluated the effect of neem oil, incorporated into PDA medium (potato-dextrose agar) at concentrations of 0, 1, 10, 100, 1.000, 10.000 and 100.000 µ/L, the mycelial growth of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* and *Lecanicillium lecanii*. The neem oil was added to the medium before and after sterilization by autoclaving for 20 min. and 1 atm. In the central part of the Petri dishes containing the medium was transferred to a disk of mycelium of biocontrol agents and kept in an incubation room at 27 ± 2 ° C. The growth of the colony was measured daily for six days, taking both directions of the diameter. Each plate was a repeat with five plates per treatment. The neem oil added before and after autoclaving at all concentrations tested, stimulated the mycelial growth of all of biocontrol agents. This association is of great value to biological control, can increase the efficiency of these fungi and reduce environmental impacts.

KEYWORDS: *Azadirachta indica*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, biocontrol agent and natural defensives.

INTRODUÇÃO

O uso intensivo e indiscriminado de compostos químicos sintéticos tem sido, há muitos anos, o principal meio de controle de pragas e doenças de plantas. Além disso, estes compostos favorecem o surgimento de pragas secundárias e de patógenos resistentes a sua aplicação; além de serem altamente tóxicos, sendo prejudiciais ao ambiente e à saúde humana (Marques et. al., 2004).

A busca por produtos naturais que sejam eficientes no controle de pragas e doenças de plantas tem aumentado nos últimos anos, visando obter-se alternativas aos compostos químicos sintéticos. Os inseticidas naturais de origem vegetal podem vir a se constituir em importantes agentes de controle, por serem de fácil obtenção e utilização, terem baixo custo e minimizarem os problemas apresentados pelos produtos químicos sintéticos. (Carneiro et al., 2007).

O nim, *Azadirachta indica* A. Juss., árvore da família Meliaceae, é conhecido há séculos, principalmente na Índia, por sua ação medicinal e, nas últimas décadas seu estudo têm se difundido devido às substâncias inseticidas presentes nas folhas e frutos. Dentre os mais de 40 terpenóides já identificados na planta que possuem ação contra insetos, a azadiractina é o composto mais eficiente. Esses compostos têm grande potencial no controle de pragas, apresentam toxicidade extremamente baixa aos vertebrados, sendo praticamente inócuos, causando baixo impacto ao ambiente. O plantio do nim está crescendo rapidamente no Brasil, com o objetivo de exploração da madeira e também para a produção de folhas e frutos, de onde se retira a matéria prima para produtos inseticidas, para uso medicinal, veterinário ou na indústria de cosméticos (Martinez, 2002).

Outro recurso é o controle biológico, com a utilização de fungos entomopatogênicos, também uma alternativa viável devido à facilidade de produção, aplicação e eficácia. Podem ser usados isoladamente ou integrados com outros métodos, como os inseticidas naturais de origem vegetal, feromônios, variedades de plantas resistentes a insetos, etc (Lourenção et al., 1993). A associação destes com extratos de nim para o controle de pragas é uma possibilidade recente, podendo resultar em sinergismo entre os dois, uma aproximação considerada promissora, mas ainda pouco estudada.

Shashi et al. (1998) avaliaram o efeito de altas concentrações de azadiractina sobre o fungo *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch, sem, contudo obterem resultados significativos. Pramila et al. (1999) verificaram que sete produtos comerciais obtidos de nim, usados nas concentrações de 10.000, 1.000 e 100ppm, tiveram efeitos diversos no crescimento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., variando de inibitórios a estimulantes. Landa & Bohata (1999) constataram que não houve efeito negativo no crescimento e germinação de conídios do fungo entomopatogênico *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown & Smith, quando estudaram sua compatibilidade com dois inseticidas derivados de nim.

Vários trabalhos referem-se ao efeito de derivados do nim como inibidores do crescimento de fungos (Amadioha, 2000); contudo, pouco se conhece da ação de extratos de nim sobre fungos entomopatogênicos.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar, em laboratório, a ação do óleo de nim sobre os fungos *Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* e *Metarhizium anisopliae*, visando à possibilidade do uso associado destes no controle biológico de insetos e fitopatógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se os isolados de *Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* e *Metarhizium anisopliae*, sendo que estes foram cultivados em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), acondicionadas em sala de incubação a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 7 dias.

Como inseticida natural de origem vegetal utilizou-se um produto comercial de óleo de nim (Quinabra-lote 06010Y), contendo 100.000 ppm de azadiractina. Este foi adicionado em meio BDA antes da autoclavagem e BDA após autoclavagem nas seguintes concentrações: 0, 1, 10, 100, 1000, 10.000 e 100.000 μL do produto. Após vigorosa agitação, mantendo-se a temperatura do meio, verteu-se o mesmo em placas de Petri aproximadamente 10 mL (BDA+NIM) por placa. Estas placas constituíram os tratamentos do ensaio, foram inoculadas, adicionando-se um disco de micélio em sua parte central; Em seguida, foram acondicionadas em sala de incubação do laboratório de microbiologia ambiental (LMA) da Embrapa Meio Ambiente a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

O crescimento da colônia foi quantificado através de medidas, em milímetros, de dois diâmetros previamente marcados na parte externa do fundo da placa de Petri. As medidas foram efetuadas diariamente por dez dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete tratamentos (diferentes concentrações de óleo de nim) e cinco repetições, sendo que cada placa correspondeu a uma repetição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial das colônias de *Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* e *Metarhizium anisopliae* não foi afetado pelo óleo de nim adicionado antes e após autoclavagem em nenhuma das concentrações em que foram testadas (Fig. 1 e 2), mostrando que a taxa de crescimento para ambas as concentrações foi estatisticamente à mesma em relação a testemunha. Porém as concentrações de 10.000 e 100.000 μL foram as que mais se destacaram, mostrando uma estimulação do crescimento micelial de todos os agentes de biocontrole testados (Fig.1 e 2).

Estes resultados vão de acordo com Quintela et al. (2002), que verificou que o crescimento de *Beauveria bassiana* não foi afetado pelo óleo de nim puro (sem emulsificante) proveniente da República Dominicana. O óleo emulsificado (na concentração de 5%) e o óleo de nim (nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0%) reduziram o crescimento, mas este último óleo, na concentração de 0,25%, aumentou em 7,25% o crescimento do fungo. A produção de conídios obtida nas concentrações de 1,0 e 2,0% não diferiu da testemunha. Todas as concentrações do extrato comercial de folhas de nim reduziram o crescimento micelial, mas as concentrações de 5 e 10% não afetaram a esporulação do fungo.

O óleo de nim usado neste trabalho estimulou o crescimento dos fungos antagonistas independentemente da hora que foi adicionado (antes e após autoclavagem). A associação de extratos de origem vegetal com fungos entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle biológico de pragas e doenças de plantas e ainda reduzir custos e impactos ambientais. Contudo, trabalhos que avaliam o efeito de óleos essenciais e óleos fixos sobre estes fungos são bastante escassos na literatura, tendo a necessidade estudos mais aprofundados sobre o assunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMADIOHA, AC. 2000. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts *Azadirachta indica*. Crop Protection, Oxford, v.19, n.5, p.287-290.
- CARNEIRO, TPG; PIGNONI, E; VASCONCELLOS, MEC; et al. 2007. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. Summa phytopathol, vol.33, no.1, p.34-39.
- LANDA, Z; BOHATA, A. 1999. Compatibility of entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with natural insecticides based on azadirachtin and neem oil. Collection of Scientific Papers - Series for Crop Sciences, Ceske Budejovice, 16:2:99-106.
- LOURENÇÃO, AL; et al. 1993. Controle de *Sitophilus zeamais* em Milho com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e Pirimifos Metil. Ecossistema 18:69-74.
- MARTINEZ, SS. 2002. O Nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná. 142p.
- MARQUES, RP; MONTEIRO, AC; PEREIRA, GT. 2004. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*). Cienc. Rural 34:6:1675-1680.
- QUINTELA, ED; et al. 2002. Controle de pragas do feijoeiro com o nim indiano e outras plantas. In: BOIÇA JR., AL; et al. V Curso sobre produção e utilização do Nim (*Azadirachta indica*) na agropecuária. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, p.1-10.
- SHASHI, S; et al. 1998. Compatibility of *Beauveria brongniartii* with pesticides and organic manures. Pesticide Research Journal, Barking, 10:2:251-253.
- GUPTA, MP; et al. 1999. Studies on compatibility of white muscardine fungus *Beauveria bassiana* with some neem products. Indian Phytopathology 52:3:278-280.

Congresso Brasileiro de
Olericultura

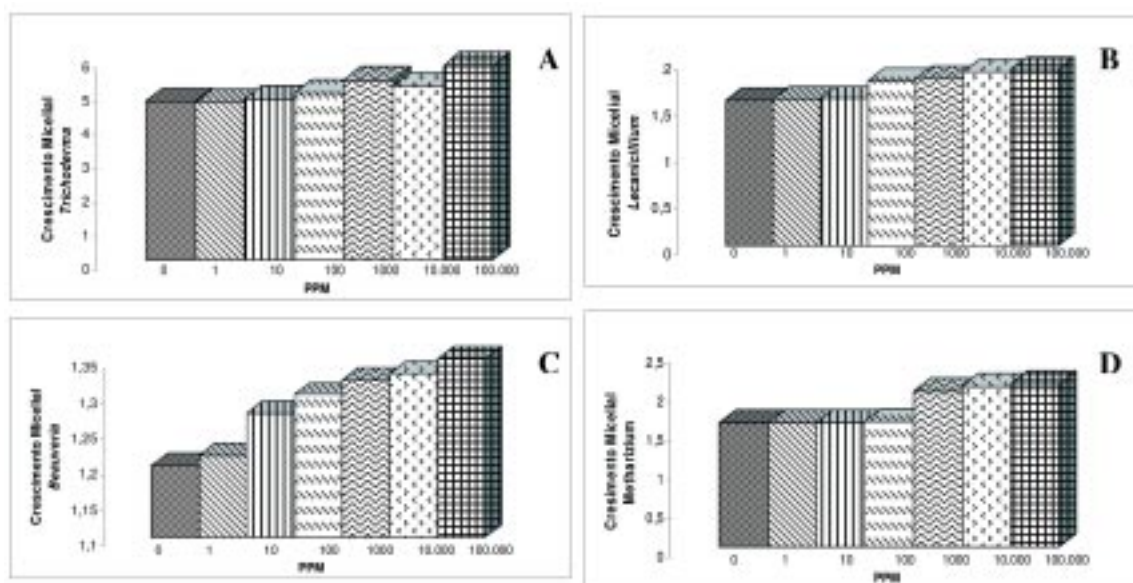


Figura 1. Crescimento micelial de *Trichoderma harzianum* (A), *Lecanicillium lecani* (B), *Beauveria bassiana* (C), *Metarhizium anisopliae* (D), em meio BDA contendo diferentes doses de óleo de nim, sendo este adicionado após autoclavagem. {Mycelial growth of *Trichoderma harzianum* (A), *Lecanicillium lecani* (B), *Beauveria bassiana* (C), *Metarhizium anisopliae* (D) in PDA medium containing different doses of neem oil, which was added after autoclaving}.

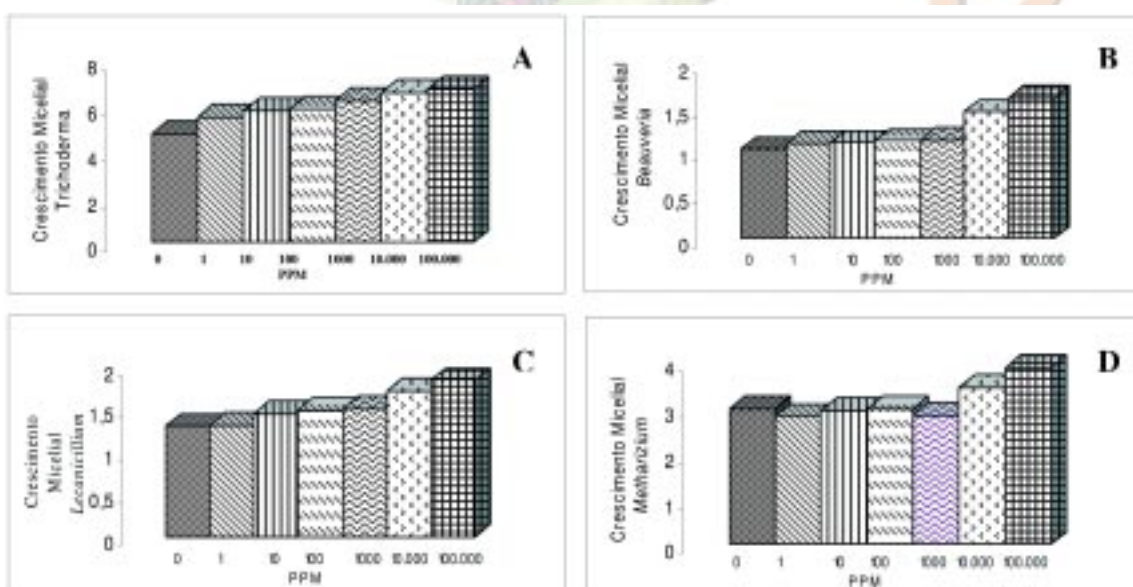


Figura 2. Crescimento micelial de *Trichoderma harzianum* (A), *Beauveria bassiana* (B), *Lecanicillium lecani* (C), *Metarhizium anisopliae* (D), em meio BDA contendo diferentes doses de óleo de nim, sendo este adicionado antes da autoclavagem. {Mycelial growth of *Trichoderma harzianum* (A), *Beauveria bassiana* (B), *Lecanicillium lecani* (C), *Metarhizium anisopliae* (D) in PDA medium containing different doses of neem oil, which was added before autoclaving}.