

## **EFEITO FUNGITÓXICO DO ÓLEO DE NIM SOBRE *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae***

*Álison Bruno da Silva Santos*

Especialista em Micologia, UFPE, Departamento de Micologia /CCB, CEP 50676-420. Recife- PE,  
E-mail: alisonbssantos@gmail.com

*Talita Fernanda Brandão da Silva*

Especialista em Micologia, UFPE, Departamento de Micologia /CCB, CEP 50676-420. Recife- PE,  
E-mail: brandao.talita@gmail.com

*Angela Coimbra dos Santos*

Prof. Adjunto, UFPE, Departamento de Micologia /CCB, CEP 50676-420. Recife- PE,  
E-mail: angelacoimbra@terra.com.br

*Laura Mesquita Paiva*

Prof. Adjunto, UFPE, Departamento de Micologia /CCB, CEP 50676-420. Recife- PE,  
E-mail: mesquitapaiva@terra.com.br

*Elza Áurea Luna-Alves Lima*

Prof. Titular, UFPE, Departamento de Micologia /CCB, CEP 50676-420. Recife- PE,  
E-mail: ealal@terra.com.br

**RESUMO** - O controle de pragas é baseado quase exclusivamente na aplicação de substâncias químicas, porém esses produtos são tóxicos ao homem aos animais e causam efeitos adversos sobre a qualidade ambiental. Em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) deve-se considerar o uso de inseticidas selecionados e fungos entomopatogênicos como uma estratégia viável ao controle de pragas na agricultura. Esse trabalho teve por objetivo avaliar em laboratório a compatibilidade dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* com o Óleo de Nim. A adição do produto foi feita no meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), ainda líquido ( $\pm 45^{\circ}\text{C}$ ), de modo que a concentração final do produto no meio de cultura obedecesse 50% da recomendação do fabricante. Após a inoculação dos fungos, as placas foram incubadas em sala climatizada a  $28^{\circ}\text{C}$ , fotofase de 12 horas e umidade relativa de  $75\pm 5\%$  por um período de 12 dias. A contagem do número de conídios por colônia foi feita através de câmara de Neubauer. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos (BDA com inseticidas) e um grupo controle (BDA sem inseticidas), sendo realizado nove repetições para cada tratamento. Os resultados mostraram que o inseticida inibiu a produção de conídios da linhagem de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* quando comparados aos da testemunha. O diâmetro das colônias de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* sofreram redução significativa em seu tamanho em relação ao controle. Assim, o inseticida testado na concentração e formulação utilizadas mostrou-se compatível com as linhagens testadas.

**Palavras-chave:** fungo entomopatogênico, controle biológico, manejo integrado de pragas.

## **EFFECT FUNGITOXIC OF THE OIL OF NIM ON *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae***

**ABSTRACT** - Plague control is based almost exclusively on application of chemical substances, however these products are toxic to men and animals and cause odd effects on environment quality. In Plague Integrated Management (PIM), the use of selected insecticides and entomopathogenic fungi should be considered as one viable strategy for plague control in agriculture. This work aimed to evaluate, in laboratory, the compatibility of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with the oil of Nim. The addition of the product was made to the potato-dextrose-agar medium still liquid ( $\pm 45^{\circ}\text{C}$ ), in a way that the final concentration obeyed 50% of the producer's recommendation. After fungi inoculation, the dishes were incubated in a cimatized room at  $28^{\circ}\text{C}$ , photophase of 12 hours and relative humidity of  $75\pm 5\%$  for 12 day period. The number of conidia per colonie was counted with a Neubauer chamber. Statistic delineament was entirely in random, with two treatments (PDA with insecticide), and a control group (PDA without insecticide), and 9 repetitions for each treatment. The results showed that the insecticide inhibited conidial production in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* strains when compared to the control group. The diameter of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* colonies suffered

significant reduction in its size, compared to control. The tested insecticide, in the concentration and formulation used, presented compatibility with the tested strains.

**KEY-WORDS:** entomopathogenic fungi, biologic control, integrated control.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, várias são as substâncias químicas usadas no controle de insetos, doenças e plantas invasoras. Entre as principais estão os inseticidas, os acaricidas e os fungicidas, porém muitos desses produtos são tóxicos ao homem e aos animais, além de reduzirem o potencial de controle de pragas por predadores, entomopatogênicos e parasitoides (ALVES, 1998). Os inseticidas exercem pressão de seleção sobre insetos-praga, ocorrendo também sobre populações de insetos benéficos, como inimigos naturais das pragas e polinizadores, podendo selecionar uma população resistente ao produto após sucessivas aplicações no campo, eliminando apenas os indivíduos mais sensíveis ao produto químico (ROSENHEIM e HOY, 1986).

Os fungos são responsáveis por cerca de 80% das enfermidades que ocorrem naturalmente nos insetos em agroecossistemas (BATISTA FILHO, 1989; ALVES, 1998; ROBBS e BITTEN, 1998). Os fungos entomopatogênicos exercem a função de controle de insetos em ambientes naturais e ecossistemas agrícolas, ocupando um lugar relevante na manutenção do equilíbrio ecológico. Nos últimos anos, o seu uso vem se intensificando, com vantagens em muitas situações, em substituição aos produtos químicos (ALVES, 1998).

A estratégia do controle associado ou integrado pode ser utilizada, neste caso, agrotóxicos seletivos são usados juntamente com fungos entomopatogênicos ou outros agentes de controle biológico. Os fungos estão entre os inimigos naturais que podem sofrer influência na aplicação de agrotóxicos, que devido à sua grande diversidade e sua intensa capacidade de multiplicação, oferecem uma ampla oportunidade para selecionar linhagens resistentes (GHINI e KIMATI, 2000).

O Óleo de Nim também conhecido como óleo vegetal tem azadiractina como princípio ativo que é extraído da árvore do Nim (*Azadirachta indica*) reconhecida por suas propriedades singulares de ação contra insetos e benefício à saúde humana (DIMETRY *et al.*, 1993). Podendo ser encontrada em áreas tropicais e subtropicais do mundo sendo utilizada na produção de matéria prima para medicamentos e inseticidas naturais que são considerados ideais para o manejo ecológico de pragas (RICE, 1993). As Azadiractinas causam diversos efeitos sobre insetos, agindo como inibidoras de alimentação, reguladoras de crescimento e esterilizantes (NARDO *et al.*, 1997). Os compostos extraídos dessa planta controlam mais de 400 espécies, incluindo insetos, nematóides, fungos, bactérias e mesmo algumas viroses (NATIONAL, 1992). Segundo Mordue e Nisbet (2000), um dos principais entraves no emprego do Nim são a baixa disponibilidade de sementes e o custo elevado dos produtos derivados. Óleo de Nim

assim como outros produtos podem influenciar os microrganismos, como no caso dos fungos, nos quais o crescimento vegetativo, a viabilidade e a esporulação, ou até mesmo a composição genética podem ser modificados, alterando a sua virulência (ALVES, 1998).

Contudo, o uso de inseticidas selecionados como estratégia no manejo integrado de pragas (MIP), associado aos agentes entomopatogênicos pode aumentar a eficiência do controle, diminuindo a quantidade de defensivos agrícolas e minimizando os riscos de contaminação e surgimento de genes de resistência (QUINTELA *et al.*, 1991, MOINO JR, 1998, ALVES, 1998). O presente estudo teve como objetivo avaliar a compatibilidade dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* com o Óleo de Nim, determinando os percentuais de germinação, crescimento micelial, esporulação e a toxicidade do inseticida natural sobre o desenvolvimento das linhagens.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* var. *acridum* (URM 4412) e *M. anisopliae* var. *anisopliae* (URM 3349), pertencentes Coleção de Cultura Micoteca (URM) do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife –PE.

O efeito do Óleo de Nim sobre os fungos foi estudado avaliando-se o crescimento vegetativo e a conidiogênese dos entomopatogênicos na presença ou ausência dos princípios ativos. A adição dos produtos foi feita no meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) ainda líquido ( $\pm 45^{\circ}\text{C}$ ), de modo que a concentração final do produto no meio de cultura obedecesse 50 % da recomendação do fabricante. Em seguida, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Foram preparadas nove placas por tratamento, sendo a inoculação realizada por meio de uma alça de platina, no centro de cada placa. As placas foram incubadas em sala climatizada a  $28^{\circ}\text{C}$ ,  $75\pm 5\%$  de UR e fotofase de 12h, por um período de 12 dias.

A cada 72 horas foi realizada a medição do diâmetro das colônias. Em seguida, com o auxílio de um perfurador fragmentos ( $0,5\text{ cm}^2$ ) dessas colônias foram retiradas das placas e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de ADE mais Tween 80 (0,05%). A desagregação dos conídios foi feita em um agitador de tubos. A contagem do número de conídios produzidos por colônia foi feita através de câmara de Neubauer.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) para comparação entre as médias, além do cálculo do fator de compatibilidade

(Valor “T”), proposto por Alves (1998). O cálculo desse índice foi feito através da fórmula:

$T = 20 [CV] + 80 [ESP] / 100$ , onde:

T = valor corrigido para classificação do produto;

CV= porcentagem de crescimento vegetativo em relação à testemunha;

ESP= porcentagem de esporulação (conidiogênese) em relação à testemunha.

Os valores calculados de “T” foram comparados com os seguintes limites estabelecidos:

0 a 30 = muito tóxico;

31 a 45 = tóxico;

46 a 60 = moderadamente tóxico;

> 60 = compatível.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância mostrou interação significativa entre as linhagens nos intervalos de tempo analisados. Os valores médios do crescimento micelial das linhagens testadas diferiram significativamente entre si. A linhagem URM 3349 apresentou maior média e taxa de crescimento (Tabela 1). Esses números reforçam um comportamento que tem sido comum em trabalhos que seguem essa metodologia de avaliação do efeito de produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos *in vitro*, como o de Alves (1998).

Tabela 1. Comparação dos valores médios do crescimento micelial das linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM 3349, e *M. anisopliae* var. *acridum* URM 4412 e tratamentos (Óleo de Nim e Controle) nos intervalos de tempo

Linhagens	Tempo (dias)				Média
	3°	6°	9°	12°	
URM 3349	1,01a	1,80a	2,50a	3,20a	2,13a
URM 4412	0,56b	1,24b	2,30a	3,53a	1,90b
<b>Tratamentos</b>					
Óleo de Nim	0,69b	1,34b	2,15b	2,98b	1,79b
Controle	0,88a	1,70a	2,62a	3,70a	2,22a
<b>Médias</b>	0,78D	1,52C	2,39B	3,35A	

**Tukey (P=0,05)**

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

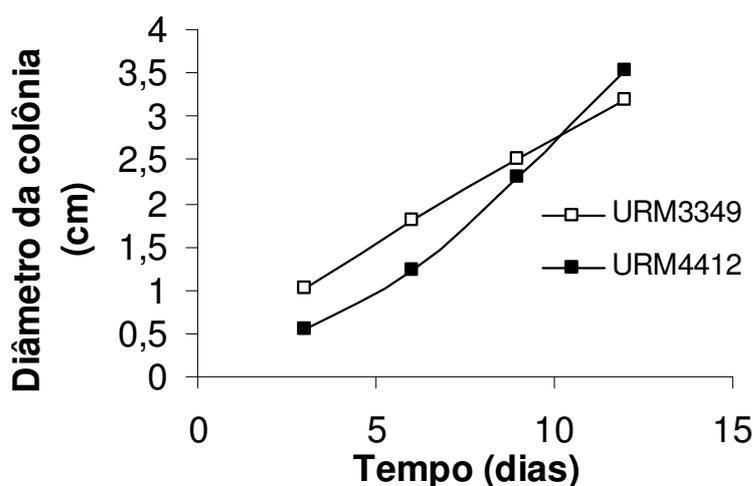


Figura 1. Diâmetro das colônias fúngicas URM 3349 e URM 4412 em meio acrescido de Óleo de Nim em função do tempo.

A análise estatística dos resultados das duas linhagens (*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* URM 3349, e *M. anisopliae* var. *acridum* URM 4412), não apresentaram variação significativa quanto aos percentuais de germinação (Tabela 2) para nenhum dos tratamentos aplicados, embora tenham apresentados diferentes valores. Resultados semelhantes foram obtidos por Andaló *et al.*, (2004), quando testaram a germinação dos conídios de *B. bassiana* a diferentes agrotóxicos.

A elevada germinação de conídios cultivados na presença de alguns produtos tóxicos pode ter ocorrido devido à degradação e metabolização dos princípios tóxicos das moléculas químicas pelo fungo (ALVES, 1998). Moino Jr. *et al.*, (1998), levantaram a hipótese de que o microrganismo, num mecanismo de resistência fisiológica, pode metabolizar os princípios tóxicos do ingrediente ativo, utilizando as moléculas resultantes desse processo, liberadas no meio de cultura, como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento

vegetativo e a conidiogênese. Outra possibilidade ainda é a de que o fungo, numa atividade comparável ao que ocorre com seres vivos em geral, utilize todo seu esforço reprodutivo quando em presença de um princípio tóxico que altera seu ambiente, e prejudica o seu desenvolvimento, resultando assim, em maior crescimento vegetativo e conidiogênese.

Os resultados obtidos referentes à área da colônia (Tabela 2), mostraram que a linhagem de *M. anisopliae* var. *acridum* (URM 4412) apresentou efeito inibitório significativo quando submetido a adição do inseticida. Entretanto, em experimento realizado por Loureiro *et al.*, (2002), os produtos químicos testados não afetaram o crescimento vegetativo de *M. anisopliae*. Resultado semelhante foi encontrado por Loria *et al.*, (1983) estudando o efeito de metalaxil sobre diferentes fungos, observaram que esse produto proporcionou o crescimento da colônia em *Paecilomyces fumosoroseus*.

Tabela 2. Percentual de germinação dos conídios (média ± desvio padrão), área da colônia (média ± desvio padrão) e esporulação das linhagens de *Metarhizium anisopliae* após 12 dias de inoculação em meio acrescido de Óleo de Nim, a 28°C e 12 horas de fotofase

Linhagens	T*	Germinação		Área da colônia		Esporulação	
		(%)	(%) redução/ aumento	(cm <sup>2</sup> )	(%) redução/ aumento	(10 <sup>7</sup> )	(%) redução/ aumento
URM3349	O	56,13±2,26a	0,00	3,32±0,36a	0,00	5,13±2,44a	0,00
	1	57,00±2,83a	+1,54	3,00±0,28a	-9,63	3,86±1,88b	-24,75
URM4412	O	44,33±1,70a	0,00	4,13±0,28a	0,00	3,20±3,26a	0,00
	1	45,66±1,70a	+3,00	2,98±0,36b	-27,84	4,00±5,65a	+25,00

\* Tratamentos; 0 = Controle; 1 = Com Inseticida.

Em relação à esporulação podemos observar que a linhagem URM 3349 com adição de inseticida apresentou diferença significativa quando comparada ao controle e a linhagem URM 4412 (Tabela 3). Andaló *et al.*, (2004), testando a compatibilidade de *B. bassiana* com agrotóxicos observaram que não houve diferença significativa em relação à esporulação entre a testemunha e o tratamento com tiametoxam. Loureiro *et al.*, (2002), verificaram a redução da esporulação de conídios de *M. anisopliae*, quando submetidos ao Imidaclopride, contudo resultados semelhantes não foram observados por Batista Filho *et al.*, (2001), em seus trabalhos com *M. anisopliae* que afirmaram não haver interferência do produto sobre a produção de conídios. Hirose *et al.*, (2001), estudaram o efeito da interação entre fungos entomopatogênicos e óleos de origem vegetal. Os autores observaram que a substância vegetal reduziu o crescimento e afetou significativamente a esporulação de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, sendo classificado como muito tóxico. Zimmermann (1975) afirma que a inibição do crescimento

micelial não é necessariamente um indicador da redução na esporulação ou da viabilidade conidial e vice-versa.

De acordo com a Tabela 3, verificou-se que as linhagens URM 3349 e URM 4412 foram compatíveis com o Óleo de Nim em sua concentração mínima. Sendo que a linhagem URM 4412 apresentou maior compatibilidade com o inseticida utilizado no experimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Neves *et al.*, (2001), analisando a compatibilidade dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, com diversos produtos fitossanitários nas concentrações médias recomendadas.

As colônias da linhagem URM 4412 apresentaram modificações morfológicas sensíveis quando comparadas às colônias do controle, tais como a presença de bordas irregulares e mudança na cor dos conídios, resultado semelhante foi observado por Loureiro *et al.*, (2002). Além disso, essas colônias apresentaram aumento na produção de conídios.

Tabela 3. Toxicidade e compatibilidade do Óleo de Nim para *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em condições de laboratório

Inseticidas	Linhagens			
	URM3349		URM4412	
	Valor de T <sup>1</sup>	C. T <sup>2</sup>	Valor de T	C. T
Óleo de Nim	77,80	C	114,64	C

<sup>1</sup> Valor de T, segundo fórmula proposta por Alves *et al.* (1998).

<sup>2</sup> Classificação Toxicológica: MT = Muito Tóxico; T= Tóxico; MdT = Moderadamente Tóxico; C = Compatível

## CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos, foi possível concluir que quanto aos percentuais de germinação as linhagens testadas não apresentaram variação;

Em relação à área da colônia (crescimento micelial) a linhagem de *M. anisopliae* var. *acridum* (URM 4412) apresentou efeito inibitório quando submetido a adição do inseticida natural;

A linhagem de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (URM 3349), apresentou menor esporulação com adição do Óleo de Nim;

Ambas as linhagens fúngicas apresentaram compatibilidade com produto. Dessa forma, espera-se que o produto considerado compatível nesse tipo de teste também o seja quando aplicado em condições de campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2ª. ed. Piracicaba, FEALQ, p.1163. 1998.

ANDALÓ, V.; MOINO, JR. A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Compatibility of *Beauveria bassiana* with chemical pesticides for the control of the coffee root mealybug *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, v.33, p.463-467, 2004.

BATISTA FILHO, A. Controle biológico e o manejo integrado de pragas. **Biológico**, v.55, p. 36-39, 1989.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, E. M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxan on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, v.30, p. 437-447, 2001

DIMETRY, N.Z.; AMER, S.A.A.; REDA, A.S. Biological activity of two neem seed kernel extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. **Journal of Applied Entomology**, v.116, p. 308-312, 1993.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna, **Embrapa Meio Ambiente**, p. 78, 2000.

HIROSE, E.; NEVES, P. M. O. J.; ZEQUI, J. A. C. Effect of Biofertilizers and Neem Oil on the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Brazilian archives of biology Technology**, v.44, p. 419-423, 2001.

LORIA, R.; GALAINI, S.; ROBERTS, D.W. Survival of inoculum of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as influenced by fungicides. **Environment Entomology**, v.12, p.1724-1726, 1983.

LOUREIRO, E. S.; MOINO, JR A.; ARNOSTI, A.; SOUZA, G. C. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, v. 31, p.263-269, 2002.

MOINO, JR. A.; SAAD, M. C.; ALVES, S. B. Ação tóxica de defensivos utilizados na cultura dos citros sobre fungos entomopatogênicos, p. 53. In: **Anais do Congresso de Iniciação Científica da ESALQ**, 4, Piracicaba, p. 7,1998.

MORDE, A. J.; NISBET, A. J. Azadiractina do nim, *Azadirachta indica*: sua ação contra insetos. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v. 29, p. 615-632, 2000.

NARDO, E.A.; COSTA, A.S.; LOURENÇÃO, A.L. Melia azedarach extract as an antifeedant to Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae). **Florida Entomologistic**, v. 80, p. 92-94, 1997.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Neem*: a tree for solving global problems. Washington: **National Academy Press**, p.139,1992

NEVES, P. M. O. J.; HIROSE, E.; TCHUJO, P. T. Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com

- inseticidas nicotinóides. **Neotropical Entomology**, v.30, p. 263-268, 2001.
- QUINTELA, E. D.; FERREIRA, B. P.; ROBERTS, D. W. Principales plagas del caupi em el Brasil. Goiânia: **EMBRAPA-CNPAF**, (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 35). 1991.
- RICE, M.J..Theory and practice of neem-based insect pest management. *In*: COREY, S.A., DALL, D.S., MILDE, W.N. (Eds.) **Pest Control and Sustainable Agriculture**, Camberra: CSIRO. p. 335-337, 1993
- ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A. M. Controle biológico de insetos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.6, p. 71, 1998.
- ROSENHEIM, J.A.; HOY, M.A. Intraspecific variation in levels of resistance in field populations of a parasitoid, *Aphis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae): the role of past selection pressures. **Journal. Economic. Entomology**, v. 79, p.1161-1173, 1986.
- ZIMMERMANN, G. Uber die wirkung systemischer fungizide auf verschiedene insektenpathogene fungi imperfecti in vitro. **Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzeschuttdienst**, v.27 p.113-117, 1975.