

EFEITO DE HERBICIDAS UTILIZADOS EM CANA-DE-AÇÚCAR NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN

EDUARDO A. D. DA COSTA *
MARCUS B. MATALLO *
JOSÉ E. M. ALMEIDA **
ELISÂNGELA S. LOUREIRO ***
ALEXANDRE H. SANO ***

Avaliou-se a compatibilidade dos herbicidas butafenacil, metribuzim, s-metolaclo, 2,4-D, glifosato, oxassulfurom e trifloxissulfuron no desenvolvimento do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* (isolado IBCB 348), empregado para controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) conhecida como cigarrinha-da-raiz da cana. Os herbicidas foram adicionados ao meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) em temperatura aproximada de 45°C nas doses de campo mínimas e máximas recomendadas, fixando-se o volume de calda em 200 L/ha. Após a solidificação do meio em placas de Petri, o fungo foi inoculado em três pontos equidistantes. As placas foram incubadas em câmara climatizada avaliando-se o diâmetro médio das colônias formadas, o número de conídios por colônia e a viabilidade dos conídios do fungo após 20 e 48 horas da inoculação. Apenas o herbicida oxassulfurom, na menor dose testada (30 g/ha), foi classificado como tóxico ao *M. anisopliae*, sendo os demais classificados em ambas as doses como muito tóxicos. Quanto à viabilidade, somente os herbicidas oxassulfurom nas doses de 30 e 60 g/ha não afetaram a germinação do fungo até 20 horas após a inoculação e o glifosato a 0,5 e 6,0 L/ha até 48 horas. Os demais herbicidas mostraram-se incompatíveis, afetando o desenvolvimento e a germinação do *M. anisopliae*.

PALAVRAS-CHAVE: HERBICIDAS; CANA-DE-AÇÚCAR; *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN.

* Pesquisador Científico, Doutor em Agronomia, Laboratório das Ciências das Plantas Daninhas, Instituto Biológico, Campinas, SP/Brasil (e-mail: aptaub@pratica.com.br / matallo@biologico.sp.gov.br).

** Pesquisador Científico, Doutor em Agronomia, Laboratório de Controle Biológico, Instituto Biológico, Campinas, SP/Brasil (e-mail: jmalmeida@biologico.sp.gov.br).

*** Engenheiro Agrônomo, Estagiário do Laboratório de Controle Biológico, Instituto Biológico, Campinas, SP/Brasil (e-mail: esloureiro@yahoo.com.br / ahsano@unesp.fcav.unesp.br).

1 INTRODUÇÃO

A mecanização da colheita da cana-de-açúcar tem provocado alterações no comportamento da entomofauna desse agroecossistema. De acordo com MACEDO, CAMPOS e ARAÚJO (1997) tem sido observado aumento significativo na incidência de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae), a cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, com prejuízos de até 60% na produtividade dessas áreas.

O controle da *M. fimbriolata* por agentes biológicos, como os fungos entomopatogênicos, é uma das técnicas adotadas em programas de manejo integrado com o intuito de reduzir o uso de defensivos químicos e aumentar a proteção ao meio ambiente (ALVES et al., 1998). Dentre os agentes microbianos de controle, o fungo *Metarhizium anisopliae* vem sendo extensivamente empregado no controle biológico de *M. fimbriolata* pela alta eficiência e, principalmente, pelo baixo custo de produção e aplicação (COSTA et al., 2002).

A interação entre *M. anisopliae* com inseticidas e adjuvantes pode variar em função da natureza química do produto e sua concentração (BATISTA FILHO, ALMEIDA e LAMAS, 2001; COSTA et al., 2003), resultando em compatibilidade diferenciada de acordo com o produto. Nesse sentido, ALVES, MOINO JR. e ALMEIDA (1998) publicaram diversas tabelas de compatibilidade entre agrotóxicos e fungos entomopatogênicos importantes no controle microbiano de insetos com base em diversos autores. Afirmaram que a maioria das combinações com inseticidas exerce efeito aditivo. Apesar do grande número de agrotóxicos listados não há informações sobre a sua compatibilidade com herbicidas.

A interação entre microrganismos entomopatogênicos e herbicidas foi reportada por ÁVILA e MELHORANÇA (1999). Tais autores avaliaram a eficiência do vírus da poliedrose nuclear, utilizado no controle da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*), quando aplicado em mistura com herbicidas pós-emergentes. Não foi constatada interferência desses produtos na eficácia do vírus.

O uso de herbicidas de diferentes grupos químicos na cultura da cana-de-açúcar constitui prática comum no manejo das plantas daninhas presentes no canavial, tanto em aplicações de pré-emergência como de pós-emergência. Seu emprego em combinação com entomopatógenos exige conhecimento da ação desses produtos sobre os microorganismos para determinar a sua compatibilidade e a viabilidade das estruturas de reprodução. Essa interação deve ser avaliada antes da recomendação de determinado agente químico, desempenhando importante papel em programas de manejo integrado de pragas (BATISTA FILHO, ALMEIDA e LAMAS, 2001).

O objetivo do presente trabalho foi verificar, *in vitro*, a ação tóxica dos herbicidas butafenacil, metribuzim, s-metolaclo, 2,4-D, glifosato, oxassulfurom e trifloxissulfurom sobre o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* de ocorrência natural, ou artificialmente introduzido no agroecossistema da cana-de-açúcar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, Campinas (SP). Utilizou-se o isolado IBCB 348 de *M. anisopliae* originária desse Laboratório.

Estudou-se o efeito dos herbicidas listados na Tabela 1, nas doses mínima e máxima recomendadas pelo fabricante, avaliando-se o crescimento vegetativo e a conidiogênese dos fungos na presença e ausência desses produtos *in vitro*. A adição dos herbicidas ao meio batata dextrose ágar (BDA) foi realizada em concentrações equivalentes a 200 L/ha de calda.

Para avaliar os efeitos dos tratamentos no crescimento vegetativo e na produção de conídios do fungo, os herbicidas foram incorporados em erlenmeyers contendo 200 mL de meio de cultura batata-dextrose ágar (BDA) a temperatura de 45 °C, após a autoclavagem. Com o meio ainda não solidificado, a mistura foi vertida em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Após a solidificação efetuou-se a inoculação do fungo na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL, sendo confeccionadas 3 placas por tratamento. A inoculação foi realizada por meio de alça de platina em três pontos equidistantes entre si, totalizando 9 colônias do fungo. Dessas, 6 colônias foram aleatoriamente apontadas, resultando

assim em 6 repetições por tratamento (ALVES et al., 1998).

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS E DOSES DOS HERBICIDAS UTILIZADOS

TRATAMENTOS	DOSES UTILIZADAS (ha)	
	MÍNIMA	MÁXIMA
Testemunha	---	---
butafenacil	50,0 mL	100,0 mL
2,4-D	1,0 L	2,0 L
glifosato	0,5 L	6,0 L
metribuzim	0,5 kg	0,7 kg
oxassulfuron	30,0 g	60,0 g
s-metolaclo-ro	2,0 L	3,0 L
trifloxissulfuron de sódio	5,0 g	10,0 g

Depois da inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizada a $26\pm1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas durante 12 dias. Utilizou-se régua para medir as colônias em dois sentidos ortogonais e determinar o diâmetro médio. As colônias foram retiradas das placas com bisturi e transferidas para tubos de ensaio, contendo 10 mL de água destilada estéril + espalhante adesivo Tween 80. Realizaram-se as diluições necessárias na suspensão original de cada tratamento e contagem do número de conídios em microscópio óptico, com o auxílio de câmara de Neubauer.

Os dados foram padronizados para o cálculo do fator de compatibilidade (Valor "T") proposto por ALVES, MOINO JR. e ALMEIDA (1998). Esse índice permite a classificação dos herbicidas em classes de compatibilidade conforme o efeito observado em relação aos parâmetros avaliados, sendo calculado pela fórmula:

$$T = \frac{20 (VG) + 80 (SP)}{100}$$

na qual:

T = valor corrigido do crescimento vegetativo e reprodutivo para classificação do produto;

G = porcentagem de crescimento vegetativo com relação à testemunha;

SP = porcentagem de esporulação (conidiogênese) com relação à testemunha.

Os valores calculados de "T" para a classificação do efeito dos herbicidas sobre o fungo foram comparados com os seguintes limites pré-estabelecidos: 0 a 30 = muito tóxico; 31 a 45 = tóxico; 46 a 60 = moderadamente tóxico; > 60 = compatível.

Para avaliar a viabilidade do fungo foi confeccionada calda, contendo 100 mL de água destilada esterilizada adicionada de 0,02 g de fungo, além dos herbicidas nas concentrações máxima e mínima recomendadas (Tabela 1). Após 1 hora retirou-se alíquota de 0,1 mL de cada suspensão, espalhando-a com alça de Drigalsky em 4 placas de Petri contendo uma camada de meio de cultura BDA (consideradas como repetições). As placas foram mantidas em câmara climatizada por 20 e 48 horas a $26\pm1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas. Com o auxílio de microscópio óptico, com aumento de 400 vezes, foi avaliada a germinação dos conídios em 4 campos por placa de Petri, quantificando-se a porcentagem de conídios germinados.

Todos os dados de crescimento vegetativo e produção de conídios foram transformados em $\log x + 10$ e os de porcentagem de germinação dos conídios em $\sqrt{x+0,5}$. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, ao nível de 5% do erro experimental, e ao teste de Tukey ($P<0,05$) para comparação entre as médias (BANZATTO e KRONKA, 1989).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de interferirem na reprodução do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, reduzindo significativamente a produção de conídios (Tabela 2), os herbicidas glifosato na dose de 0,5 L/ha e oxassulfurom a 30 e 60 g/ha não afetaram seu crescimento vegetativo. Essa diferença pode ser atribuída à variabilidade na suscetibilidade tanto do fungo como de seu isolado, conforme relataram ROBERTS e CAMPBELL (1977), citados por BATISTA FILHO, ALMEIDA e LAMAS (2001). Os demais tratamentos afetaram o crescimento vegetativo e reprodutivo do fungo, reduzindo o diâmetro das colônias e a produção de conídios estatisticamente. Butafenacil, 2,4-D, metribuzim e s-metolaclo-ro foram os herbicidas que apresentaram maior redução no diâmetro das colônias (tanto nas doses mínimas como nas máximas), seguidos pelo trifloxissulfurom de sódio a 5,0 e 10,0 g/ha e glifosato a 6,0 L/ha. Observou-se que butafenacil, 2,4-D, glifosato, metribuzim e s-metolaclo-ro ocasionaram a maior redução na produção de conídios, independente da dose, sendo semelhante à de trifloxissulfurom de sódio a 10,0 e 5,0 g/ha e oxassulfurom a 60 e 30 g/ha (Tabela 2).

TABELA 2- DIÂMETRO MÉDIO DE COLÔNIAS (mm) E NÚMERO MÉDIO DE CONÍDIOS PRODUZIDOS POR COLÔNIA DE *Metarhizium anisopliae* NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS HERBICIDAS*

Tratamentos	<i>Metarhizium anisopliae</i>	
	Diâmetro de colônias (mm)	Produção de conídios (10^8 /mL)
Testemunha	1,78a	2,58a
butafenacil (50 mL/ha)	0,71c	0,71d
butafenacil (100 mL/ha)	0,71c	0,71d
2,4-D (1,0 L/ha)	0,71c	0,71d
2,4-D (2,0 L/ha)	0,71c	0,71d
glifosato (0,5 L/ha)	1,79a	0,71d
glifosato (6,0 L/ha)	1,10b	0,71d
metribuzim (0,5 kg/ha)	0,71c	0,71d
metribuzim (0,7 kg/ha)	0,71c	0,71d
oxassulfuron (30 g/ha)	1,85a	1,46b
oxassulfuron (60 g/ha)	1,77a	1,13c
s-metolaclo-ro (2,0 L/ha)	0,71c	0,71d
s-metolaclo-ro (3,0 L/ha)	0,71c	0,71d
trifloxissulfuron de sódio (5 g/ha)	1,13b	1,11c
trifloxissulfuron de sódio (10 g/ha)	1,11b	0,71d
Análise de Variância (resumo)		
F (tratamentos)	41,17 **	90,02 **
DMS	0,37	1,08
CV (%)	16,86	28,5

* dados transformados em $\log x + 10$.
DMS = diferença mínima significativa.

** significativo ao nível de 5% de probabilidade.
CV = coeficiente de variação.

Quando os dados foram submetidos à fórmula para determinação do valor T (Tabela 3) nenhum tratamento mostrou compatibilidade com o fungo *M. anisopliae*. Oxassulfurom a 30,0 g/ha foi o único classificado como tóxico, sendo os demais herbicidas classificados como muito tóxicos (tanto nas doses máximas como nas mínimas). Esses resultados indicam a possibilidade da ocorrência de danos dessa natureza, pois sendo obtidos a partir de estudos *in vitro* com máxima exposição do fungo aos herbicidas podem mascarar a real interação com os fungos entomopatogênicos no solo (ALVES et. al., 1998). Processos de transformação e degradação regulam a biodisponibilidade dos herbicidas, tornando-os mais ou menos propensos a interagir no ambiente edáfico (MATALLO, 1999).

TABELA 3 - VALORES DE “T” E CLASSIFICAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DOS HERBICIDAS EM RELAÇÃO AO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*

Tratamentos	T	Classificação
butafenacil (50 mL/ha)	zero	Muito t xico
butafenacil (100 mL/ha)	zero	Muito t xico
2,4-D (1,0 L/ha)	zero	Muito t xico
2,4-D (2,0 L/ha)	zero	Muito t xico
glifosato (0,5 L/ha)	20,22	Muito t xico
glifosato (6,0 L/ha)	6,74	Muito t xico
metribuzim (0,5 kg/ha)	zero	Muito t xico
metribuzim (0,7 kg/ha)	zero	Muito t xico
oxassulfuron (30 g/ha)	43,68	T xico
oxassulfuron (60 g/ha)	29,91	Muito t xico
s-metolaclo-ro (2,0 L/ha)	zero	Muito t xico
s-metolaclo-ro (3,0 L/ha)	zero	Muito t xico
trifloxissulfuron de s dí-o (5 g/ha)	23,95	Muito t xico
trifloxissulfuron de s dí-o (10 g/ha)	13,33	Muito t xico

T = Fator de compatibilidade.

Quanto à viabilidade dos conídios do fungo (Tabela 4), os herbicidas butafenacil, 2,4-D, metribuzim e s-metolaclo-ro foram os que mais afetaram a sobrevivência do *M. anisopliae*. Reduziram significativamente a porcentagem de germinação, tanto na leitura realizada 20 horas após incubação como na de 48 horas, independentemente da dose. Embora menores, reduções significativas na porcentagem de germinação dos conídios também foram verificadas para o trifloxissulfurom de sódio a 5 e 10 g/ha em ambos períodos de leitura.

TABELA 4 - GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DO FUNGO *Metarhizium anisopliae**

Tratamentos	Viabilidade	
	20 horas	48 horas
testemunha	9,92 a ¹	10,03 a
butafenacil (50 mL/ha)	0,71 d	0,71 d
butafenacil (100 mL/ha)	0,71 d	0,71 d
2,4-D (1,0 L/ha)	0,71 d	0,71 d
2,4-D (2,0 L/ha)	0,71 d	0,71 d
glifosato (0,5 L/ha)	6,15 b	9,90 a
glifosato (6,0 L/ha)	6,59 b	10,03 a
metribuzim (0,5 kg/ha)	0,71 d	0,71 d
metribuzim (0,7 kg/ha)	0,71 d	0,71 d
oxassulfuron (30 g/ha)	9,68 a	10,03 a
oxassulfuron (60 g/ha)	9,64 a	9,96 a
s-metolaclo-ro (2,0 L/ha)	0,71 d	0,71 d
s-metolaclo-ro (3,0 L/ha)	0,71 d	0,71 d
trifloxissulfuron de s dí-o (5 g/ha)	4,35 c	4,74 b
trifloxissulfuron de s dí-o (10 g/ha)	1,59 d	1,98 c
Análise de Variância (resumo)		
F (tratamentos)	286,00 **	346,69 **
DMS	1,08	1,14
CV (%)	30,69	27,83

* Dados de porcentagem transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

DMS = Diferença mínima significativa.

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

CV = Coeficiente de variação.

Ao contrário do observado para ambas as doses do oxassulfurom na leitura realizada 20h após incubação, o glifosato não afetou a porcentagem de germinação dos conídios de *M. anisopliae* na segunda leitura (48 h), embora tenha reduzido de forma expressiva sua viabilidade. O mesmo fato ocorreu com o oxassulfurom a 30 e 60 g/ha.

Apesar de serem incompatíveis com o crescimento e a reprodução de *M. anisopliae*, glifosato e oxassulfurom não afetaram a viabilidade de seus conídios. A incongruência entre esses parâmetros deve-se ao fato de que somente o crescimento vegetativo e a esporulação do fungo são incluídos na fórmula para o cálculo do fator T. De acordo com BATISTA FILHO, LAMEIDA e LAMAS (2003), outros parâmetros como a viabilidade e a virulência do entomopatógeno deveriam ser considerados no estabelecimento da compatibilidade.

4 CONCLUSÃO

Os herbicidas butafenacil, 2,4-D, metribuzim, s-metolachloro e trifloxissulfurom de sódio reduziram significativamente tanto o crescimento vegetativo como a reprodução do fungo, mostrando-se inviáveis para a sobrevivência do *M. anisopliae*.

Os herbicidas glifosato na dose de 0,5 L/ha e oxassulfurom a 30 e 60 g/ha não afetaram o crescimento vegetativo de *M. anisopliae*.

Todos os tratamentos foram classificados como tóxicos ou muito tóxicos ao fungo, apesar do glifosato e do oxassulfurom não afetarem a viabilidade dos conídios.

ABSTRACT

EFFECT OF HERBICIDES UTILIZED IN SUGAR CANE OF "IN VITRO" DEVELOPMENT OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN

The compatibility of the herbicides butafenacil, metribuzin, s-metolachlor, 2,4-D, glyphosate, oxasulfuron and trifloxysulfuron in the development of entomopathogenic fungi *M. anisopliae* (isolate IBCB 348) were evaluated, which is employed in the biological control of *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). The herbicides were added to the culture media potato dextrose agar (PDA) in temperature of approximately 45° C in minimal and maximal recommended field doses, fixing the volume of 200 L/ha. After the solidification of the culture media in Petri dishes, the fungi was inoculated in three equidistant points. The plates were incubated in climatized chamber and the average diameter of the formed colonies were evaluated, the number of conidia per colony and the viability of the conidia after 20 and 48 hours inoculation. Only the herbicide oxasulfuron, in the lowest tested dose (30 g/ha) was classified as toxic to *M. anisopliae*, being the rest classified in both doses as highly toxic. For viability only the herbicides oxasulfuron in the doses of 30 and 60 g/ha didn't affect the germination of the fungi until 20 hours after inoculation and glyphosate at 0.5 and 6.0 L/ha until 48 hours. The other herbicides were incompatible, affecting the development and the germination of *M. anisopliae*.

KEY-WORDS: HERBICIDES; SUGAR CANE; *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN.

REFERÊNCIAS

- 1 ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C.; LEATHER, S.R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. **Crop Protection**, v. 17, n. 8, p. 675-679, 1998.
- 2 ALVES, S.B.; MOINO JR., A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.8, p.217-238.
- 3 ÁVILA, J. C.; MELHORANÇA, A. L. Eficiência do vírus de poliedrose nuclear em mistura com herbicidas pós-emergentes no controle de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 28, n. 2, p. 339-341, 1999.
- 4 BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 247 p.
- 5 BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 437-447, 2001.
- 6 COSTA, E.A.D.; ALMEIDA, J.E.M.; LOUREIRO, E.S.; SANO, A.H. Avaliação da compatibilidade dos adjuvantes AG 6202 E AGRHO™ DEP-775 no desenvolvimento "in vitro" dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 8., Recife. **Anais...** Recife: STAB Setentrional, 2002. p. 67-72.
- 7 MACEDO, N.; CAMPOS, M.B.S.; ARAÚJO, J.R. Insetos nas raízes e colo da planta, perfilhamento e produtividade em canaviais colhidos com e sem queima. **STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v. 15, n. 3, p. 18-21, 1997.
- 8 MATALLO, M. B. La relación suelo - herbicida: descomposición, residuos, contaminación y manejo. In: CONGRESO DE LA ASOCIACION LATINOAMERICANA DE MALEZAS, 15., 1999, Cartagena de Indias, Colombia. **Memórias...** Cartagena de Indias: [s.n.], 1999. p. 3-8.