



ENSAIO DE COMPATIBILIDADE DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGENICOS A FUNGICIDAS

VENANCIO, A. A. REGIS¹

DALBEM, A. EDJAIR²

SOUZA, A. K. JENNIFER³

¹ Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva -FAIT

²Doutor em Sistema de Produção – UNESP

³ Eng. Agrônoma, Mestranda em Proteção de Plantas – UNESP

RESUMO

As doenças são a principais causadoras de danos à agricultura. Visando o controle destas doenças muitos agricultores acabam por fazer misturas em tanque, pratica esta, que possui riscos ao agricultor e ao meio ambiente quando feitas de maneira inadequada. Pesquisas recentes mostram um agente de controle biológico em potencial com capacidade de suportar mistura em tanque com produtos químicos, estes agentes são denominados nematóides entomopatogênicos. A partir destas informações este trabalho tem o objetivo de avaliar a compatibilidade do nematoide *Heterorhabditis bacteriophora* exposto a fungicidas. Os testes foram feitos utilizando um fungicida sistêmico do grupo picoxistrobina e ciproconazole, e outro mesostemico e sistêmico do grupo estrobilurinas e triazolinthione. Com 5 repetições em tubos de ensaio e cerca de 2.500 juvenis infectantes, colocados em câmaras climatizadas, para avaliação da mortalidade dos nematóides quando expostos aos produtos. Os resultados se mostram positivos para o uso desses fungicidas juntamente ao emprego de nematóides entomopatogênicos em tanque, se mostrando inofensivos ao nematoide nas primeiras 24 horas de exposição ao produto.

Palavras Chave: Fungicida, *Heterorhabditis bacteriophora*, NEPS.

ABSTRACT

Diseases are the main cause of damage to agriculture, aiming to control these diseases many farmers end up making tank mixes, practice this, which poses risks to the farmer and the environment when done improperly. Recent research shows a potential biological control agent with the ability to withstand tank mixing with chemicals, these agents are called entomopathogenic nematodes. From this information this work has the objective of evaluating the compatibility of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* exposed to fungicides. The tests were performed using a systemic fungicide of the picoxystrobin and ciproconazole group, and another mesostemic and systemic fungicide of the strobilurin and triazolinthione group. With 5 replicates in test tubes and about 2.500 infective juveniles, placed in air-conditioned chambers, to evaluate the mortality of nematodes when exposed to the products. The results are positive for the use of these fungicides together with the use of entomopathogenic nematodes in the tank, if they are harmless to the nematode within the first 24 hours of exposure to the product.

Key Words: Fungicide, *Heterorhabditis bacteriophora*, NEPS.

1 – INTRODUÇÃO



Dentre os principais fatores de perdas agrícolas encontram-se os fungos. Estes apresentam maiores taxas de perdas devido a sua facilidade de disseminação. Os fungicidas são empregados na agricultura visando a proteção das plantas cultivadas, inibindo ou matando o fungo causador da doença, porém nem todos os fungos podem ser controlados de uma única vez por estes produtos, devido à presença de vetores no local, favorecendo a volta do patógeno. Em sua maioria estes vetores são insetos, sendo necessário também os controlar (McGRATH, 2012).

Visando o controle de doenças fúngicas, muitos agricultores acabam por fazer misturas em tanque, muitas vezes indevidas e sem conhecimento dos grupos químicos, sendo frequentemente utilizados a mistura entre fungicidas e inseticidas, sem o conhecimento dos riscos que rodeiam estas práticas, como: o incentivo a resistência dos alvos, a inibição de moléculas ou ativação de reações químicas inesperadas (GAZZIEIRO, 2015).

Ainda segundo o autor além dos possíveis perigos citados, existe a questão ambiental, em que quando feito a mistura, são colocados no meio ambiente mais resíduos de produtos químicos, contaminadores de leitos de rios, lençóis freáticos, solo, etc., tornando a busca por meios alternativos necessária. Um dos meios seria a utilização do controle biológico. Porém os agentes são específicos para cada espécie, se tornando dificultosa a sua utilização, além da incompatibilidade de mistura aos produtos sintéticos.

Entretanto, pesquisas recentes mostram um agente de controle biológico em potencial capaz de parasitar artrópodes, e com capacidade de suportar mistura em tanque com produtos químicos. São os chamados nematoides entomopatogênicos. Estes seres são vermes parasitas obrigatórios de insetos que agem causando sua morte de 24 a 48 horas através da proliferação de suas bactérias simbiotes do gênero *Photorhabdus* e podem ser aplicadas via pulverização (VOSS, 2009).

Com base nestas informações este trabalho tem o objetivo de avaliar a compatibilidade do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* com dois fungicidas mais utilizados por agricultores da mesorregião de Itapetininga, formada pelas microrregiões de: Itapeva, Itapetininga, Tatuí e Capão Bonito, visando a diminuição do risco causados pela mistura de fitossanitários em tanque, e maior



controle de pragas e doenças de maneira sustentável, além da demonstração do possível uso deste nematoide no controle de inseto pragas, através da avaliação da mortalidade dos Juvenis Infectantes e a manutenção da capacidade infectiva.

2 – PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Este trabalho foi realizado em laboratório da Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva (FAIT), localizada na cidade de Itapeva – SP, em latitude 23°58'56" sul e na longitude 48°52'32" oeste, à uma altitude de 726 metros. De acordo com a classificação internacional de Koppen, o clima da região é do tipo Cfa – Clima temperado úmido com verões quentes. A precipitação média anual é de 1,400mm, sendo o verão a estação mais chuvosa, tendo em torno de 510mm ao ano, a temperatura média anual é de 22°C, e umidade relativa média de 76% (INMET, 2015).

Para a determinação da compatibilidade usou-se a metodologia descrita por VOSS (2009), sugerida por NEGRISOLI JUNIOR *et al.* (2008), baseado na metodologia de VAINIO (1992). Em que é preparado um litro de calda de cada produto com o dobro da concentração desejada, neste caso para a cultura anual soja (*Glycine max*). Desta solução são retiradas alíquotas de 1 mL de cada produto e colocados em cinco tubos de ensaio para cada teste, aos quais são adicionados 2.500 Juvenis Infectantes, contados a partir da câmara de Peters em microscópio estereoscópico, adicionados em 1 mL de água destilada e agitados, no total foram feitas 10 repetições sendo 5 para cada produto e 2 testemunhas sem a adição do fungicida, apenas água destilada. Este bioensaio foi conduzido em câmara climatizada a $22 \pm 1^\circ\text{C}$; UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Para estes testes foram escolhidos dois produtos, sendo um pertencente ao grupo químico estrobilurina e triazolinthione que possui como ingrediente ativo trifloxistrobina e protioconazol, atuando de modo mesostemico e sistêmico; e o um segundo produto do grupo químico estrobilurina e triazol com os ingredientes ativos picoxistrobina e ciproconazol, atuando de modo sistêmico; e uma testemunha utilizando água destilada. A dosagem da calda foi feita referente a recomendações do produto para a cultura da soja (*Glycine max*). É utilizado então um litro de calda de cada produto, preparado com o dobro da concentração desejada, neste caso utilizou-se a concentração



de 800 mL /ha do produto trifloxistrobina e protioconazol e 600 ml/ha de picoxistrobina e ciproconazol conforme apresentado na tab.1.

Tabela 1: Fungicidas utilizados sobre *Heterorhabditis bacteriophora* visando a verificação de compatibilidade

Nome técnico	Comercial	Formulação	Grupo químico	Classe toxicológica	Concentração recomendada	Dosagem utilizada
Trifloxistrobina e protioconazol	FOX - Bayer S.A.	SC	Estrobilurina e triazolintione	I - Extremamente tóxico	400 mL /ha	800 mL /ha
Picoxistrobina e ciproconazol	APROACH PRIMA - Du Pont do Brasil S. A.	SC	Estrobilurina e triazol	II - Medianamente tóxico	300 mL /ha	600 mL /ha

A mortalidade dos nematoides foi avaliada 48 horas após a exposição aos produtos. A partir de alíquota retiradas da suspensão, onde observou-se 100 JIs em microscópio estereoscópico, considerando mortos aqueles que não se movimentavam e não apresentavam resposta a toque, agitação ou estímulo químico com o uso de Oxamil 30 mg/L.

Após a visualização e contagem dos juvenis vivos adicionou-se 3 mL de água destilada e deixou-se descansar por meia hora em câmara climatizada a 12 ± 1 °C. O sobrenadante é descartado e feita a lavagem com o auxílio da peneira de mesh 500 repetida em três vezes. Após a última lavagem 0,2 mL (100 JIs) são retiradas do fundo dos tubos e pipetadas em placas de Petri com papel filtro umedecido com 1,8 ml de água destilada para cada tratamento.

Para a verificação da virulência após a exposição aos produtos foram retiradas (e lavadas como descrito anteriormente) alíquotas após 24 horas e 48 horas, determinando assim, se haveria diferenciação da infecção dos nematoides nos diferentes tempos em cada produto, calculando a porcentagem da capacidade infectiva do nematoide.

Em cada placa adicionou-se 10 larvas de *Tenebrio molitor* que foram levadas a câmara climatizada nas mesmas condições do teste por cinco dias, com a finalidade de obtenção de duas saídas dos juvenis. As larvas mortas foram transferidas para placa de Petri com folha de papel filtro seca e mantidas no escuro em câmara B.O.D a 25 ± 2 °C por três dias. Após este período foram submetidas separadas por repetições a decomposição dos tecidos a partir de solução de pepsina a 8% em agitador a 120 rpm



por 1 hora e 20 min (até que se tenha decomposto todo o tecido do inseto) a 37 °C, para a verificação da presença e contagem do número de Juvenis Infectantes presentes em 1 mL da solução.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de comparação entre as médias dos tratamentos Scott Knott ($P \leq 0,05$) através do programa Sisvar (FERREIRA, 2000). Para a verificação do efeito sobre a infectividade dos nematoides foi realizado o cálculo através da formula sugerido por PETERS e POULIOT (2004) baseado no protocolo da Organização Internacional para o Controle Biológico e Integrado de Animais e Plantas Nocivas – IOBC, onde, com base no valor obtido em E% (efeito sobre a infectividade), podemos classificar os produtos como: Inócuo (<30%), levemente nocivo (30% a 79%), moderadamente nocivo (80% a 99%) e nocivo (>99%).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os testes de compatibilidade neste trabalho realizados demonstraram que os nematoides expostos por 48 horas ao produto trifloxistrobina e protioconazol, sofreram significativa redução de juvenis, assim como a interferência no processo de parasitismo das larvas.

Entretanto não se recomenda o armazenamento da calda em tanque após 24 horas devido a redução de seus efeitos esperados, assim como a decomposição e / ou degradação das moléculas, além da acumulação do produto no fundo do tanque, que mesmo com a agitação pode ficar aderido no fundo do tanque de pulverização colaborando com a sua menor eficiência durante a aplicação (ANDREI, 2013).

De acordo com os dados, o produto trifloxistrobina e protioconazol, apresenta maior número de juvenis infectivos vivos de nematóides entomopatogênicos em exposição ao produto por até 24 horas, porém há um aumento na taxa de mortalidade da espécie com redução de 48,2 nematoides quando sujeito ao produto por 48 horas. Em contrapartida o produto picoxistrobina e ciproconazol que apresentou menor número de indivíduos vivos nas primeiras 24 horas teve a menor perca durante as horas seguidas, demonstrando assim resultados melhores que o produto anteriormente mencionados quando avaliado após as 48 horas de exposição conforme demonstrado na tabela 2.



Tabela 2: Resultados dos testes de compatibilidade de *Heterorhabditis bacteriophora* com fungicidas

Tratamentos	Mortalidade dos JIs ¹		Capacidade Infectiva ²		Nº de JIs / 1 mL ³	
	Exposição 24h	Exposição 48h	Exposição 24h	Exposição 48h	Exposição 24h	Exposição 48h
Trifloxistrobina e protioconazol	16,8 Ba ⁴	65 Bb	56 Ab	0 Aa	94.6 Ab	0 Aa
Picoxistrobina e ciproconazol	28,4 Ca	58,8 Ab	100 Bb	84 Ba	280.4 Bb	267.6 Ba
Testemunha	0 Aa	0 Aa	100 Ba	100 Ca	362 Ca	366.5 Ca
CV (%)	3.18	5.1	7.3	7.07	2.09	2.78
Média Geral	81.17	48.41	8.17	5.17	216.58	172.58
Erro padrão	1.41	1.35	0.33	0.2	2.47	2.63

¹ Refere-se a % de juvenis mortos (alíquotas contendo 100 JIs)

² Refere-se a % de larvas mortas

³ Refere-se ao nº de JIs encontrados em alíquotas de 1 mL da solução de pepsina 8%

⁴ Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha são iguais pelo teste de Scott Knott (P>0,05)

Em relação a infectividade dos hospedeiros no teste com o produto trifloxistrobina e protioconazol as larvas não foram infectadas após exposição de 48 horas ao produto, interferindo no parasitismo dos nematoides, estes apresentaram infecção das larvas apenas nas primeiras 24 horas de exposição. No teste com picoxistrobina e ciproconazol as larvas de *T. molitor* foram parasitadas por *H. bacteriophora* com eficiência na mortalidade dos insetos demonstrando variação insignificante estatisticamente entre os períodos avaliado. Portanto o fungicida não interfere no processo de infecção, ocorrendo normalmente todos os processos de parasitismo e a apresentação dos sintomas característicos mesmo sujeito ao produto por 48 horas. O efeito dos produtos sobre a infectividade dos NEPS sobre as larvas está apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Efeito dos produtos fitossanitários na infectividade dos NEPS sobre larvas de *T. molitor*

Produto	Exposição 24h	Exposição 48h
Trifloxistrobina e protioconazol	53% ²	100% ³
Picoxistrobina e ciproconazol	0 ¹	30% ²

¹ inócuo (<30%)

² Levemente nocivo (30% a 79%)

³ Nocivo (>99%)



Ao avaliar o número de juvenis encontrados nos tratamentos após a infecção, tem-se uma confirmação a respeito do efeito da infectividade dos nematoides sobre as larvas. Conforme demonstrado na tabela 2 apesar de o produto trifloxistrobina e protioconazol apresentar a menor mortalidade durante 24 horas, ao realizar a inoculação com o produto encontrou-se a média entre as repetições de 94,6 JIs em 1 mL coletadas para contagem em câmara de Peters, e após 48 horas nenhuma larva foi parasitada, não havendo, portanto, nenhum JIs neste período.

Em contrapartida o produto picoxistrobina e ciproconazol apesar de sofrer uma queda da população no período inicial apresentou 286,4 JIs de média em 1 mL. Observou-se que assim como descrito por Voss (2009), os nematóides entomopatogênico possuem a capacidade de tolerar mistura com produtos fitossanitários.

O tempo de exposição dos NEPS a estes produtos pode variar, assim como GONZÁLEZ (2006), que em seu trabalho concluiu que os nematoides de gênero *Heterorhabditis*, não devem ser misturados ao óleo mineral do grupo químico dos hidrocarbonetos alifáticos (adjuvante) nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%, por mais de três horas, pois o produto afeta o parasitismo e busca dos insetos no solo. Outros trabalhos sobre a compatibilidade de NEPS com a utilização de produtos fitossanitários foram realizados também por NEGRISOLI et al (2008) onde acompanhou a mortalidade das espécies de nematoides entomopatogênico de *Steinernema* e *Heterorhabditis* com a utilização de glifosato 480 SL na concentração de 6 litros/hectare, no qual não foram observadas perdas na infectividade dos juvenis e não houve redução da população, mostrando ser possível a combinação de NEPS para controle de pragas junto ao controle de plantas daninhas com o produto. Outras moléculas como pentacloronitrobenzeno, benomil, clorotalonil e dicamba não reduziram a viabilidade dos NEPS de ambos os gêneros mesmo após 48 horas de exposição ao produto (ZIMMERMAN e CRASHAW, 1990).

Em trabalho realizado por Negrisoli et al. (2008) os produtos fitossanitários tiofanato metílico e aldicarbe se mostraram incompatíveis com *S. carpocapsae*, provocando a redução da viabilidade e infecção da espécie. Já os produtos tiametoxam, tiofanato metílico, aldicarbe e carbofuran se mostram incompatíveis com *H.bacteriophora*, e tiametoxam e imidacloprido reduzem a viabilidade de *S.*



carpocapsae. O produto clorpirifós reduz a infectividade e simazina + ametrina reduz a viabilidade de *H. bacteriophora*.

4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Recomenda-se que sejam realizados testes avaliando o produto trifloxistrobina e protioconazol em períodos menores de exposição visto a recomendação de não armazenar a calda por mais de 24 horas.

Conforme obtido neste trabalho o fungicida picoxistrobina e ciproconazol se apresenta inofensivo ao nematoide durante as primeiras 24 horas de exposição, e levemente nocivo após as 48 horas do experimento, porém não interfere no processo de infecção das larvas, procura do hospedeiro ou na reprodução dos nematoides.

O fungicida trifloxistrobina e protioconazol afeta o parasitismo dos nematóides expostos ao produto por mais de 24 horas, bem como sua reprodução.

5 – REFERÊNCIAS

- ANDREI, E. Compendio de defensivos agrícolas. São Paulo – SP, 9º ed. 2013
- FERREIRA DF . Análise estatística por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p. 255-258. (2000)
- GAZZIERO, D. L. P., Misturas de Agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. Embrapa Soja, Londrina – PR, Revista Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 33, n. 1, p. 83-92, 2015.
- GONZÁLEZ, J. C. L., Avaliação de aspectos biológicos de *Heterorhabditis baujardi* lpp7 (Nematoda: Heterorhabditidae) visando a aplicação num sistema de irrigação por micro aspersão, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ, 2006.
- INMET, Instituto Nacional de Meteorologia, 2015. Disponível em <http://www.inmet.gov.br/portal/>, acessado em: 10 de setembro de 2018
- McGRATH, M. T., O que são fungicidas? The Plant Health Instructor.



2012 Trans. Piérri Spolti, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Disponível em: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/fungicidasPort.aspx>. Acessado em: 16 de setembro de 2018.

NEGRISOLI-JR, A.S., BARBOSA, C.R.C. AND MOINO JR, A. Comparação entre metodologias de avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida). *Nematologia Brasileira Piracicaba*. 32: 65-75. 2008

NEGRISOLI-JR, A.S., BARBOSA, C.R.C. AND MOINO JR, A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernelemae, Heterorhabditis) Utilizando o protocolo modificado da IOBC/WPRS. *Nematologia Brasileira, Piracicaba – SP*, vol. 32. P. 111 – 116. 2008.

PETERS, A.; POUULOT, D. Side effects of surfactants and pesticides on entomopathogenic nematodes assessed using advanced IOBC guidelines. *IOBC/WPRS Bulletin, Montfavet*, v. 27, n. 6, p. 67-72, 2004.

VAINIO, A. Guideline for laboratory testing of the side-effects of pesticides on entomophagous nematodes *Steinernema* spp. *IOBC/WPRS Bulletin, Montfavet*, v. 15, p. 145-147, 1992.

VOSS M., Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos. Embrapa Trigo, Passo Fundo – RS, dezembro de 2009.

ZIMMERMAN, R.J. and CRANSHAW, W.S. Compatibility of entomogenous nematodes (Rhabditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. *J. Econom. Entomol.* 83, 97-100. 1990