

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto de productos fitosanitarios sobre parámetros biológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae)

Ana Paula Mamprim, Luis Francisco Angeli Alves*, Fabiana Gisele da Silva Pinto, Marina Andressa Formentini, Claudécir Castilho Martins, Rafaela Barbosa Pares

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Laboratório de Biotecnologia Agrícola, Rua Universitária, 2069, 85819-110, Cascavel, PR, Brasil.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue determinar la interacción y los efectos de los productos fitosanitarios comerciales en la concentración recomendada (CR), a la mitad (0,5CR) y el doble de la misma (2CR), y extractos acuosos y alcohólicos vegetales (*Rosmarinus officinalis* L. - romero, *Cymbopogon citratus* Stapf - zacate de limón, caña santa, *C. winterianus* Jowitt - citronella, *Laurus nobilis* L. - laurel, *Azadirachta indica* A. Juss - nim, *Ricinus communis* L. - ricino, higuera, *Melia azedarach* L. - melia, paraíso, *Corymbia citriodora* Hook. - eucalipto, *Ruta graveolens* L. - ruda, *Curcuma longa* L. - cúrcuma, *Cinnamomum zeylanicum* Blume - canela) y basidiocarpos del hongo *Pycnoporus sanguineus* (oreja de palo) (L.) Merrill, todos en la concentración 10%, sobre el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. En todos los tratamientos se realizaron pulverizaciones sobre el hongo inoculado previamente en medio de cultivo (BDA). Se evaluaron los parámetros germinación, UFC, crecimiento vegetativo y producción de los conidios. Los productos fitosanitarios comerciales, a pesar de que algunos parámetros fueron afectados se mostraron compatibles con el hongo, así como los extractos acuosos y alcohólicos. Sin embargo, se debe evitar el uso conjunto o aplicaciones subsecuentes de los productos aquí evaluados en menos de 48 horas después de la aplicación del hongo.

Palabras clave: hongos entomopatógenos, compatibilidad, extractos vegetales, productos fitosanitarios.

Effect of phytosanitary products on biological parameters of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae)

ABSTRACT: This study was aimed at evaluating the effect of different commercial pesticides, the aqueous and alcoholic extracts of several plants, and basidiocarps of *Pycnoporus sanguineus* L. on *Beauveria bassiana* Bals. Vuill. The commercial pesticides studied were Agro-mós, Agro-fos, Bion, Biogermex, Citronella oil, Forth, Pironim, Bordeaux mixture, Planta Clean, and Sulphur-lime mixture, at the concentration recommended in the product labels (RC), the half of this concentration (1/2 CR), and the two-fold concentration (2 CR). The plant extracts were from *Rosmarinus officinalis* L., *Cymbopogon citratus* Stapf, *C. winterianus* Jowitt, *Laurus nobilis* L., *Azadirachta indica* A. Juss, *Ricinus communis* L., *Melia azedarach* L., *Corymbia citriodora* Hook, *Ruta graveolens* L., *Curcuma longa* L., *Cinnamomum zeylanicum* Blume) All the extracts and the basidiocarps of *P. sanguineus* were used at a 10% concentration. All the products were sprayed over *B. bassiana* previously inoculated to the culture medium (BDA). The parameters evaluated were germination, CFU, vegetative growth, and conidia production. Despite the deleterious effect of the commercial phytosanitary products on some of the parameters, they were compatible with *B. bassiana*, the same as the plant extracts were. However, the combined use or subsequent applications of the products here tested must be avoided before the 48 hours of *B. bassiana* application.

Key words: entomopathogenic fungi, compatibility, plant extracts, phytosanitary products.

*Autor para correspondência: Luis Francisco Angeli Alves.
Correo electrónico: luis.alves@unioeste.br

INTRODUCCIÓN

El uso intensivo e indiscriminado de productos fitosanitarios sintéticos causó diversos problemas ambientales, como la contaminación de aguas, suelo, animales y alimentos, intoxicación de agricultores, así como la eliminación de organismos beneficiosos, y el surgimiento de plagas y malezas resistentes a ciertos principios activos (1).

Con el fin de minimizar esos efectos negativos, y aumentar la producción de alimentos de mejor calidad, se desarrollaron investigaciones con diversos productos fitosanitarios (PF), evidenciando que representan un medio más seguro y viable para la producción agrícola, pues son más selectivos a los enemigos naturales (2, 3). De igual modo, se utilizan inductores de resistencia (4) y extractos vegetales que poseen acción insecticida, antimicrobiana y de repelencia (5). Productos que se emplean en programas de manejo integrado de plagas, junto a hongos entomopatógenos, organismos ampliamente utilizados en el control biológico en varios cultivos de importancia agrícola (6).

El éxito de los hongos entomopatógenos en el manejo control de plagas depende de la supervivencia de los conidios en el contexto donde son aplicados, la cual puede ser afectada directamente por factores ambientales (7, 8) y productos fitosanitarios (PF), incluidos los productos naturales utilizados. En ese sentido, Neves *et al.* (9) y Alves *et al.* (10) resaltaron la importancia de evaluar el efecto de los PF sobre la germinación de agentes de control biológico de origen fungoso a través de estudios de compatibilidad, pues la inhibición de germinación compromete la eficacia del agente patógeno.

Se sabe que algunos extractos vegetales influyen en parámetros como el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación de hongos entomopatógenos, aunque de manera general, se produce compatibilidad entre los agentes en estudio (11, 12, 13).

A pesar de la importancia de estudios *in vitro* que evalúan la interacción de PF sobre los hongos entomopatógenos, resulta escasa aún la información publicada y disponible que contribuya a la definición de estrategias adecuadas para la utilización de tales agentes de control, principalmente en los sistemas agroecológicos de producción, con el fin de producir garantizando la conservación de los recursos naturales (14). El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de productos fitosanitarios y extractos vegetales sobre parámetros biológicos del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de productos y extractos

Se evaluaron los productos comerciales Agro-mos (200ml/100L H₂O), Agro-fos (200ml/100L H₂O), Bion (80g/100L H₂O), Biogermex (200ml/100L H₂O), aceite de citronela (1L/100L H₂O), Forth (3ml/1L H₂O), Pironim (600ml/100L H₂O), Caldo Bordolés (1Kg CuSO₄ + 1Kg Ca(OH)₂/10L H₂O), Planta Clean (25ml/1L H₂O) y Caldo Sulfocálcico (5kg S + 2,5kg de Ca(OH)₂/10L H₂O), en las concentraciones establecidas en los rótulos de los productos (CR), a la mitad (1/2 CR) y en el doble de la misma (2 CR).

Fueron también evaluados extractos acuosos y alcohólicos de las plantas: *Rosmarinus officinalis* L. (rosmarino, romero), *Cymbopogon citratus* Stapf (zacate de limón, caña santa), *C. winterianus* Jowitt (citronela, citronella), *Laurus nobilis* L. (laurel), *Azadirachta indica* A. Juss (nim), *Ricinus communis* L. (ricino, higuera), *Melia azedarach* L. (melia, paraíso), *Corymbia citriodora* Hook. (Eucalipto), *Ruta graveolens* L. (ruda), *Curcuma longa* L. (cúrcuma), *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) y basidiocarpos del hongo *Pycnoporus sanguineus* (oreja de palo) (L.) Murrill, evaluados en la concentración de 10%. Una muestra de cada planta fue enviada al Herbario de la Universidade Estadual do Oeste do Paraná, para la identificación botánica y el registro del ejemplar *voucher*.

Las plantas fueron colectadas en la región Oeste de Paraná, en horario matutino, se colocaron en estufa de secado (40°C) durante un periodo de 3-6 días. El material seco fue fraccionado en molino de cuchilla y los polvos obtenidos (granulometría de 0,42mm) se almacenaron en recipientes de cristal herméticamente cerrados a temperatura ambiente y al resguardo de la luz.

Los extractos alcohólicos se obtuvieron a partir de agregar 50 g polvo (de cada planta) a 500 ml de alcohol etílico P.A. Después de 10 días, se filtraron con papel de filtro estéril, y la fase acuosa obtenida fue transferida a un balón de destilación de cristal previamente pesado, para su posterior rota evaporación. Enseguida, el balón fue pesado nuevamente, y se adicionó agua destilada en la proporción del peso del residuo para obtener una concentración del 10%. El líquido fue filtrado en membrana de porosidad de 0,45mm para esterilización y almacenado a -10°C.

Los extractos acuosos se obtuvieron a partir de añadir 10 g de polvo en 100 ml de agua destilada estéril, permaneciendo 48h a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. Posteriormente se filtraron a través de gasa de algodón y papel de filtro estériles y se conservaron a -10°C.

Para la preparación del extracto de *P. sanguineus* se utilizó la metodología desarrollada por Viecelli *et al.* (15), en la cual 1g de polvo fue adicionó a 14ml de agua destilada estéril y fue mantenido en heladera por 24h. Posteriormente se filtró y estelizó como fue descrito anteriormente.

Se utilizó el aislamiento Unioeste 4 de *B. bassiana*, obtenido de la colección del Laboratorio de Biotecnología Agrícola/Unioeste, multiplicado en medio de esporulación (2), a fin de preparar las suspensiones utilizadas en los experimentos.

Para la evaluación del efecto de los productos sobre los parámetros biológicos del hongo, se utilizó la metodología desarrollada por Silva *et al.* (16), que ofrece la posibilidad de simular lo que debe ocurrir en el campo.

a) Germinación de los conidios: Fueron distribuidos homogéneamente con asa de Drigalsky 100µl de la suspensión fúngica ($1,6 \times 10^6$ conidios/ml) en la superficie del medio de cultivo Batata-Dextrosa-Agar (BDA). A continuación se pulverizaron 250µl de cada tratamiento/placa con micropulverizador acoplado a un compresor de aire (12lb de presión constante). Las placas se incubaron a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y 12h de fotoperíodo por 16h. Después se realizó la cuantificación en microscopio óptico, el total fue considerado como 100% y proporcionalmente se determinó el porcentaje de germinación y no germinación de los conidios.

b) Crecimiento vegetativo y producción de conidios: Propágulos del hongo se inocularon en 3 puntos en la superficie del medio BDA en placas Petri, utilizando asa de platino. Las placas se incubaron durante 48 horas como se describió anteriormente. A continuación, las placas se pulverizaron con los productos y nuevamente se incubaron 5 días más.

La evaluación consistió en la medición perpendicular del diámetro de dos colonias/placa. Posteriormente las colonias se recortaron y transfirieron individualmente a tubos de vidrio, donde se prepararon suspensiones. El número de conidios se contabilizó en cámara de Neubauer, observada en microscopio óptico.

Los datos obtenidos en las evaluaciones de estos parámetros se analizaron de acuerdo al cálculo de toxicidad para tests *in vitro* propuesto por Rossi-Zalaf *et al.* (17), siendo $IB = 47[CV] + 43[ESP] + 10[GERM]/100$, donde IB = Índice Biológico, CV = crecimiento vegetativo, ESP = esporulación y GERM = germinación. Los valores del IB para la clasificación de los productos son: Tóxico: 0-41; Moderadamente Tóxico: 42-66 y Compatible > 66.

c) Unidades Formadoras de Colonia (UFC): Fueron distribuidos 100µl de la suspensión del hongo con asa de Drigalsky (1×10^3 conidios/ml) en la superficie del medio BDA y posteriormente se pulverizaron los productos, como fue descrito anteriormente. Las placas se incubaron durante 3 días en las condiciones antes mencionadas y a continuación se cuantificaron las colonias formadas.

Para todos los tratamientos, se prepararon 5 placas las que se consideraron repeticiones. Para el control, las placas fueron pulverizadas apenas con agua destilada + Tween 80 (0,01%).

Los datos obtenidos se analizaron en cuanto a la varianza (teste F) y las medias comparadas por el test de Scott Knott, ambos con 5% de significación, utilizando el programa Sisvar (18).

RESULTADOS

Productos fitosanitarios: En general, todos los productos fungicidas difirieron del control, afectando negativamente la viabilidad y formación de UFC. El crecimiento vegetativo de *B. bassiana* (aislamiento Unioeste 4) no fue afectado por los productos evaluados, pues el diámetro de las colonias no difirió significativamente en ningún tratamiento. La producción de conidios fue significativamente mayor en casi todos los tratamientos con los productos, en relación al control (Tabla 1, 2 y 3).

El caldo sulfocálcico provocó reducción efectiva en la viabilidad y UFC en las tres concentraciones evaluadas, difiriendo del control.

Los productos inductores de resistencia en plantas como Agro-mos (todas las concentraciones), Agro-fos (CR y 2CR), Biogermex (todas concentraciones) y Bion (2CR) difirieron del control en algunos de los parámetros, principalmente la germinación. En relación al diámetro, no hubo diferencia estadística entre el tratamiento Biogermex (CR) y su respectivo control. Sin embargo, los productos Biogermex (2CR) y Bion (0,5CR y CR) estimularon la conidiogénesis, difiriendo del control.

Entre los insecticidas, Pironim (0,5CR) (producto a base de aceite de nim) no afectó la viabilidad de *B. bassiana*, mientras que el resto de los productos provocaron disminuciones en el parámetro, con diferencias significativas con relación al control (Tabla 3).

Los productos Forth (todas las concentraciones) y Pironim (0,5CR y CR) provocaron incrementos en el número de UFC difiriendo del control, mientras que el aceite de Citronela (0,5CR y 2CR) y Pironim® (2CR) indujeron reducción en este parámetro (Tabla 3).

TABLA 1. Compatibilidad del aislamiento Unioeste 4 de *Beauveria bassiana* con fungicidas (26±1°C fotoperíodo de 12 horas)./ *Compatibility of Beauveria bassiana* (strain Unioeste 4) with fungicides (26±1°C, photophase of 12 h).

Fungicidas	Viabilidad (%)	UFC	Diámetro (cm)	Conidios (× 10 ⁶ / ml)	IB**
Control	96,9 a	287,6 a	2,4 a	57,8 b	-
Planta Clean [®] 0,5CR*	90,2 b	198,8 b	2,6 a	119,2 a	113,0
Planta Clean [®] CR	76,4 c	199,2 b	2,6 a	123,7 a	115,4
Planta Clean [®] 2CR	70,9 e	194,4 b	2,5 a	70,0 b	87,8
C. Bortalés 0,5CR	72,0 d	179,0 c	2,6 a	98,9 a	102,3
C. Bortalés CR	64,6 f	183,2 c	2,5 a	97,0 a	102,8
C. Bortalés 2CR	59,9 g	174,6 c	2,5 a	84,0 b	92,4
C. Sulfocálcico 0,5CR	7,0 h	0,0 d	2,6 a	127,4 a	107,5
C. Sulfocálcico CR	5,4 h	0,0 d	2,6 a	109,0 a	99,3
C. Sulfocálcico 2CR	3,5 h	0,0d	2,6 a	108,2 a	99,5
Test F	1004,41	1083,34	1,92	5,28	-
C.V.	4,64	4,93	3,95	22,52	-

Medias seguidas de la misma letra en la columna, no difieren entre sí por el Test de Scott Knott a 5% de significancia.

*Concentraciones de los productos: 0,5 CR=Mitad de la concentración recomendada; CR=Concentración recomendada; 2CR = Doble de la concentración recomendada.

C.V. = Coeficiente de variación

**Valores de IB, según Rossi-Zalaf *et al.* (17) entre 0 a 41 = tóxico; entre 42 e 66 = Moderadamente tóxico; mayores que 66 = compatible

TABLA 2. Compatibilidad del aislamiento Unioeste 4 de *Beauveria bassiana* con inductores de resistencia (26±1°C fotoperíodo de 12 horas)./ *Compatibility of Beauveria bassiana* (strain Unioeste 4) with plant resistance inductors (26±1°C, photophase of 12 h).

Inductores de Resistencia	Viabilidad (%)	UFC	Diámetro (cm)	Conidios (× 10 ⁶ / ml)	IB**
Control	96,9 a	287,6 a	2,4 a	57,8 b	-
Agro-mos [®] 0,5CR	78,3 b	234,6 c	2,3 b	73,9 b	86,3
Agro-mos [®] CR	74,2 b	241,6 c	2,3 b	68,0 b	82,1
Agro-mos [®] 2CR	68,6 c	239,4 c	2,3 b	69,0 b	83,1
Agro-fos 0,5CR	89,0 a	256,4 b	2,3 b	77,1 b	87,7
Agro-fos CR	81,1 b	249,0 b	2,2 b	70,8 b	83,7
Agro-fos 2CR	62,9 c	243,2 c	2,2 b	69,2 b	80,6
Biogermex [®] 0,5CR	65,9 c	263,0 b	2,3 b	65,8 b	80,8
Biogermex [®] CR	69,7 c	250,8 b	2,4 a	74,0 b	87,4
Biogermex [®] 2CR	77,2 b	251,4 b	2,2 b	94,6 a	94,0
Bion [®] 0,5 CR	92,2 a	255,2 b	2,2 b	98,4 a	96,8
Bion [®] CR	93,7 a	243,4 c	2,3 b	89,9 a	94,5
Bion [®] 2 CR	69,4 c	244,8 c	2,2 b	59,4 b	76,9
Test F	22,02	11,77	2,49	1,96	-
C.V.	6,91	3,50	4,25	27,10	-

Medias seguidas de la misma letra en la columna, no difieren entre sí por el Test de Scott Knott a 5% de significancia.

*Concentraciones de los productos: 0,5 CR=Mitad de la concentración recomendada; CR=Concentración recomendada; 2CR = Doble de la concentración recomendada.

C.V. = Coeficiente de variación

**Valores de IB, según Rossi-Zalaf *et al.* (17) entre 0 a 41 = tóxico; entre 42 e 66 = Moderadamente tóxico; mayores que 66 = compatible

TABLA 3. Compatibilidad del aislamiento Unioeste 4 de *Beauveria bassiana* con insecticidas ($26\pm 1^\circ\text{C}$ fotoperíodo de 12 horas)./ *Compatibility of Beauveria bassiana* (strain Unioeste 4) with insecticides ($26\pm 1^\circ\text{C}$, photophase of 12 h).

Insecticidas	Viabilidad (%)	UFC	Diámetro (cm)	conidios ($\times 10^6 / \text{ml}$)	IB**
Control	95,9 a	199,4 c	2,4 b	41,8 b	-
Forth 0,5 CR	74,9 b	253,6 a	2,4 b	57,0 b	79,5
Forth CR	76,4 b	260,0 a	2,4 b	59,8 b	81,5
Forth 2 CR	75,5 b	247,2 a	2,4 b	74,0 a	86,5
Aceite de Citronela 0,5 CR	70,3 b	158,0 d	2,5 a	97,9 a	100,4
Aceite de Citronela CR	69,6 b	188,0 c	2,5 a	87,1 a	94,5
Aceite de Citronela 2 CR	53,6 c	155,6 d	2,6 a	85,5 a	93,2
Pironim® 0,5 CR	89,3 a	207,4 b	2,6 a	69,9 a	91,0
Pironim® CR	74,3 b	212,8 b	2,6 a	72,1 a	90,4
Pironim® 2 CR	73,3 b	190,6 c	2,6 a	77,6 a	92,6
Factor F	22,98	108,15	4,69	3,04	-
CV (%)	7,01	3,84	4,25	28,99	-

Medias seguidas de la misma letra en la columna, no difieren entre sí por el Test de Scott Knott a 5% de significancia.

*Concentraciones de los productos: 0,5 CR=Mitad de la concentración recomendada; CR=Concentración recomendada; 2CR = Doble de la concentración recomendada.

C.V. = Coeficiente de variación

**Valores de IB, según Rossi-Zalaf *et al.* (17) entre 0 a 41 = tóxico; entre 42 e 66 = Moderadamente tóxico; mayores que 66 = compatible

En relación al diámetro, solamente el producto Forth (todas las concentraciones) no difirió del control. Los otros productos propiciaron incrementos significativos en el diámetro de las colonias.

Hubo estímulo en la producción de conidios por los productos Forth (2CR), aceite de Citronela (todas concentraciones) y Pironim (todas concentraciones).

Extractos acuosos: Se observó, en general que los extractos acuosos afectaron algunos de los parámetros evaluados del hongo, reduciéndolos o aumentándolos (Tabla 4). Para la viabilidad, se verificó que los extractos acuosos de zacate de limón, ruda, canela, citronela y oreja de palo no difirieron del control. Todos los extractos acuosos redujeron la viabilidad de los conidios, aunque solamente eucaliptus, ricino, melia, cúrcuma, nim, rosmarino y laurel, fueron significativos estadísticamente (Tabla 4).

Los valores medios de UFC obtenidos con todos los extractos acuosos difirieron estadísticamente con el control, observando reducciones de hasta 33,52%. El extracto de melia redujo las UFC en 24% en relación al control.

Los extractos acuosos de eucaliptus, ricino, melia, cúrcuma, nim, rosmarino y laurel no provocaron variaciones significativas en el diámetro de las colonias, comparadas con el control, mientras que los de zacate de limón, ruda, canela, citronela y oreja de palo indujeron reducciones entre 4,2 y 12,8%.

En la producción de conidios, los extractos de eucaliptus, melia, nim y laurel difirieron significativamente del control, con estímulo en la producción entre 16,08 a 57,61%.

El extracto de ricino, en general difirió del control en todos los parámetros excepto en el diámetro, siendo el parámetro UFC el más afectado con cerca de 25%.

En relación a la toxicidad, todos los extractos vegetales y basidiocarpos de *P. sanguineus* se mostraron compatibles al hongo (Tabla 4).

Extractos alcohólicos: En relación a la viabilidad de los conidios producidos, el control difirió significativamente de los extractos alcohólicos de eucaliptus, zacate de limón, ruda, melia, cúrcuma, nim, rosmarino y laurel, verificando una reducción entre 14,4 y 23,6%.

El número de UFC formadas en la presencia de los extractos de ricino, melia, canela, zacate de limón, nim, rosmarino y laurel sufrieron reducciones de hasta 36,6% (Tabla 5).

El crecimiento vegetativo del hongo en contacto con el extracto de ruda fue el único que sufrió reducción significativa en relación al control, con reducción de 8,7%.

La producción de conidios en presencia de los extractos alcohólicos de eucaliptus, ruda, ricino, canela,

TABLA 4. Compatibilidad del aislamiento Unioeste 4 de *Beauveria bassiana* con extractos acuosos de plantas y de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* (26±1°C fotoperíodo de 12 horas)./ *Compatibility of Beauveria bassiana* (strain Unioeste 4) with plant extracts and *Pycnoporus sanguineus* basidiocarps (26±1°C, photophase of 12 h).

Extractos	Viabilidad		UFC		Diámetro		Producción de conidios		IB
	(%)	VP*	UFC	VP	(cm ²)	VP	(× 10 ⁶)	VP	
Control	96,9 a	0	211,2 a	0	2,4 a	0	75,5 c	0	-
Eucaliptus	81,5 b	-15,9	140,4 c	-33,5	2,5 a	3,7	119,1 a	57,6	124,9
Zacate de limón	92,8 a	-4,2	147,8 c	-30,0	2,2 b	-7,8	50,2 c	-33,4	81,5
Ruda	89,3 a	-7,8	155,4 c	-26,4	2,3 b	-4,7	49,5 c	-34,3	82,4
Ricino	84,2 b	-13,1	158,2 c	-25,0	2,4 a	-0,3	57,9 c	-23,3	88,4
Melia	80,6 b	-16,8	160,4 c	-24,0	2,5 a	1,9	94,7 b	25,3	110,1
Cúrcuma	84,0 b	-13,2	167,0 c	-20,9	2,3 a	-2,9	57,3 c	-24,1	85,4
Canela	88,7 a	-8,4	172,6 b	-18,2	2,1 b	-12,8	59,2 c	-21,6	83,6
Citronela	90,4 a	-6,7	176,6 b	-16,3	2,3 b	-5,1	66,9 c	-11,4	92,0
Nim	82,6 b	-14,7	185,6 b	-12,1	2,4 a	0	87,7 b	16,0	105,4
Rosmarino	85,8 b	-11,4	188,4 b	-10,8	2,3 a	-2,4	58,5 c	-22,5	88,0
Laurel	84,4 b	-12,9	192,2 b	-9,0	2,4 a	0	91,4 b	21,0	107,7
Oreja de palo	87,9 a	-9,2	152,0 c	-28,0	2,3 b	-4,2	49,4 c	-34,5	82,5
CV(%)	6,15		10,79		5,75		27,41		-
Factor F	3,91		6,16		3,08		6,25		-

Medias seguidas de la misma letra en la columna, para cada producto testado, no difieren entre si por el Test de Scott Knott a 5% de significancia.

*VP = Variación porcentual. Fórmula: [(Media del tratamiento/Media del control × 100) – 100]

TABLA 5. Compatibilidad del aislamiento Unioeste 4 de *Beauveria bassiana* con extractos alcohólicos de plantas (26±1°C fotoperíodo de 12 horas)./ *Compatibility of Beauveria bassiana* (strain Unioeste 4), in contact with vegetal alcoholic extracts (26±1°C, photophase of 12 h).

Extractos	Viabilidad		UFC		Diámetro		Producción de conidios		IB
	(%)	VP	UFC	VP	(cm ²)	VP	(× 10 ⁶)	VP	
Control	94,0 a	0	186,2 a	0	2,4 a	0	66,5 a	0	-
Eucaliptus	75,2 b	-21,7	174,4 a	6,3	2,5 a	3,5	52,1 b	-21,6	90,24
Zacate de limón	82,5 b	-14,8	170,2 b	-8,5	2,5 a	4,8	57,4 a	-13,6	94,94
Ruda	80,0b	-17,4	177,8 a	-4,5	2,2 b	-8,7	40,2 b	-39,5	77,17
Ricino	86,2 a	-11,0	168,6 b	-9,4	2,5 a	4,4	48,6 b	-26,8	89,44
Melia	74,0 b	-23,6	143,8 c	-22,7	2,5 a	2,3	69,7 a	4,9	100,84
Cúrcuma	77,7 b	-19,7	174,2 a	-6,4	2,5 a	5,6	65,5 a	-1,5	100,04
Canela	94,0 a	-3,0	162,6 b	-12,6	2,5 a	5,3	48,2 b	-27,5	90,41
Citronela	87,2 a	-10,0	152,8 c	-17,9	2,6 a	6,0	62,8 a	-5,5	99,48
Nim	80,2 b	-17,0	118,0 d	-36,6	2,5 a	2,0	45,3 b	-31,8	85,58
Rosmarino	79,2 b	-17,9	162,8 b	-12,5	2,6 a	6,0	55,2 b	-16,91	93,78
Laurel	82,9 b	-14,4	147,6 c	-20,7	2,5 a	4,8	68,4 a	2,90	102,06
CV(%)	10,14		6,39		3,81		20,71		
Factor F	3,48		16,22		5,54		3,55		

Medias seguidas de la misma letra en la columna, para cada producto testado, no difieren entre si por el Test de Scott Knott a 5% de significancia.

*VP = Variación porcentual. Fórmula: [(Media del tratamiento/Media del control × 100) – 100]

nim y rosmaryno difirió estadísticamente del control, con reducciones entre 16,9 - 39,4%. El extracto de ruda provocó reducción tanto en el diámetro como en la producción de conidios, en 8,7 y 39,4%, difiriendo del su control.

En cambio, melia en su acción redujo la viabilidad de los conidios y las UFC; sin embargo, no afectó el crecimiento vegetativo de las colonias, y la conidiogénesis tuvo un estímulo de 4,8%, no difiriendo del control (Tabla 5).

El extracto de nim fue el que más afectó los parámetros de UFC y la producción de conidios con reducción mayor del 30%. La viabilidad fue afectada en un 20%. También se utilizó el producto Dalneem, igualmente a base de aceite de nim, también no se observó diferencia estadística en relación al control (12).

A pesar de los extractos vegetales afectaron en diferentes grados los parámetros evaluados los valores de IB (todos por encima de 66) los ubican como productos compatibles (Tabla 5).

DISCUSIÓN

Productos fitosanitarios: Los resultados encontrados en este trabajo divergen de los obtenidos por Wenzel *et al.* (21), en relación al efecto del cobre (que en este estudio, está presente en la caldo bordalés), ya que el fungicida Cuprozed (a base de oxiclورو de cobre) influyó en el crecimiento y esporulación del hongo *Lecanicillium lecanii* Zimm.; sin embargo, la capacidad de germinación en conidios no fue afectada.

En relación al producto caldo sulfocálcico, su efecto negativo pudo ser atribuido a la presencia de polisulfuros de calcio que poseen acción fungicida. Estudios realizados por Sosa-Gómez *et al.* (22) demostraron que el producto Kumulus DF, a base de azufre, también afectó la germinación de conidios de *Nomuraea rileyi* Farlow (Sansón), en más de 90%. También Formentini (12), observó reducción en la UFC, diámetro y producción de conidios de *B. bassiana* provocado por Stubble-Aid, que presenta azufre en su composición. El estudio realizado por Juliatti (23) mostró que el azufre actúa sobre la cadena respiratoria de los hongos, inhibiendo el transporte de electrones, lo que pudiera estar relacionado con la reducción de los parámetros evaluados.

El producto Biogermex posee en su composición bioflavonoides, que tienen capacidad de ligarse con proteínas extracelulares y paredes celulares de bacterias, inactivándolas o rompiéndolas (24). Sin embargo, no fueron encontrados estudios evaluando efectos de este producto sobre hongos, así, es probable que la reducción de las UFC, esté relacionada con obstáculos al proceso de germinación o la acción de los bioflavonoides sobre la membrana del hongo después la germinación destruyéndola, tal como también resaltó Silva (25) en su estudio del efecto del Biogermex sobre el desarrollo de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner.

Los productos Forth (2CR), aceite de Citronela (todas concentraciones) y Pironim (todas concentraciones)

produjeron un aumento en la producción de conidios, lo que pudiera estar relacionado con la capacidad de degradación y metabolización del principio activo por parte del hongo, que así son utilizados como nutrientes secundarios, promoviendo su crecimiento vegetativo y la conidiogénesis (2, 26).

Extractos acuosos: Los resultados obtenidos en este estudio, acerca de la actividad del extracto acuoso de eucalipto sobre *B. bassiana*, coinciden con los obtenidos por Formentini (12), cuando verificó la reducción en la viabilidad y UFC. Esto puede ser explicado por la presencia de taninos, que inhiben las enzimas del hongo, ocupando los sitios de sus sustratos o actuando sobre la membrana celular de los hongos, alterando así su metabolismo (27).

El extracto de ricino pudo haber reducido las UFC por la presencia de ricina, que es muy tóxica, interrumpiendo la síntesis proteica (28).

Melia redujo el crecimiento vegetativo, lo que no coincide con los resultados del estudio de Milanesi *et al.* (29). Dichos autores evaluaron el efecto del extracto acuoso de melia sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk concluyendo que el mismo no se mostró efectivo en el control del hongo, y también se observó estímulo en el crecimiento micelial del fitopatógeno.

En relación a la toxicidad, Formentini (12) encontró resultados semejantes, cuando estudió los extractos de rosmaryno, eucalipto, zacate de limón y cúrcuma sobre *B. bassiana*, siendo el extracto de cúrcuma el que más afectó el hongo; sin embargo, todos fueron compatibles, a pesar de que las técnicas utilizadas en cada estudio fueron diferentes.

Extractos alcohólicos: La ruda posee en su composición taninos, que como ya fue citado anteriormente, inhiben las enzimas del hongo, alterando el metabolismo del hongo, pudiendo ser el motivo de la reducción del parámetro crecimiento vegetativo.

Salvatori *et al.* (30) relataron que los extractos crudos de las hojas de ruda, incorporados en la concentración de 25% en BDA y autoclavados, también causaron inhibición del crecimiento micelial para *C. gloeosporioides* corroborando con los resultados encontrados en este trabajo.

Por su parte, Marques *et al.* (11) verificaron que el aceite de nim afectó el crecimiento y la esporulación de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) A.H.S. Br. & G. Sm., como ocurrió en este trabajo.

CONCLUSIÓN

Los productos fueron compatibles con *B. bassiana*. Sin embargo, los PFA y los extractos afectaron, reduciendo o estimulando, los parámetros biológicos de los hongos, principalmente el caldo sulfocálcico.

Los resultados permiten concluir que, a pesar de haber compatibilidad entre los PFA, extractos acuosos y alcohólicos aquí evaluados y el hongo *B. bassiana*, se recomienda evitar la utilización conjunta o que la aplicación de los productos sea hecha, como mínimo, 48 h después de la aplicación de *B. bassiana*, que corresponde al tiempo necesario para la germinación de los conidios e invasión del hospedador por el hongo (19), como forma de establecer la selectividad ecológica del producto, a través del espacio y tiempo, respectivamente (20).

Además, en el abordaje de la conservación de enemigos naturales, el Caldo Sulfocálcico camina a contramano de los preceptos de la agroecología, mostrándose inadecuada, pues la reducción de aproximadamente 90% en la viabilidad de los conidios y la ausencia de UFC puede comprometer, teóricamente, los conidios presentes en el suelo y reducir el potencial del inóculo en el ambiente y afectar la ocurrencia de epizootias.

AGRADECIMIENTOS

A la Bióloga, Dra. Maria Elena Schapovaloff, INTA-Estación Experimental Agropecuaria Montecarlo, Misiones, Argentina, por la traducción del texto en idioma español.

Al Parque Tecnológico de Itaipu, por la concesión de una beca de posgrado al autor de la publicación.

REFERENCIAS

1. Stargarlin JR, Kuhn OJ, Schwan-Estrada KRF. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. Revis. Anual Patol Plantas. 2008;16:265-304.
2. Alves SB, Moino JRA, Almeida JEM. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. p. 217-238. In: Alves SB (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ; 1998.
3. Oliveira CN, Neves PMOJ, Kawazoe LS. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. Sc Agric. 2003;60(4):663-667.
4. Dantas SAF, Oliveira SMA, Bezerra Neto E, Coelho RSB, da Silva RLX. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. Summa Phytopathol. 2004;30(3):314-319.
5. Hirose E, Neves PMOJ, Zequi JAC, Martins LH, Peralta CH, Moino JRA. Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Tecapar, Braz. Arch Biol Technol. 2001;44(4):419-423.
6. Faria MR, Magalhães BP. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. Biotecnol Ciênc Desenvolv. 2001; 22:18-21.
7. Furlong MJ, Pell JK. The influence of environmental factors on the persistence of *Zoophthora radicans* conidia. J Invertebr Pathol. 1997;69(3):223-233.
8. Alves SB, Leucona RE. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: Alves S B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ; 1998, p.97-100.
9. Neves PMOJ, Hirose E, Tchujo PT, Moino JRA. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. Neotrop Entomol. 2001;30(2):263-268.
10. Alves SB, Silveira CA, Lopes RB, Tamai MA, Ramos EQ, Salvo S. Eficácia de *Beauveria bassiana*, Imidacloprid e Thiacloprid no controle de *Bemisia tabaci* e na incidência do BGMV. Man Integr Plagas. 2001;61:31-36.
11. Marques RP, Monteiro AC, Pereira AGT. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de Nim (*Azadirachta indica*). Ciênc Rural. 2004;34(6):1675-1680.
12. Formentini MA, Alves LFA, Pinto FGS, Mamprim AP. In vitro assay of alternative phytosanitary products and plant extracts on *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Clavicipitaceae). Rev Bras Agroecologia. 2014;9(1):195-204.
13. Mertz MR, Alves LFA, Oliveira DGP, Santos JC. Efeito de Produtos fitossanitários naturais sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *in vitro*. Biossay. 2010;5(3):1-10.

14. Paulus G, Muller AM, Barcellos LAR. Agroecologia aplicada: praticas e métodos para uma agricultura de base ecológica. Porto Alegre: EMATER/RS. 2000.
15. Viecelli CA, Stangarlin JR, Kuhn OJ, Schwan-Estrada KRF. Resistance induction in bean plants against angular leaf spot by extracts from *Pycnopus sanguineus* mycelium. Summa Phytopathol. 2010;36 (1):73-80.
16. Silva RZ, Neves PMOJ, Santoro PH. Técnicas e parâmetros utilizados nos estudos de compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e produtos fitossanitários. Ciênc Agrar. 2005;26(3):305-312.
17. Rossi-Zalaf LS, Alves SB, Lopes RB, Neto SS, Tanzini MR. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças, p.279-302. In: Alves SB, Lopes RB (ed). Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: Fealq; 2008.
18. Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciênc Agrotecnol. 2011;35:1039-1042.
19. Tamai MA, Alves SB, Lopes RB, Faion M, Padulla LFL. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Arq Inst Biol. 2002;69(3):89-96.
20. Yamamoto T, Moerschell RP, Wakem LP, Jomar-Panicucci S, Sherman F. Strand-specificity in the transformation of yeast with synthetic oligonucleotides. Genetics. 1992;131(4):811-819.
21. Wenzel LM, Batista Filho A, Gassen MH, Almeida AMB. Compatibilidade de *Lecanicillium lecanii* (Hyphomycetes), em condições de laboratório e estufa, aos agrotóxicos utilizados na cultura do crisântemo. Arq Inst Biol. 2008;75(2):157-166.
22. Sosa-Gómez DR, Delpin KE, Moscardi F, Nozaki MH. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. Neotrop Entomol. 2003;32(2):287-291.
23. Juliatti FC. Modo de ação dos fungicidas [cd rom]. In: Simpósio sobre Relações entre Nutrição Mineral e incidência de doenças de plantas no período de 27 de fevereiro a 01 de março de 2005. Piracicaba: Potafos; 2005.
24. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S. Comparative study on the antibacterial activity of hytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Ethnopharmacol. 1996;50:27-34.
25. Silva ERL. Efeito de produtos alternativos sobre *Bacillus thuringiensis* Subesp. Kurstaki e *Trichogramma pretiosum riley* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) [Tese]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2010.
26. Moino JRA, Alves SB. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). An Soc Entomol Bras. 1998;27(4):611-619.
27. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. 2002.
28. Lord MJ, Roberts LM, Robertus JD. Ricin: structure, mode of action and some current applications. J Faseb. 1994;8(2):201-208.
29. Milanesi PM, Blume E, Muniz MFB, Brand SC, Junges E, Manzoni CG, et al. Ação fungitóxica de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. Rev FZVA. 2009;16(1):1-13.
30. Salvatori RK, Povh FP, Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR. Atividade antifúngica dos extratos brutos de *Corymbia citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Ruta graveolens* e *Curcuma longa*. Fitopatol Bras. 2003;28:360-361.

Recibido: 8-7-2013.
 Aceptado: 28-12-2013.