



METODOLOGIAS ALTERNATIVAS DE SUBSTRATO SÓLIDO NO CRESCIMENTO DE *Pochonia chlamydosporia*

KHADIJA VITORIA PALHÃO DE CARVALHO¹
SUZILÂINE YASMIN DA SILVA CAVALCANTE²

RESUMO: A busca por substratos sólidos alternativos tem se intensificado como estratégia sustentável para a produção de microrganismos com potencial biológico. *Pochonia chlamydosporia*, um fungo nematófago, destaca-se pelo uso de clamidósporos no controle de fitonematoides. Este estudo teve como objetivo avaliar metodologias alternativas para a produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia* em substrato sólido à base de arroz parboilizado, visando otimizar a esporulação deste agente de controle biológico de fitonematoides. Foram conduzidos dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado, considerando variações no fotoperíodo (48h e 10 dias), peso do substrato (350 g e 500 g) e posição dos pacotes (horizontal e vertical). A quantificação da produção de clamidósporos foi realizada por meio da câmara de Neubauer. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os resultados indicaram que o tratamento controle, mantido em escuro contínuo, apresentou a maior produção de clamidósporos ($5,53 \times 10^4$ esporos/mL), superando significativamente os tratamentos expostos à luz. O tratamento T1P2S1 (fotoperíodo de 48h, 500 g, posição vertical) também demonstrou desempenho satisfatório, não diferindo estatisticamente do padrão, a análise dos resultados sugere que a exposição contínua à luz compromete a viabilidade do fungo, enquanto o aumento da massa de substrato e sua posição vertical favorecem a esporulação em menor escala. Esses dados estão em consonância com a literatura, que aponta a ausência de melanina nos clamidósporos como fator de sensibilidade à radiação UV. a manutenção de *P. chlamydosporia* em ambiente escuro é determinante para maximizar a produção de esporos viáveis, sendo está uma condição essencial para a formulação eficiente de bioinsumos agrícolas.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, Clamidósporos, Formulação sólida, Fungo nematófago.

ALTERNATIVE SOLID SUBSTRATE METHODOLOGIES FOR THE GROWTH OF *Pochonia chlamydosporia*.

ABSTRACT: The search for alternative solid substrates has intensified as a sustainable strategy for the production of microorganisms with biological potential. *Pochonia chlamydosporia*, a nematophagous fungus, stands out for its use of chlamydospores in the control of plant-parasitic nematodes. This study aimed to evaluate alternative methodologies for the production of chlamydospores of *P. chlamydosporia* on a solid substrate based on parboiled rice, with the goal of optimizing sporulation of this biological control agent. Two experiments were conducted in a completely randomized design, considering variations in

¹ Acadêmico de Graduação. Curso de Agronomia, Centro Universitário Fasipe – UNIFASIFE. Endereço eletrônico: vitoriakhadija12@gmail.com

² Professora Doutora em Fitopatologia. Curso de Agronomia, Centro Universitário Fasipe - UNIFASIFE. Endereço eletrônico: suzilainecavalcante@gmail.com



photoperiod (48 hours and 10 days), substrate weight (350 g and 500 g), and package position (horizontal and vertical). Chlamydospore production was quantified using a Neubauer chamber. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p \leq 0.05$). Results indicated that the control treatment, kept in continuous darkness, had the highest chlamydospore production (5.53×10^4 spores/mL), significantly outperforming the light-exposed treatments. Treatment T1P2S1 (48-hour photoperiod, 500 g, vertical position) also showed satisfactory performance, not statistically differing from the control. An analysis of the results suggests that continuous light exposure compromises the fungus' viability, while increasing substrate mass and placing it vertically favor sporulation on a smaller scale. These findings are consistent with literature, which cites the absence of melanin in chlamydospores as a factor in UV radiation sensitivity. It is concluded that maintaining *P. chlamydosporia* in a dark environment is crucial for maximizing viable spore production, an essential condition for the effective formulation of agricultural bio-inputs. This study contributes to the improvement of in vitro fungal multiplication techniques and reinforces the species' potential as a biological control agent in integrated nematode management.

KEYWORDS: Biological control, Chlamydospores, Solid formulation, Nematophagous fungus.

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Pochonia chlamydosporia* (Zare & Gams), anteriormente conhecido como *Verticillium chlamydosporium*, (Goddard) pertence à família Clavicipitaceae, na ordem Hypocreales. É considerado um microrganismo antagonista, utilizado no biocontrole de fitonematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) e de cistos (*Heterodera* spp.) (DUTRA; AMARAL, 2021). A ação do fungo ocorre por meio da produção de clamidósporos, estruturas de resistência capazes de germinar no solo e atuar como unidades infectivas. Após a germinação, o micélio invade e coloniza ovos e fêmeas dos nematoides, promovendo a degradação de seus tecidos e resultando na morte do hospedeiro (VIGGIANO; FREITAS; FERREIRA, 2012).

P. chlamydosporia apresenta capacidade saprofítica nos solos, podendo atuar como um fungo saprófago, ou seja, sobrevive no solo sem a presença de um hospedeiro, se alimentando somente de matéria orgânica, demonstrando assim alta resistência em sua capacidade de produzir clamidóporos (FERNANDES *et al.*, 2014). Além disso, é um microrganismo que pode ser facilmente cultivado *in vitro*, para a produção de inóculo, a partir de diversos substratos em meio de cultivo sólido, como cereais, grãos de milho, arroz, cevada ou trigo moídos (CARVALHO., 2020).

Para a produção em larga escala de inóculo desse fungo, o cultivo em grãos de arroz (*Oryza sativa*) tem se mostrado altamente eficiente, proporcionando melhor desenvolvimento micelial e elevada esporulação. Embora o cultivo em meio líquido também seja viável, a produção de clamidósporos nesse sistema é reduzida, evidenciando menor eficiência quando comparada ao substrato sólido (DALLEMOLLE – GIARETTA *et al.*, 2011).

Nesse contexto, destaca-se que o Brasil é atualmente um dos líderes mundiais na produção e utilização de bioinsumos, impulsionado principalmente pelo crescimento do mercado de agentes de controle biológico. Como resultado, o mercado global de produtos biológicos está crescendo 9% ao ano, com um aumento nacional de mais de 15% (EMBRAPA, 2019). Controle biológico baseia-se na utilização de inimigos naturais, incluindo bactérias, fungos, vírus e nematoides entomopatogênicos, como agentes de



supressão de pragas e fitopatógenos. Trata-se de uma estratégia sustentável de manejo, que preserva a qualidade do solo, das culturas e do ambiente, além de apresentar baixa toxicidade para seres humanos e outros organismos não alvo, configurando-se como uma alternativa segura e ambientalmente adequada em relação aos métodos químicos convencionais (BETTIOL, 2023).

Os bioinsumos são produtos ou serviços derivados de organismos vivos ou dos processos biológicos que envolvem esses organismos, sendo aplicados na produção de outros bens e serviços em sistemas agrícolas, tanto no cultivo quanto nas fases de pós-colheita, processamento e armazenamento. No contexto da agroecologia e da agricultura orgânica, eles representam um conjunto de práticas estratégicas que visam desenvolver alternativas de produção sustentáveis, com o uso de tecnologias baseadas em recursos renováveis, promovendo a autonomia e valorizando a diversidade socio biológica (VIDAL; DIAS, 2023).

Novas abordagens de estudo voltadas ao desenvolvimento de microrganismos para o controle biológico, especialmente em condições *in vitro*, demandam validação criteriosa por meio de experimentações padronizadas. A eficácia e a estabilidade desses agentes biológicos, bem como a viabilidade de novas estratégias de manejo, devem ser confirmadas por ensaios rigorosos que permitam sua aplicação segura e eficiente em sistemas agrícolas. Pois estes são determinantes quanto à eficácia de um agente para tratamento de fitonematoides. Sendo eles aplicados isoladamente ao solo ou integrados a outros métodos de controle.

Este trabalho teve como objetivo, avaliar metodologias alternativas para o desenvolvimento de *Pochonia chlamydosporia in vitro*, utilizando substrato sólido de arroz (*Oryza sativa*), em diferentes condições.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle Biológico

O manejo biológico é uma ferramenta imprescindível no controle de doenças de plantas. Este visa à utilização de organismos vivos como fungos, bactérias e vírus com o propósito de diminuir a infestação de microrganismos, que atacam as lavouras ou ainda disseminam doenças, sendo assim chamados de inimigos naturais (FILHO; MACEDO, 2011). A história do uso do Controle Biológico começou há muitos anos. Harry Scott Smith foi o primeiro entomologista a utilizar o termo 'Controle Biológico' para se referir a inimigos naturais, que servem para um controle mais saudável a sociedade humana (WILSON; TRIBE, 1976).

A agricultura tem apresentado um crescimento expressivo nos últimos anos, impulsionando a adoção de novas tecnologias, entre elas o controle biológico, que tem demonstrado inúmeras vantagens em comparação aos métodos convencionais de manejo. Dentre seus principais benefícios, destacam-se a persistência no ambiente, alta eficiência, ausência de resistência e resíduos químicos, especificidade sobre os organismos-alvo, menor contaminação ambiental, reduzido risco de intoxicação de seres humanos e animais, baixo custo operacional e a manutenção do equilíbrio ecológico (BETTIOL, 2025).

A dificuldade de manejo das doenças causadas por patógenos que habitam o solo é dificultado devido às más condições do ambiente, tais como, áreas degradadas, clima e resistências de patógenos a ingredientes ativo, no qual acaba dificultando a eficiência no controle químico, o que torna sua eficiência prejudicada e seu índice de aplicação reduzido



(BELLÉ; FONTANA, 2018). Além disso, doses elevadas de produtos químicos podem causar danos na microbiota do solo e deixar resíduos no ambiente. Isto torna o controle biológico uma alternativa mais promissora e ecologicamente correta (CERESINE *et al.*, 2024).

Um dos pontos centrais para o biocontrole ser efetivo contra fungos habitantes do solo é o uso de microrganismos antagonistas, que obtém grandes chances de serem efetivos no manejo com controle biológico, eles estão no isolamento e na seleção de microrganismos antagonísticos eficientes (ETHUR *et al.*, 2007). Além disso, o uso indiscriminado de pesticidas causou graves perturbações ambientais (SANTOS *et al.*, 2024).

O uso de microrganismos de biocontrole em geral é característico de certos tipos de indivíduos, ou seja, cada microrganismo tem seu modo de ação, o que significa que eles representam menos perigo para o ambiente e a qualidade da água, e podem apresentar baixo custo por hectare (PIERO; FELLIPINI, 2022). Sendo assim, melhor para as pequenas comunidades, agricultura familiar e cooperativas, por se caracterizarem mais economicamente viável à população, sustentável e seguro para o meio ambiente, melhor para a qualidade e segurança de cada área (FONTES; INGLIS-VALADARES, 2020).

2.2 Fungos nematófagos

Os fungos nematófagos predadores atuam capturando os nematoides por meio de estruturas especializadas, como anéis constritores ou redes adesivas. Após a captura, esses fungos penetram a cutícula do hospedeiro e colonizam seus tecidos internos, consumindo seus nutrientes e levando-o à morte (SERRA *et al.*, 2017).. Estes antagonistas estão entre os grupos mais estudados e promissores para controlar nematoides de forma biológica. Devido ao seu rápido crescimento e intenso desenvolvimento, eles são essenciais para se espalharem e sobreviverem em ambientes naturais (FERRAZ., 2016).

Os fungos nematófagos oportunistas estão classificados como os melhores em eficiência e desempenho para o controle biológico de fitonematoides. Tais fungos predadores apresentam facilidade de adaptação ao solo, com capacidade saprofítica que permite sua sobrevivência sem a necessidade de um hospedeiro específico, o que também prolonga sua permanência no ambiente. Além disso, mostram bom desenvolvimento em cultivos *in vitro* e têm crescimento acentuado na região da rizosfera. Os cistos e ovos de nematoides presentes no solo tornam-se alvos vulneráveis à ação de diferentes microrganismos colonizadores e degradadores, despertando, com isso, o interesse de vários pesquisadores (LOPEZ., 2018).

Os fungos ovicidas são capazes de degradar completamente o conteúdo interno dos ovos. Após o contato inicial, suas hifas aderem à superfície externa do ovo e secretam enzimas quitinolíticas, que rompem a estrutura composta por quitina e proteínas através da quitinase, possibilitando a penetração e colonização de todo o conteúdo interno. Uma vez em contato com cistos ou massa de ovos, esses fungos crescem rapidamente e, em geral, parasitam todos os ovos (MELO; AZEVEDO, 2016).

2.3 *Pochonia chlamydosporia*

Pochonia chlamydosporia é um fungo que pertence à família Clavicipitaceae (ordem Hypocreales), Filo Ascomycota. Inicialmente foi identificado em 1913 por Goddard, sendo denominado de *Verticillium chlamydosporium*, que logo em seguida houve mudanças em sua taxonomia para *Diheterospora chlamydosporia* (BANON; ONIONS, 1966). Posteriormente, Zare e Gams (2001), atribuíram o nome atual de *Pochonia*



chlamydosporia, assim como a classificação de *P. chlamydosporia* var (FERNANDES *et al.*, 2017).

Anteriormente, essa espécie era conhecida como *Verticillium chlamydosporium*, um fungo habitante do solo, que se desenvolve através de um micélio denso. As hifas são subdivididas que crescem em solo fértil. As células são ramificadas, septadas e hialinas, enquanto os conidióforos são verticais e ramificados. Cada um possuindo uma estrutura diferente, um conídio único, oval e hialino, tendo um esporo resistente, que dão origem a clamidósporos multicelulares, possuindo de quatro a nove células, com paredes espessas e esféricas (EVANS *et al.*, 2017).

P. chlamydosporia é um fungo parasita de ovos e fêmeas de espécies de nematoides, amplamente utilizado no controle biológico de nematoides fitoparasitas, especialmente aqueles que atacam as raízes das plantas, como o nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) e o nematoide dos cistos (*Heterodera* spp.). Seu mecanismo de ação envolve várias estratégias que ajudam a reduzir a população de nematoides no solo de forma sustentável (FRASSY *et al.*, 2010).

O modo de ação desses fungos baseia-se no parasitismo de ovos de nematoides, iniciado pela penetração das hifas fúngicas através de microporos presentes na casca do ovo. Esse processo é facilitado pela secreção de enzimas líticas, como proteases, quitinases e lipases, que degradam componentes estruturais da camada vitelínica, permitindo a colonização interna e, posteriormente, a destruição do embrião (ARANDA-MARTINEZ *et al.*, 2016). Essa atividade enzimática modifica a permeabilidade da casca, provocando sua dilatação. Como resultado, a camada vitelínica se rompe e o fungo passa a colonizar o interior do ovo. (FRANCO *et al.*, 2023).

Ao colonizar as raízes das plantas, contribui para o aumento da população de clamidósporos tanto no solo quanto na rizosfera da planta hospedeira (MANZANILLA *et al.*, 2013). Considerando as metodologias analisadas e a busca contínua por maior eficiência nos procedimentos, evidencia-se que o substrato composto por grãos de arroz apresenta-se como o meio mais adequado para o cultivo de *P. chlamydosporia*, independentemente do tipo de esterilização empregado (DALEMOLLE-GIARETTA, 2011).

Segundo Giné *et al.* (2022), esse fungo é capaz de parasitar ovos de nematoides, infiltrando-se na parede dos ovos por meio de estruturas especializadas e degradando-os internamente, o que reduz a viabilidade das larvas e impede a eclosão. A capacidade de *P. chlamydosporia* em colonizar e parasitar os ovos de nematoides é atribuída ao desenvolvimento de estruturas de ancoragem chamadas clamidósporos. Que são esporos espessos e de resistência elevada, permitindo a sobrevivência do fungo em condições adversas no solo e garantindo sua persistência nas raízes das plantas (DALEMOLLE-GIARETTA., 2013).

Para o cultivo de *P. chlamydosporia* o preparo do inóculo os substratos são fundamentais para o desenvolvimento e a sobrevivência, uma vez que disponibilizam os nutrientes essenciais para seu desenvolvimento e reprodução. Estudos indicam que substratos orgânicos, como grãos de milho, grãos de arroz e farelo de trigo, são eficazes para o cultivo desse fungo. Já que promovem o aumento de sua biomassa e a produção de esporos, sendo as estruturas responsáveis pela infecção dos nematoides. Além disso, a escolha do substrato influencia diretamente a viabilidade e a persistência do fungo no ambiente de campo, aspectos essenciais para o sucesso do controle biológico (DALEMOLLE – GIARETTA., 2014).



3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em parceria com a empresa On Farm Bio Insumos (Sinop–MT), utilizando o fungo *Pochonia chlamydosporia* para avaliar e otimizar a produção de clamidósporos em substrato sólido à base de arroz. Inicialmente, uma cepa de *P. chlamydosporia*. Foi cultivada em meio BDA para obtenção de matrizes puras, com viabilidade de 99%. As matrizes foram preparadas em frascos de vidro contendo arroz autoclavado e inoculadas com discos do fungo, sendo incubadas por 10 dias a 24 °C em ambiente esterilizado. Posteriormente, foi realizado o preparo do inóculo em câmara de fluxo laminar, utilizando solução de Tween 1% para favorecer a liberação de esporos, resultando em suspensão fúngica filtrada. Essa suspensão foi aplicada em pacotes de arroz parboilizado (350 g ou 500 g), que foram incubados por 10 dias. Foram conduzidos dois experimentos, com cinco tratamentos e quatro repetições cada, incluindo testemunha. As variáveis avaliadas foram fotoperíodo, peso do substrato e posição dos pacotes (vertical ou horizontal).

No experimento 1 foi fotoperíodo apenas nas primeiras 48 horas, já no experimento 2 foi conduzido fotoperíodo durante os 10 dias de incubação. Ao final, foi realizada a quantificação de clamidósporos pela câmara de Neubauer, permitindo avaliar a influência dos fatores testados no crescimento e na eficiência de produção do fungo. A descrição completa dos tratamentos de cada experimento está apresentada nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos aplicados para avaliação do efeito do fotoperíodo (48h), peso do substrato (P) e posição do saquinho (S) na produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia*.

Tratamento	Fotoperíodo (primeiras 48h)	Peso do Substrato (g)	Posição do Saquinho	Descrição Adicional
T1P1S1	Sim	350	Vertical	Sacos de 30x40 cm; arroz parboilizado
T1P1S2	Sim	350	Horizontal	Sacos de 30x40 cm; arroz parboilizado
T1P2S1	Sim	500	Vertical	Sacos de 30x40 cm; arroz parboilizado
T1P2S2	Sim	500	Horizontal	Sacos de 30x40 cm; arroz parboilizado
Testemunha	Não (10 dias no escuro)	350	Horizontal	Método padrão utilizado na produção

Legenda: **T1** = Tratamento (Fotoperíodo 48h); **P** = Peso do substrato (P1 350g; P2 500g); **S** = Posição do saquinho (S1 vertical; S2 horizontal).

Fonte: Própria (2025)

Tabela 2. Descrição dos tratamentos aplicados para avaliação do efeito do fotoperíodo contínuo (10 dias), peso do substrato (P) e posição do saquinho (S) na produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia*.

Tratamento	Fotoperíodo (10 dias)	Peso do Substrato (g)	Posição do Saquinho	Descrição Adicional
T2P1S1	Sim	350	Vertical	Sacos de 30x40 cm; arroz parboilizado
T2P1S2	Sim	350	Horizontal	Sacos de 30x40 cm; arroz parboilizado
T2P2S1	Sim	500	Vertical	Sacos de 30x40 cm; arroz parboilizado



Tratamento	Fotoperíodo (10 dias)	Peso do Substrato (g)	Posição do Saquinho	Descrição Adicional
T2P2S2	Sim	500	Horizontal	Sacos de 30x40 cm; arroz parboilizado
Testemunha	Não	350	Horizontal	Método padrão utilizado na produção

Legenda: T2 = Tratamento (Fotoperíodo 10 dias); P = Peso do substrato (P1 350g; P2 500g); S = Posição do saquinho (S1 vertical; S2 horizontal).

Fonte: Própria (2025)

Todos os tratamentos foram devidamente pesados e identificados. Os sacos plásticos contendo arroz foram submetidos a um processo de hidratação por aproximadamente 11 minutos antes da autoclavagem, realizada a 121 °C, por 40 minutos. Após o preparo e a esterilização, os pacotes foram transferidos para a sala de produção e deixados em resfriamento por cerca de 3 horas, antes da inoculação.

A sala destinada à produção foi completamente esterilizada com álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio a 5% da solução comercial (2,5 a 3%) e ácido peracético a 1% do princípio ativo, com aplicação realizada 18 horas antes do uso. Durante o período de resfriamento dos pacotes, a sala permaneceu sob radiação UV contínua, contribuindo para a manutenção da esterilidade até o momento da inoculação.

A análise de qualidade foi realizada de forma quantitativa, por meio da contagem de esporos, utilizando uma câmara de Neubauer (hemacitômetro) e microscópio óptico, conforme a metodologia descrita por (BETTIOL *et al.*, 2013), considerando cinco subcompartimentos por campo 1 a 5, após foi calculado a quantidade de conídios (totalizando cinco repetições por área analisada (Figura 6).

Para a contagem dos esporos, foi necessário realizar uma diluição seriada. Inicialmente, foram coletadas amostras de cada tratamento (Figura 7). Sendo pesada uma alíquota de 10 g previamente homogeneizada em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 90 mL de solução salina. Esta etapa constituiu a primeira diluição (etapa 1) do processo. A solução salina foi preparada com 990ml de água destilada, 9g de cloreto de sódio e 10ml de tween, previamente misturado e autoclavados a 121°C por 20 minutos.

Após a etapa 1, já dentro da câmara de fluxo laminar, o Erlenmeyer contendo a suspensão foi agitado manualmente, em movimentos circulares, por aproximadamente 3 minutos. Em seguida, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão foi transferida, com o auxílio de uma micropipeta equipada com ponteira esterilizada, para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina, originando a diluição 10^{-2} (etapa 2), o conteúdo do tubo de ensaio referente à diluição 10^{-2} foi homogeneizado em um agitador tipo Vortex, realizando três ciclos de agitação (colocando e retirando o tubo do equipamento) até se observar completa movimentação da suspensão em cada passagem. Em seguida, transferiu-se 1,0 mL dessa suspensão para um novo tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina, originando a diluição 10^{-3} , correspondente à etapa 3.

Para a contagem de esporos na câmara de Neubauer, o conteúdo do tubo de ensaio com a suspensão apropriada foi homogeneizado em agitador tipo Vortex, realizando-se três ciclos de agitação até que fosse observada a movimentação completa da suspensão. O tubo foi retirado do aparelho assim que a homogeneização foi considerada adequada. Utilizou-se a diluição 10^{-2} para a contagem, por apresentar uma concentração adequada de esporos, reduzindo o erro associado à quantificação.



A diluição 10^{-3} , apesar de viável, apresentou menor concentração de esporos, e a diluição 10^{-1} foi descartada por conter uma quantidade excessiva, inviabilizando a contagem precisa. Em seguida, uma alíquota de $10\ \mu\text{L}$ da diluição foi coletada com micropipeta e cuidadosamente depositada na canaleta da câmara de Neubauer, previamente coberta com lamínula, até o preenchimento completo do espaço entre as superfícies. A câmara foi deixada em repouso por cinco minutos para estabilização dos conídios, favorecendo a contagem precisa. A quantificação foi efetuada por meio de microscópio óptico, utilizando ampliações de $250\times$ ou $400\times$, nos campos 1 e 2 da câmara de Neubauer.

O experimento foi estruturado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com os tratamentos alocados de forma aleatória. Os dados coletados foram submetidos a soma de médias, seguindo a fórmula: $N = \text{Média das leituras} \times 2,5 \times 10^5 \times 10^d$ analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e, quando observada diferença estatística significativa, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Sisvar.

4 RESULTADO E DISCUSSÕES

Os resultados demonstraram diferença estatística significativa entre os tratamentos testados ($p = 0,0001$). Entre eles, o tratamento considerado padrão obteve a média mais elevada na produção de clamidósporos, com $5,53 \times 10^4$ esporos/mL. Além disso, o tratamento (T1P2S1) também se destacou, com média de $5,06 \times 10^4$ esporos/mL. Ambos os tratamentos se mostraram estatisticamente diferentes aos demais em relação aos tratamentos T1P1S2, T1P2S2 e T1P1S1, que obtiveram menores médias, variando entre $1,91 \times 10^4$; $2,65 \times 10^4$; $3,18 \times 10^4$, respectivamente (Tabela 3). Esses resultados indicam que o tratamento padrão e o T1P2S1 foram os mais eficientes na produção de clamidósporos, sendo, portanto, os mais promissores dentro das condições testadas neste estudo.

Tabela 3 - Avaliação do efeito do fotoperíodo (48h), peso do substrato (P) e posição do saco (S) na produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia*.

Tratamento	Produção de Clamidósporos
Padrão	5,53E+04a
T1P2S1	5,06E+04a
T1P1S1	3,18E+04b
T1P2S2	2,65E+04b
T1P1S2	1,91E+04b
Média	3,67E+04
CV (%)	21,81%

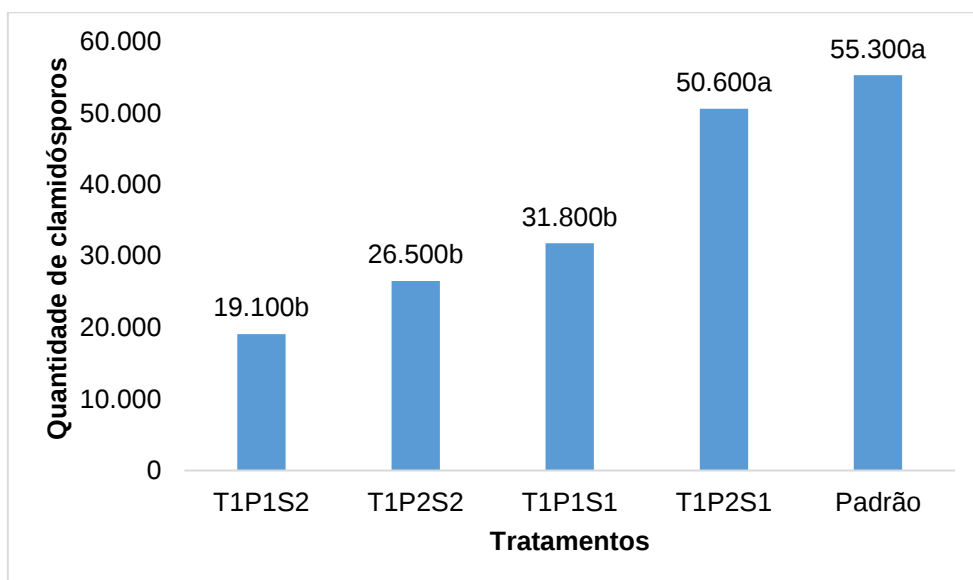
Fonte: Própria (2025)

O Gráfico 1 apresenta a média da contagem de esporos para cada tratamento, evidenciando diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p = 0,0000$). O tratamento padrão destacou-se com a maior média de produção de clamidósporos ($5,53 \times$



10^4), sendo estatisticamente superior aos demais tratamentos, cujas médias variaram entre $1,91 \times 10^4$, $2,65 \times 10^4$ e $3,18 \times 10^4$, formando um grupo homogêneo inferior. O único tratamento que apresentou média igual ao padrão foi o T1P2S1 ($5,06 \times 10^4$).

Gráfico 1 – Avaliação da produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia* em função do fotoperíodo (48 h), do peso do substrato e da posição do saco durante a incubação.



Fonte: Própria (2025)

No experimento com fotoperíodo contínuo de 10 dias, os resultados indicaram que o tratamento padrão apresentou melhor desempenho em relação aos demais tratamentos avaliados (Tabela 4). Os tratamentos T2P2S2, T2P1S2, T2P1S1 e T2P2S1 apresentaram médias semelhantes, não diferindo estatisticamente entre eles. O tratamento T2P2S2, apresentou a menor média de produção de clamidósporos, sendo significativamente inferior aos demais. Esses resultados indicam que a exposição contínua à luz, durante os 10 dias, teve um efeito negativo sobre a produção de clamidósporos.

Tabela 4 - Avaliação do efeito do fotoperíodo (10 dias), peso do substrato (P) e posição do saco (S) na produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia*.

Tratamento	Produção de Clamidósporos
Padrão	5,53E+04a
T2P2S1	2,01E+04b
T2P1S2	1,81E+04b
T2P1S1	1,64E+04b
T2P2S1	1,59E+04b
Média	2,52E+04
CV (%)	29,46

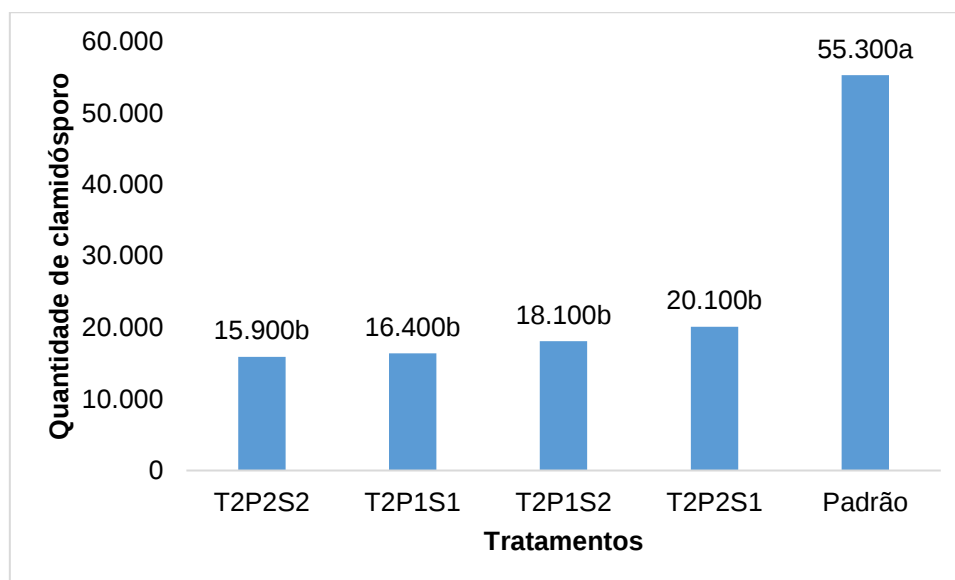
Fonte: Própria (2025)

O gráfico 2 apresenta os resultados da contagem de clamidósporos para cada tratamento, evidenciando diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p = 0,0000$).



O tratamento padrão obteve a maior média de produção ($5,53 \times 10^4$), sendo significativamente superior aos demais, que formaram um grupo homogêneo inferior, com médias variando entre $1,59 \times 10^4$ e $2,01 \times 10^4$.

Gráfico 2 – Avaliação da produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia* em função do fotoperíodo (10 dias), do peso do substrato e da posição dos sacos durante a incubação.



Fonte: Própria (2025)

Os resultados demonstram que o tratamento padrão foi o mais eficiente na indução e produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia* nas condições experimentais avaliadas. Esses dados estão de acordo com Fernandes *et al.* (2017), que observaram que a exposição à luz, especialmente à luz contínua, reduz significativamente a esporulação e a viabilidade dos propágulos de *P. chlamydosporia*. Esse efeito é atribuído à ausência de melanina nos clamidósporos, tornando-os mais suscetíveis aos efeitos deletérios da radiação de iluminação.

Estudos de Dallemolle-Giaretta *et al.* (2011) reforçam esse comportamento ao demonstrarem que a esporulação de *P. chlamydosporia* é mais eficiente quando cultivada em substratos sólidos como arroz, sob ambiente escuro e temperatura controlada. Esses autores reportaram a produção de até 1×10^9 clamidósporos/g em condições ideais, o que também corrobora a superioridade do ambiente escuro observado nos tratamentos.

O fotoperíodo de 48 horas também demonstrou certa eficácia, especialmente no tratamento T1P2S1 (500g, posição vertical), com média de $5,06 \times 10^4$ esporos/mL, que não diferiu estatisticamente do tratamento padrão. Essa resposta positiva inicial à luz pode estar relacionada ao estímulo da germinação dos conídios nas fases iniciais, como relatado por Tisch e Schmoll (2010), que apontaram adaptações metabólicas fúngicas específicas em resposta à percepção de pulsos de luz, ainda que a exposição contínua posteriormente se torne prejudicial à esporulação.

Em relação ao tipo e peso do substrato, o uso de 500g de arroz parboilizado e a posição vertical dos pacotes favoreceram a produção de clamidósporos em comparação aos tratamentos com 350g. Esse padrão foi semelhante ao observado por Memolle-Giaretta *et al.* (2014), que constataram maior rendimento esporulativo com volumes maiores de substrato, indicando que uma maior massa fornece um ambiente mais estável e nutritivo



para o crescimento fúngico. No entanto, quando associado ao fotoperíodo contínuo, mesmo o maior peso de substrato não foi suficiente para compensar o impacto negativo da luz, evidenciado a redução significativa da produção nos tratamentos T2P2S1 e T2P2S2.

Outro aspecto relevante observado foi o efeito da posição dos sacos. A posição vertical (T1P2S1) demonstrou-se mais eficiente que a posição horizontal (T1P2S2), possivelmente devido à melhor aeração e distribuição do inóculo no substrato, aspecto também relatado por Dallemolle-Giaretta *et al.* (2011), ao avaliarem o crescimento fúngico em matrizes sólidas compactadas em comparação a soltas.

A análise de qualidade tem como objetivo determinar a quantidade de esporulação, tais análises muito utilizada em testes realizados por Durazzini *et al.* (2016), que também realizou testes de esporulação em quantificação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em solo, sob diferentes cultivos de cafeeiros. Obtendo resultados que o cultivo de café em SAF favorece uma maior densidade de esporos de FMA's em comparação ao SCP. Essa diferença sugere que o manejo agroecológico do SAF contribui para a promoção de comunidades de FMA's mais abundantes. Possivelmente devido à maior diversidade de plantas hospedeiras e práticas que favorecem a biodiversidade do solo.

Portanto, os dados obtidos reforçam que o crescimento e a esporulação de *P. chlamydosporia* são altamente sensíveis às condições ambientais. A ausência de luz, o uso de substratos com maior massa e o cuidado no acondicionamento dos mesmos são fatores decisivos para maximizar a produção de clamidósporos viáveis. Adicionalmente, os resultados contribuem para o refinamento metodológico de cultivo *in vitro* desse importante agente de biocontrole, alinhando-se com a tendência crescente de adoção de bioinsumos na agricultura brasileira e global, conforme também destacado por Bettiol *et al.* (2022).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da quantidade de substrato, assim como a posição vertical, influenciou positivamente a produção de clamidósporos, Conclui - se que a manutenção de *P. chlamydosporia* em ambiente escuro é uma condição crítica para maximizar a produção de esporos viáveis.

REFERÊNCIAS

- ARANDA-MARTINEZ, Almudena., *et al.* **CAZyme content of *Pochonia chlamydosporia* reflects that chitin and chitosan modification are involved in nematode parasitism.** 11.Ed. Reino unido. Environmental Microbiology, [2016?] 3609-4305 p.
- BATISTA, Augusto Chaves; Fonseca, Ozório de Menezes Fonseca. (1965). ***Pochonia humicola* n. gen. e n. sp., uma curiosa entidade fúngica dos solos do Nordeste do Brasil.** Public Institute of Micological Recife, [1965?], 462, 1–11 p.
- BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo Augusto Boechat. **Controle Bilógico de doenças de plantas no Brasil.** Embrapa meio ambiente, São Paulo, art. [2023?]. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/579982/1/2009CL07.pdf>.



BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo Augusto Boechat. **Controle Bilógico de doenças de plantas no Brasil**. Embrapa meio ambiente, São Paulo, art. [2025?]. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/579982/1/2009CL07.pdf>.

BELLÉ, Rafael Barbieri; FONTANA, Daniele Cristina. Patógenos de solo: principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle. **Enciclopédia biosfera**, v. 15, n. 28, p. 779, [2018?]. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Daniele-Fontana/publication/329408488_PATOGENOS_DE_SOLO_PRINCIPAIS_DOENCAS_VASCULARES_E_RADICULARES_E_FORMAS_DE_CONTROLE/links/5c827204299bf1268d453da9/PATOGENOS-DE-SOLO-PRINCIPAIS-DOENCAS-VASCULARES-E-RADICULARES-E-FORMAS-DE-CONTROLE.pdf.

CARVALHO, Rui Pedro Fernandes. **Toxicidade de pesticidas sobre o fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* e seu efeito no controlo do nematode *Meloidogyne incognita***. 2020. Universidade do Minho (Portugal).

DALLEMOLE- GIARETTA, Rosangela., et al **Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, 314-321 p, [2011?]. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000200012>

DALLEMOLE- GIARETTA, Rosangela., et al **Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, 314-321 p, [2011?]. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000200012>.

DALLEMOLE-GIARETTA, Rosangela., et al. **Incorporação ao solo de substrato contendo micélio e conídios de *Pochonia chlamydosporia* para o manejo de *Meloidogyne javanica***. Ciência Rural. Rio Paranaíba, [2014?], 629-633 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000400009>.

DALLEMOLE-GIARETTA, Rosangela., et al. **Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica***. Crop Protection, Amsterdam, 102-107 p, [2012?]. Disponível em: <https://locus.ufv.br/items/642fef4b-c334-4df0-9e85-59fa1d982283>.

Disponível: <https://www.proquest.com/openview/2d6ce70e27ab78e7738984659ff3c305/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2026366&diss=y>

DA SILVA AMARAL, Lívi; ARAÚJO OLIVEIRA DE, Elder. **Biocontrole de fitonematóides: atualidades e perspectivas**. São Paulo –SP, Editora Dialética. [2021?]. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?id=OaJGEAAAQBAJ&lpg=PA73&ots=FCwPhCG_GS&dq=O%20fungo%20Pochonia%20chlamydosporia%20\(Zare%20%26%20Gams\)%2C%20anteriormente%20conhecido%20como%20Verticillium%20chlamydosporium%2C%20\(Goddard\)%20pertence%20%C3%A0%20fam%C3%ADlia%20Clavicipitaceae%2C%20na%20Ordem%20Hypocreales.%20%C3%89%20considerado%20um%20microrganismo%20antagonista%2C%20utilizado%20no%20biocontrole%20de%20fitonematoides%20formadores%20de%20galhas%20\(Meloidogyne%20spp.\)%20e%20de%20cistos%20\(Heterodera%20spp.\).%20&hl=pt-BR&pg=PA73#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?id=OaJGEAAAQBAJ&lpg=PA73&ots=FCwPhCG_GS&dq=O%20fungo%20Pochonia%20chlamydosporia%20(Zare%20%26%20Gams)%2C%20anteriormente%20conhecido%20como%20Verticillium%20chlamydosporium%2C%20(Goddard)%20pertence%20%C3%A0%20fam%C3%ADlia%20Clavicipitaceae%2C%20na%20Ordem%20Hypocreales.%20%C3%89%20considerado%20um%20microrganismo%20antagonista%2C%20utilizado%20no%20biocontrole%20de%20fitonematoides%20formadores%20de%20galhas%20(Meloidogyne%20spp.)%20e%20de%20cistos%20(Heterodera%20spp.).%20&hl=pt-BR&pg=PA73#v=onepage&q&f=false)



SANTOS, Evanny Laryssa *et al.* Impactos causados pelo uso excessivo de agroquímicos na agricultura familiar: uma revisão. **Observatório de la economía latinoamericana**, v. 22, n. 3, p. e3746-e3746, 2024.

EMBRAPA. Controle Biológico cresce na América Latina, impulsionando por agentes microbianos e políticas públicas, mas enfrenta desafios estruturais. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/102089364/controlado-biologico-cresce-na-america-latina-impulsionado-por-agentes-microbianos-e-politicas-publicas-mas-enfrenta-desafios-estruturais>

ETHUR, Luciana, Zago., *et al.* **Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas.** Ciência Rural, Santa Maria, [2007?]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/y8WRNGxWKs3sj7bVvtQNHLL/?format=pdf&lang=pt>

EVANS, Harry, C.; KIRK, Paul. M. **Systematics of *Pochonia*. Perspectives in sustainable nematode management through *Pochonia chlamydosporia* applications for root and rhizosphere health.** 1.ed. Editora Springer Cham, 21–43 p, [2017?]. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-59224-4_2

FERNANDES, Rafael Henrique., *et al.* ***Pochonia chlamydosporia* E *Bacillus subtilis* NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* EM MUDAS DE TOMATEIRO.** Journal of Nematology, Uberlandia, v. 49, n. 2, p. 201–210, [2017?]. Disponível em: <https://doi.org/10.21307/jofnem-2017-101>.

FERNANDES, Rafael Henrique., *et al.* ***Pochonia chlamydosporia* E *Bacillus subtilis* NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* EM MUDAS DE TOMATEIRO.** Journal of Nematology, Uberlandia, v. 49, n. 2, p. 201–210, [2017?]. Disponível em: <https://doi.org/10.21307/jofnem-2017-101>

FILHO, Evoneo Berti; MACEDO, Luciano Pacelli Medeiros. **FUNDAMENTOS DE CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGA.** IFRN, Natal, [2011?]. Disponível em: <https://memoria.ifrn.edu.br/bitstream/handle/1044/1065/Fundamentos%20de%20Controle%20Biologico%20de%20Insetos-Praga%20-%20Ebook.pdf?sequence=1>

FONTES, Eliana Maria Gouveia; INGLIS-VALADARES, Maria Cleria. **CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS DA AGRICULTURA.** Embrapa, Distrito Federal, [2020?], 510p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>

FRANCO, Thaís Cristina *et al.* Seleção de bactérias promotoras do crescimento vegetal produtos de enzimas: Efeito na retenção de resíduos orgânicos. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 11, n. 3, pág. e55111327037-e55111327037, 2022.

FRASSY, Luiza Neme *et al.* Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 102-104, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000100024>



GHAHREMANI, Zahra et al. *Pochonia chlamydosporia* é a espécie fúngica mais prevalente responsável pela supressão de *Meloidogyne* em sistemas sustentáveis de produção de vegetais. **Sustainability**, v. 14, n. 24, p. 16941, 2022.
<https://ciorganicos.com.br/wp-content/uploads/securepdfs/2024/10/ciorganicos-Bioinsumos-a-partir-das-contribuicoes-da-Agroecologia-Embrapa-20241002-142257.pdf>

KERRY, B. R. **Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/9780851993560.0155>

LOPEZ, Ueder P; MICHEREFF, Sami J; **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. 1.ed. Editora Universitaria da UFRPE, Recife, [2018?], 208 p. Disponível em:
[https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1095701/1/LivroCORRIGIDODesafiosManejoDoencasRadiculares.pdf](https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1095701/1/LivroCORRIGIDO%20DesafiosManejoDoencasRadiculares.pdf).

MANZANILLA- LOPÉS, Rosa H., et al. ***Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes**. Journal of Nematology. v. 45, n.1, 2013. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3625126/>.

MANZANILLA- LOPÉS, Rosa H., et al. ***Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes**. Journal of Nematology. v. 45, n.1, 2013.

MELO, Itamar Soares de; AZEVEDO, João Lucio de. **Controle Biológico**. Jaguariuna – SP, Embrapa meio ambiente. Disponível em: [file:///C:/Users/onfar/Downloads/Melo-controleV2-3536%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/onfar/Downloads/Melo-controleV2-3536%20(1).pdf)
DI PIERO, Robson Marcelo; FELIPINI, Ricardo Barbosa. Simpósio sobre Controle Biológico na Agricultura. [2022?]. Disponível em:
<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/240439>

SERRA, Emanuele Figueiredo., et al. **FUNGOS PREDADORES DE NEMATÓIDES EM AMOSTRAS DE SOLO DO MUNICÍPIO DE ALEGRETE-RS**. Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária/MICVET, Capão do Leão, [2016?], 21-34 p. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/index.php/veterinaria/article/download/9135/7194>.

TISCH, Doris; SCHMOLL, Monika. **Light regulation of metabolic pathways in fungi**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 85, p. 1259–1277, [2010?].
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2320-1>.

TISCH, Doris; SCHMOLL, Monika. **Light regulation of metabolic pathways in fungi**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 85, p. 1259–1277, [2010?].
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2320-1>.

VENZON, Madelaine., et al. **Agrobiodiversidade como estratégia de manejo de pragas**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.40, n.305, [2019?], p.21-29, Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Gabriel-Pantoja-4/publication/340487841_Agrobiodiversidade_como_estrategia_de_manejo_de_pragas/lin



[ks/5e8c8a2f299bf13079843c19/Agrobiodiversidade-como-estrategia-de-manejo-de-pragas.pdf](https://doi.org/10.24057/revcam.v1n1.2026.ks/5e8c8a2f299bf13079843c19/Agrobiodiversidade-como-estrategia-de-manejo-de-pragas.pdf)

VIDAL, Mariane Carvalho; DIAS, Rogerio Pereira. Bioinsumos a partir das contribuições da agroecologia. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 18, n. 1, p. 171-192, 2023. Disponível: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1151844/1/Vidal-e-Dias.-Bioinsumos-a-partir-das-construicoes-da-agroecologia.-RBA.pdf>.

VIGGIANO, José Ricardo; FREITAS, Leandro Grassi de; FERREIRA, Paulo Afonso. **Resíduo da produção de Pochonia chlamydosporia no desenvolvimento de mudas e plantas de alface. Pesquisa Agropecuária Brasileira**, viçosa MG, v. 47, p. 983-990, 2012. Disponível: <https://www.scielo.br/j/pab/a/9R9kZGHhQ5YhSwx3cVd7Pgz/?lang=pt&format=pdf>

WILLCOX, J.; TRIBE, H. T. **Fungal parasitism in cysts of *Heterodera*: I. Preliminary investigations**. Transactions of the British Mycological Society, Londres, v. 62, n. 3, p. 585-IN3, [1976?].

ZARE, R.; GAMS, W.; EVANS, H. C. **A revision of *Verticillium* section Prostrata. V. the genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora***. Nova Hedwigia. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1127/nova.hedwigia/73/2001/51>. Acesso em: 20 out. 2024.