

Grau de viabilidade do agente de controle *Pochonia chlamydosporia* no produto comercial em três diferentes datas de validade.

CARLOS SHOITI WATANABE¹; GIOVANI DA SILVA ALMEIDA¹; JOÃO PEDRO DE SOUZA PORTO¹; ALEXANDRE DE MOURA GUIMARÃES²; SUSI MEIRE MAXIMINO LEITE²

¹ Discentes em Mecanização em Agricultura de Precisão na FATEC Pompeia “Shunji Nishimura”, Pompeia - SP, E-mail: carlos.watanabe@fatec.sp.gov.br

² Docentes do curso de Mecanização em Agricultura de Precisão, FATEC Pompeia, Pompeia-SP.

RESUMO: Dentro da agricultura atual, há diversos meios de manejo de pragas, doenças e plantas daninhas, principalmente o controle químico, com o objetivo de evitar perdas de produtividade. Porém, o manuseio incorreto destes produtos acarreta pontos negativos tanto para o produtor, quanto ao consumidor. Devido aos problemas recorrentes deste método de manejo, houve uma maior demanda por métodos alternativos de controles fitossanitários, fortalecendo o mercado de defensivos biológicos. Mas este tipo de produto normalmente exige cuidados maiores no armazenamento (por exemplo, resfriamento), além de menor tempo de prateleira em relação aos defensivos químicos. Diante disso, o presente trabalho analisou o grau da viabilidade do agente de controle *Pochonia chlamydosporia* na formulação comercial Rizotec®, armazenada em temperatura ambiente, em três diferentes validades, com datas de vencimento nos anos de 2019, 2021, 2022. Os resultados obtidos mostraram significativa perda gradativa da viabilidade da *Pochonia chlamydosporia* com o passar do tempo.

Palavra-chaves: Tempo de prateleira, “shelf life”, Controle biológico, Nematicida.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de grão do mundo e é reconhecido por sua competitividade. Segundo a IBGE (2020), o desempenho do setor vem se destacando nas últimas quatro décadas (de 1975 a 2019), o que pode ser observado pela produção de grãos que passou de 38,1 para 232,6 milhões de toneladas, um aumento de 501% neste período. Porém, o aumento da produção não representou crescimento na mesma ordem da área plantada, esse aumento se deu especialmente na produtividade sendo alavancada pelo maior uso de técnicas de cultivo mais adequadas, mas também de insumos, entre eles, os defensivos agrícolas (EMBRAPA, 2022).

O aumento do consumo de defensivos químicos pode acarretar diversos problemas, como por exemplo a contaminação no meio ambiente, gerar pragas resistentes e principalmente afetar a saúde dos consumidores e trabalhadores desse ramo. Segundo a EMBRAPA (2022), a utilização desses produtos pode gerar contaminação dos trabalhadores rurais em diversos graus, gerando um problema de saúde pública. Em relação aos riscos dos agrotóxicos para o meio ambiente, as novas tecnologias do campo são importantes, entretanto os riscos dos agrotóxicos para o meio ambiente envolvem drásticas contaminações e afetam a biodiversidade, a contaminação de águas, contaminação do solo, contaminação por volatilização e impactos em organismos não alvo (CANALAGRO, 2019).

Uma alternativa ao uso de defensivos químicos é o uso de defensivos com base no controle biológico, mas este mercado ainda é pequeno, apesar do expressivo crescimento nos últimos anos. Os principais motivos que dificultaram o avanço do mercado dos biológicos eram os elevados preços de venda necessários para recuperar os custos (GLARE, 2012, apud NAKAMURA, 2014). Do ponto de vista do agricultor, de acordo com a pesquisa de Samuel e Graham (2003), o fator que representa a menor adesão aos defensivos biológicos seriam: preço mais alto; não credibilidade nesses produtos; falta de informação de como implantar o produto; nunca terem utilizados esses métodos e não encontram o produto correto (LENG, 2014,). Porém a indústria vem trabalhando com força neste aspecto com investimentos em pesquisa e de formulação (AGROLINK, 2022).

A importância da preservação da qualidade dos defensivos agrícolas, inclusive os biológicos, seja no transporte como no armazenamento, assim, NBR 9843, da ABNT, estabelece as exigências para o armazenamento adequado destes produtos, visando garantir a qualidade do produto e a prevenção de acidentes (EMDAGRO, 2019).

Apesar das dificuldades iniciais citadas acima, a ocorrência cada vez mais frequente de pragas resistente, a pressão do mercado e da sociedade para uma alternativa ao uso de defensivos químicos tem impulsionado pesquisas e melhorias nos produtos biológicos com isso os resultados estão surgindo. Uma pesquisa realizada pela Spark Inteligência Estratégica e divulgada pela CNA Brasil (SENAR, 2022) aponta alta de 37% no volume do mercado de bioinsumos na safra 2020/2021 em relação ao ciclo

anterior. Segundo esta mesma fonte, o incremento no mercado de soluções biológicas foi de 40% ao ano entre as safras 2018/2019 e 2020/2021, o que deixa evidente a importância destes produtos como ferramentas de manejo nas principais culturas agrícolas.

Dentre os produtos biológicos comercializados, os mais comumente utilizados são os com composição de fungos para esses produtos, um grande exemplo é o fungo *Pochonia chlamydosporia*, que é um dos agentes de controle biológico estudados contra nematóides (HAHN et al., 2018 apud SCHWENGBER, 2020). Segundo Kerry (2001) este fungo é responsável pelo parasitismo de meios de procriação em fêmeas de nematoides. O fungo é capaz de sobreviver na rizosfera de espécies de plantas e matéria orgânica e, com essa fonte de nutrientes, é capaz de se isolar no solo por semanas após sua aplicação (STIRLING, 1991; BOURNE et al., 1996; VIAENE & ABAWI, 2000; DALLEMOLE-GIARETTA, 2008, apud PODESTA, 2009), de se estabelecer no solo, mesmo com a ausência de nematoides (Kerry, 2001), e desenvolver a colonização nas raízes das plantas (Hidalgo-Díaz et al., 2000; Lopez-Llorca et al; 2002; Monfort et al., 2005; Dallemole-Giaretta, 2008, apud COUTINHO, 2009).

Dentre a dificuldade na utilização desses produtos estão o menor tempo de prateleira e dificuldades de armazenamento (COPPING; MENN, 2000, apud NAKAMURA, 2014), sendo uma das justificativas para isto o fato de que se trata de produtos à base de organismos vivos o que leva a cuidados também em relação ao transporte e armazenamento e às práticas de manuseio desses produtos.

Devido a relevância do assunto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade do agente de controle *Pochonia chlamydosporia* na formulação de Rizotec® em três diferentes datas de validade.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Química e no Laboratório de Fitossanidade da Faculdade de Tecnologia "Shunji Nishimura" de Pompeia, localizada

na Avenida Fundação Shunji Nishimura, 605 - Distrito Industrial, Pompeia - SP, no ano de 2022

Como fonte do agente de controle utilizou-se a formulação de Rizotec® Cepa PC 10280, lotes 0066-18-1000, 0075-2020-922 e 32609. De acordo com as instruções da bula, o produto deve ser utilizado dentro do prazo de sete meses da data de fabricação e armazenado em um ambiente com a temperatura entre 19 e 21°C. Para melhores resultados foram feitos três tratamentos, ou seja, foram realizados teste com o mesmo produto, porém com datas de validade diferentes (Tabela 1). Os três lotes analisados foram acondicionados em temperatura ambiente por todo o período após sua aquisição.

Tabela 1 - Informações técnicas do produto comercial (Rizotec®) em diferentes datas de validade.

Tratamentos	Composição	Validade	Lote	Tempo até o ano do experimento
Tratamento 1	Rizotec	2019	0066-18-1000	3 anos e 7 meses
Tratamento 2	Rizotec	2021	0075-2020-922	1 ano e 3 meses
Tratamento 3	Rizotec	2022	32609	Dentro da validade

Fonte: Elaborada pelos autores (2022).

Para promover o crescimento da *Pochonia chlamydosporia* utilizou-se meio BDA (Batata Dextrose Agar), como sugerido por Ceiro et al. (2014) que, assim como a solução salina 0,85%, foi autoclavada a 1 atm. por 30 minutos. As vidrarias utilizadas foram esterilizadas a seco a 170°C por 3 horas.

Para facilitar a avaliação do crescimento da *Pochonia chlamydosporia*, realizou-se a diluição em série do produto comercial (p.c.) que apresentava concentração de $5,2 \times 10^7$ clamidósporos g^{-1} (280 g de clamidósporos kg^{-1} do p.c.) até obtenção da concentração de $5,2 \times 10^2$ clamidósporos mL^{-1} , sendo a diluição realizada com solução salina 0,85% esterilizada em autoclave.

Após a solidificação do meio de cultura vertido nas placas de Petri previamente esterilizadas, procedeu-se a adição de 1 ml da calda devidamente homogeneizada e o espalhamento da mesma sobre o meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski.

Logo após esta etapa, as placas foram acondicionadas em câmara de crescimento (BOD) na ausência de luz, à 26,5°C por ao menos 3 dias.

O delineamento estatístico adotado foi inteiramente casualizado com 10 repetições para cada tratamento, perfazendo um total de 30 parcelas. Para avaliar o crescimento da *Pochonia chlamydosporia* nas placas aos 3 dias, foi realizada a contagem do número de colônias formadas em cada placa. Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Willk, transformados por $\sqrt{(x+0,5)}$ e submetidos à Análise de Variância e teste de médias Scott-Knott à 5% de significância através do software SISVAR versão 5.8 (FERREIRA, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos quanto a quantidade de colônias desenvolvidas, nos lotes analisados nos anos de 2019, 2021 e 2022 podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Número médio de colônias do fungo *Pochonia chlamydosporia* na formulação Rizotec® em diferentes datas de validade.

TRATAMENTOS	Médias/Nº colônias*
Ano19	1,5227 c
Ano21	2,4169 b
Ano22	3,4648 a
CV (%)	36.28

*Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Houve diferença significativa no crescimento de colônias de *Pochonia chlamydosporia* nas três diferentes validades (2019, 2021 e 2022), mostrando a perda da viabilidade do agente de controle ao longo do tempo.

O número de colônias variou de acordo com as médias, no caso da análise do ano 2019 houve crescimento médio de 1,522 colônias, em seguida no ano de 2021 com 2,416 e por fim 2022 obteve-se o valor de 3,464 de colônias. Nos resultados obtidos foi observado perda de potencial de crescimento de 56,05% entre os lotes com vencimento em 2019 e 2022, já, entre os anos 2021 e 2022 esta perda foi de 30,24%. Embora estas perdas sejam significativas, ainda há potencial de uso das formulações vencidas,

através da dose determinada de 1,5kg/ha do produto comercial, será necessário a correção da dose para 2,34kg/ha em relação ao produto comercial do ano de 2019, já no ano de 2021, há uma correção de 1,95kg/ha, podendo ser corrigida a dose do produto a ser utilizada nestas proporções da perda de sua viabilidade.

CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos, pode-se concluir que há perda significativa do número de células viáveis do fungo, mas com potencial de uso do produto mesmo após o vencimento desde que seja feito um ajuste da dose

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus, que nos proporciona saúde e forças. Em Segundo os familiares por sempre nos apoiar nos estudos. Agradecemos a Prof^a. Dr^a. Susi Meire Maximino Leite por aceitar ser a orientadora desse projeto e o Prof. Dr. Alexandre de Moura Guimarães por aceitar ser nosso coorientador. Agradecemos a instituição FATEC e a Fundação Shunji Nishimura por todo suporte e disponibilidade de material e local para a realização do experimento. Agradecemos aos alunos Alan Leite, Matheus Pedpala, Otavio Vieira, amigos e colegas de classe, por auxiliar na confecção do experimento e pelo apoio. Agradecemos ao auxiliar docente Jean Carlo por todo auxílio nas atividades laboratoriais e todos os docentes que nos auxiliaram com dicas didáticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGÊNCIA IBGE - NOTÍCIAS. **Área agrícola cresce em dois anos e ocupa 7,6% do território nacional**, 26 mar. 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/27207-area-agricola-cresce-em-dois-anos-e-ocupa-7-6-do-territorio-nacional>. Acesso em: 12 set. 2022.

AGROLINK. **Formulação aumenta tempo de prateleira de biológicos**, 12 jan. 2022. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/formulacao-aumenta-tempo-de-prateleira-de-biologicos_460919.html. Acesso em: 12 set. 2022.

BOURNE, J.M., B.R. KERRY & F.A.A.M. DE LEIJ. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 539-548.

CANALAGRO. 4 impactos dos agrotóxicos no meio ambiente. **Saúde no Campo**, CanalAgro, 20 ago. 2019. Disponível em: <https://summitagro.estadao.com.br/saude-no-campo/agrotoxicos-da-agricultura-moderna-e-seus-impactos-no-meio-ambiente/>. Acesso em: 12 set. 2022.

CEIRO, W. G. *et al.* Efeito das concentrações de NaCl no crescimento micelial e esporulação de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare e Gams em meio BDA e solo. **Revista de Protección Vegetal**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 122-127, 2014. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522014000200007&script=sci_arttext&lng=en. Acesso em: 20 out. 2022.

COPPING, L.G.; MENN, J.J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.

COUTINHO, M. M. *et al.* **Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e Farinha de Sementes de Mamão**, ano 2009, v. 33, p. 170-172, 26 maio 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Everaldo-Lopes/publication/242757770_Controle_de_Meloidogyne_javanica_com_Pochonia_chlamydosporia_e_Farinha_de_Sementes_de_Mamao/links/0f31753a9c3087b736000000/Controle-de-Meloidogyne-javanica-com-Pochonia-chlamydosporia-e-Farinha-de-Sementes-de-Mamao.pdf. Acesso em: 12 set. 2022.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. 2008 Isolamento e identificação de *Pochonia chlamydosporia* de solos infestados com *Meloidogyne* spp. e avaliação do potencial de controle de *M. javanica* e de promoção de crescimento de tomateiro (Tese de Doutorado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 132 p.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. 2008. Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 83 p.

EMBRAPA *et al.* **Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas**. [S. l.: s. n.], 2016. 853 p. v. 01. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1059897>. Acesso em: 8 out. 2022.

EMBRAPA. A agricultura brasileira, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/vii-plano-diretor/a-agricultura-brasileira>. Acesso em: 12 set. 2022.

EMDAGRO. **NBR 9843 - 1**, 2019. Disponível em: <https://www.emdagro.se.gov.br/wp-content/uploads/2021/02/NBR-9843-2019-ARMAZENAMENTO-DE-AGROTOXICOS.pdf>. Acesso em: 20 out 2022.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista brasileira de biometria**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019. Disponível em: <http://www.biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450>. Acessado em: 15 out. de 2022.

GLARE, T. *et al.* Have biopesticides come of age? Trends in biotechnology, v. 30, n. 5, p. 250-258, 2012.

HAHN, M. H.; *et al.* Levantamento bibliométrico de fungos nematófagos no controle dos nematoides das galhas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 17, n. 4, p. 389–397, 2018. Disponível em: <http://saber.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/19098/13857>>. Acesso em: 13 out 2022.

HIDALGO-DÍAZ, L., J.M. BOURNE, B.R. KERRY & M.G. RODRÍGUEZ. 2000.

Nematophagous *Verticillium* spp. in soil infested *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management*, 46(4): 277-284.

KERRY, B.R. 2001. **Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**. In: BUTT, T.M., C. JACKSON & N. MAGAN (ed). *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CAB International, Wallingford - UK, p. 380. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=YoZDTvenmvUC&oi=fnd&pg=PA155&dq=Exploitation+of+nematophagous+fungal+Verticillium+chlamydosporium+Goddard+for+the+biological+control+of+root-knot+nematodes+\(Meloidogyne+spp.&ots=QjX-mNBv4O&sig=OGOzrvYwSpSx5837J0o4Y-aLcAs](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=YoZDTvenmvUC&oi=fnd&pg=PA155&dq=Exploitation+of+nematophagous+fungal+Verticillium+chlamydosporium+Goddard+for+the+biological+control+of+root-knot+nematodes+(Meloidogyne+spp.&ots=QjX-mNBv4O&sig=OGOzrvYwSpSx5837J0o4Y-aLcAs). Acesso em: 12 out 2022.

LENG, P. *et al.* Applications and development trends in biopesticides. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 86, p. 19864-19873, 2014. Disponível em: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/99172/88473>>. Acesso em: 12 set. 2022.

LOPEZ-LLORCA, L.V., J.J. BORDALLO, J. SALINAS, E. MONFORT & M.L. LÓPEZ-SERNA. 2002. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium*. *Micron*, 33: 61-67.

MONFORT, E., L.V. LOPEZ-LLORCA, H.B. JANSSON, J. SALINAS, JA ON PARK & K. SIVASITHAMPARAM. 2005. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. *Soil Biology & Biochemistry*, 37: 1229-1235.

NAKAMURA, C. S. **USO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS BIOLÓGICOS: UMA ANÁLISE TÉCNICA E DE MERCADO**. 2014. 34 p. Trabalho de Graduação (Graduação do curso de Engenharia Bioquímica) - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA, 2014. Disponível em: <https://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/monografias/2014/MBI14004.pdf>. Acesso em: 12 set. 2022.

PODESTA, G. S. *et al.* **Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em Solo Natural ou Autoclavado sobre *Meloidogyne javanica***. Viçosa, MG, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Everaldo-Lopes/publication/288195254_Atividade_nematofaga_de_Pochonia_chlamydosporia_em_solo_natural_ou_autoclavado_sobre_Meloidogyne_javanica/links/582f56e608ae138f1c0355e2/Atividade-nematofaga-de-Pochonia-chlamydosporia-em-solo-natural-ou-autoclavado-sobre-Meloidogyne-javanica.pdf. Acesso em: 12 set 2022.

RIZOFLORA BIOTECNOLOGIA. **Rizotec® [Bula]**. [S.l.], [2020]. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-10/rizotec.pdf. Acesso em: 20 set 2022.

SCHWENGBER, R. P.. ***Pochonia chlamydosporia*: potencial no controle de *Meloidogyne javanica* em soja**. 2020. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2020. Disponível em: http://repositorio.uem.br:8080/jspui/bitstream/1/6572/1/Raiane%20Pereira%20Schwen gber_2020.pdf. Acesso em: 13 out 2022.

SENAR. **O futuro é biológico**. SENAR, 4 fev. 2022. Disponível em: <https://cnabrazil.org.br/noticias/o-futuro-e-biologico>. Acesso em: 13 out. 2022.

STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, Problems and Prospects. CAB International, Wallingford - UK, 282 p.

VIAENE, N.M. & G.S. ABAWI. 2000. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. *Journal of Nematology*, 32 (1): 85-100.