

Efeito do estresse hídrico na produção de esporos de *Clonostachys rosea* em grãos de arroz.

Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira; Kátia de Lima Nechet; Elen Ribeiro dos Santos; Marcelo Augusto Boechat Morandi

Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340, km 127,5 caixa postal 69, Jaguariúna, SP, 13820-000. E-mail: halfeld@cnpmma.embrapa.br; nechet@cnpmma.embrapa.br; elen@cnpmma.embrapa.br; mmorandi@cnpmma.embrapa.br

RESUMO

De modo geral, a produção massal de fungos utilizados para controle biológico é realizada em grãos embebidos em água. Entretanto, a adição de solutos à água e o efeito da restrição hídrica no aumento da concentração de esporos de *Clonostachys rosea* em grãos de arroz não tem sido investigada, o que constitui o objetivo deste trabalho. Os tratamentos foram constituídos por 200 g de arroz acondicionados em sacos de polipropileno e embebidos por 24 h em 200 ml de soluções de NaCl, KCl e sacarose, com concentrações correspondentes a potenciais osmóticos de -0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa. A concentração de esporos foi determinada aos 6 e 16 dias após a inoculação dos grãos. Verificou-se que as soluções de KCl e sacarose proporcionaram maior aumento na produção de conídios, porém sem indícios deste ter sido promovido somente pelo efeito do estresse hídrico.

Palavras-chave: *Clonostachys rosea*; produção massal; formulação; potencial osmótico; restrição hídrica.

ABSTRACT

The effect of hydric stress on spore production of *Clonostachys rosea* in white rice grains.

The mass production of biological control fungi is usually performed in water-soaked grains. However, the solutes addition to water and the capability of hydric restriction on increase of *Clonostachys rosea* spore concentration when produced in white rice grains has not been investigated and constitutes the purpose of this research. Treatments were conducted using 200 g white rice grains, packed in polypropylene bags and soaked for 24 h in 200 ml NaCl, KCl and sucrose solutions, with concentrations corresponding to -0.4, -0.6, -0.8 and -1.0 MPa water potentials. The spore concentration was determined at 6 and 16 days after inoculation. Grains soaked in KCl and sucrose solutions presented an increase in conidial production, however, with no indicative of a direct effect of hydric stress in sporulation.

Keywords: *Clonostachys rosea*; mass production; formulation; osmotic potential; water restriction.

INTRODUÇÃO

A produção massal de agentes de controle biológico em substratos de baixo custo e curto período de tempo é um fator que apresenta impacto na cadeia comercial de agentes de biocontrole, ocasionando a redução de custos e maior escala de produção. De modo geral, os fungos utilizados para controle biológico, como *Clonostachys rosea*, são cultivados massalmente em grãos, como o arroz, embebidos em água para sua hidratação (Viccini, et al., 2007), porém o efeito da restrição hídrica embebendo-se os grãos em soluções com diferentes potenciais osmóticos não tem sido investigado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se a restrição hídrica promove o aumento da produção de esporos de *C. rosea*, utilizando grãos de arroz como substrato.

MATERIAL E MÉTODOS

Os tratamentos foram constituídos por 200 g de arroz beneficiados embebidos por 24 h em 200 ml de soluções de NaCl, KCl e sacarose, com concentrações correspondentes a potenciais osmóticos de -0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa (Michel & Radcliffe, 1995). Como tratamento controle foi utilizado somente água destilada. Após a embebição, o material foi transferido para peneira plástica, acondicionado em sacos de polipropileno de 30 x 40 cm e esterilizado em autoclave. A inoculação dos grãos para cada tratamento foi feita adicionando-se 5 ml de uma suspensão de esporos de *C. rosea* (isolado LQC 62), ajustada à concentração de $3,4 \times 10^7$ conídios.ml⁻¹. O material foi mantido em sala de incubação a 25 °C, com 14 h de fotoperíodo. A primeira avaliação foi realizada 6 dias após a inoculação, transferindo-se três amostras de 1 g de arroz colonizado de cada tratamento para tubos de ensaio contendo 4 ml de água destilada. Em seguida procedeu-se a agitação dos tubos por 10 s em agitador Phoenix AP 56 em nível 2 de rotação. A determinação das concentrações de conídios.g de massa fresca foi realizada em câmara de Neubauer. Nove dias após, foi realizado um recorte de 12 x 9 cm em uma das faces dos sacos plásticos e fixada uma folha de papel de filtro autoclavado com 13 x 10 cm, retornando o material para a sala de incubação. Aos 16 dias após a inoculação foi realizada uma segunda avaliação, da mesma forma descrita anteriormente, diferindo somente pela adição de 10 ml de água destilada nos tubos de ensaio. Nesta ocasião, foram também tomados 15 g de cada material, levando-se à estufa a 60 °C por 4 dias para determinação da massa seca. Os dados foram analisados por meio de regressões, com o programa SigmaPlot 11 e por análise de variância e testes de média, por meio do programa SAS 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostram que, aos seis dias após a inoculação dos grãos de arroz houve efeito das diferentes concentrações dos solutos na esporulação do fungo, em ajuste quadrático (Figura 1). Os potenciais osmóticos preditos para cada soluto, que permitem obter uma concentração máxima

de esporos foram: NaCl= -0,63 MPa; KCl= -0,69 MPa; sacarose= -0,90 MPa. Porém, apenas KCl e sacarose tiveram concentração de esporos predita para esses potenciais osmóticos estatisticamente diferente da testemunha (teste t, $p \leq 0,05$), em que a sacarose proporcionaria um aumento na concentração de esporos na ordem de 128%, enquanto o KCl de 15%, em relação à média da concentração observada na testemunha. Já aos 16 dias após a inoculação foi verificado um aumento significativo na produção de esporos em relação aos seis dias (teste t, $p \leq 0,05$). Logo, um período maior de incubação resultou em maior número de esporos produzidos. A umidade média dos grãos nesse estágio foi de 18% BU, com desvio padrão de 3%. Entretanto, não foi possível ajustar um modelo das concentrações de conídios em função dos potenciais osmóticos, já que os valores de concentração apresentaram pouca variação. Porém, os testes de média esquema fatorial demonstraram que, da mesma forma que a avaliação da esporulação aos seis dias após a inoculação, o tratamento contendo NaCl como soluto foi o que proporcionou menor produção de esporos, enquanto a sacarose e KCl proporcionaram maior concentração de esporos.g⁻¹ de matéria seca (Tabela 1). Um fato interessante é que nessas condições, o efeito da concentração de soluto na esporulação foi alterado, já que, para sacarose, a concentração de esporos produzidos é estatisticamente a mesma, independente do potencial osmótico que esse soluto proporciona. Quando comparados apenas com a testemunha, verifica-se novamente que o KCl e a sacarose são os solutos que proporcionam maior aumento na produção de conídios (Tabela 2), em que KCl promoveu um aumento médio de 137% na concentração de esporos, quando consideradas as concentrações significativamente diferentes da testemunha. Já a sacarose proporcionou um aumento médio na concentração de esporos na ordem de 124%, praticamente mantendo-se o percentual de aumento observado na primeira avaliação. Os resultados demonstram que a adição de sacarose ou KCl à água de embebição pode constituir um método simples para aumentar a produção de esporos, entretanto, não há indícios deste incremento ser proporcionado somente pelo efeito do estresse hídrico, já que os tratamentos utilizando NaCl não proporcionaram aumento em comparação à testemunha.

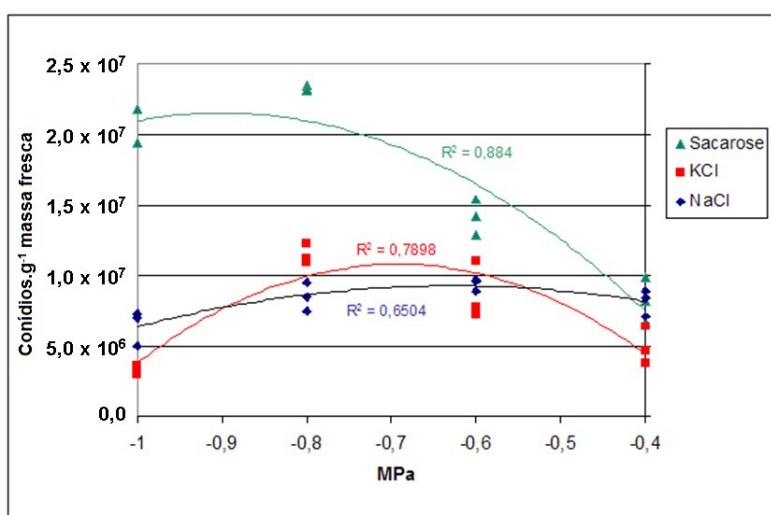


Figura 1- Concentração de esporos de *C. rosea* produzidos aos seis dias após a inoculação de grãos de arroz embebidos em soluções de NaCl, KCl e sacarose, em concentrações que conferem potenciais osmóticos de -0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2011. *C. rosea* spore concentration at six days after inoculation of white rice grains soaked in NaCl, KCl and sucrose solutions, corresponding to -0.4, -0.6, -0.8 and -1.0 MPa water potentials. Jaguariúna, Embrapa Environment, 2011.

Tabela 1- Contrastes entre tratamentos para concentração de esporos de *C. rosea* (conídios.g⁻¹ de massa seca) produzidos aos 16 dias após a inoculação de grãos de arroz embebidos em soluções de NaCl, KCl e sacarose, com potenciais osmóticos de -0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2011. Treatment contrasts for *C. rosea* spore concentration at 16 days after inoculation of white rice grains soaked in NaCl, KCl and sucrose solutions, corresponding to -0.4, -0.6, -0.8 and -1.0 MPa water potentials. Jaguariúna, Embrapa Environment, 2011.

| Tratamento | NaCl | KCl | Sacarose | CV |
|-------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|----|
| -0,4 | 3,4 x 10 ⁷ Ab | 9,6 x 10 ⁷ Aa | 8,1 x 10 ⁷ Aa | 10 |
| -0,6 | 2,3 x 10 ⁷ Bc | 5,6 x 10 ⁷ Cb | 7,0 x 10 ⁷ Aa | 6 |
| -0,8 | 4,3 x 10 ⁷ Ab | 8,3 x 10 ⁷ ABa | 8,1 x 10 ⁷ Aa | 18 |
| -1,0 | 4,2 x 10 ⁷ Ab | 6,9 x 10 ⁷ BCa | 8,1 x 10 ⁷ Aa | 16 |
| CV | 10 | 12 | 14 | |

Médias seguidas pela mesma letra diferem significativamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) onde: letras maiúsculas indicam os contrastes no sentido da coluna, letras minúsculas no sentido da linha. Means with no common uppercase letter differ significantly in same column and in lowercase letter in same row by Tukey test ($p \leq 0.05$).

Tabela 2- Contrastes entre tratamentos e a testemunha para concentração de esporos de *C. rosea* (conídios.g⁻¹ de massa seca) produzidos aos 16 dias após a inoculação de grãos de arroz embebidos em soluções de NaCl, KCl e sacarose, com potenciais osmóticos de -0,4; -0,6; -0,8 e -1,0 MPa. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2011. Contrasts between treatments and control for *C. rosea* spore concentration at 16 days after inoculation of white rice grains soaked in NaCl, KCl and sucrose solutions, corresponding to -0.4, -0.6, -0.8 and -1.0 MPa water potentials. Jaguariúna, Embrapa Environment, 2011.

| Tratamento | NaCl | KCl | Sacarose |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| -0,4 | 3,4 x 10 ⁷ | 9,6 x 10 ^{7**} | 8,1 x 10 ^{7**} |
| -0,6 | 2,3 x 10 ^{7**} | 5,6 x 10 ⁷ | 7,0 x 10 ^{7**} |
| -0,8 | 4,3 x 10 ⁷ | 8,3 x 10 ^{7**} | 8,1 x 10 ^{7**} |
| -1,0 | 4,2 x 10 ⁷ | 6,9 x 10 ^{7**} | 8,1 x 10 ^{7**} |
| Testemunha | 3,5 x 10 ⁷ | 3,5 x 10 ⁷ | 3,5 x 10 ⁷ |
| CV | 10 | 13 | 15 |

Médias assinaladas com ** diferem significativamente da testemunha pelo teste Dunnett ($p \leq 0,05$). Means assigned with ** are significantly different for the control by Dunnett test ($p \leq 0.05$).

LITERATURA CITADA

MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal* 87:126-130, 1995.

VICCINI, G.; MANNICH, M.; CAPALBO, D.M.F.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.; MITCHELL, D.A. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry* 42:275-278, 2007.