

ANTAGÔNISMO *IN VITRO* DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. CONTRA ISOLADOS DE *Aspergillus* spp. PRODUTORES DE AFLATOXINAS EM CASTANHA DO BRASIL

HYANAMEYKA EVANGELISTA DE LIMA-PRIMO¹; DAYSE CRISTINA DE MELO LINS²;
JAWADE BANDEIRA ISMAEL FILHO³; GIOVANNI RIBEIRO DE SOUZA⁴; PATRÍCIA
GOMES DUTRA⁵

INTRODUÇÃO

As micotoxinas são contaminantes naturais produzidas por fungos, que podem ter efeitos adversos para a saúde. Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas (AFs) são as mais referenciadas em CB, pois são bastante estudadas devido ao seu risco potencial tóxico (KLICH, 2009). O fungo predominante associado a amêndoas de castanha-do-brasil (CB) têm sido *Aspergillus* spp., especialmente espécies da Secção *Flavi*, que produzem AFs. Atualmente, as exportações de CB estão seriamente comprometidas, pois a produção brasileira de CB tem sido afetada por uma crescente contaminação por AFs. A introdução da regulamentação europeia tem realçado a necessidade de se investigar modos de redução da contaminação por AFs em CB, para assegurar a segurança sanitária deste produto (VAN EGMOND et al., 2007). O controle biológico de fungos produtores de micotoxinas em CB apresenta-se como uma alternativa viável.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são de grande importância econômica para a agricultura, pois possuem amplas possibilidades para aplicação, tanto no biocontrole de patógenos foliares, quanto no de patógenos radiculares, podendo atuar também como promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças (MOHAMED e HAGGAG, 2006). Algumas linhagens de *Trichoderma* spp. são capazes de produzir enzimas que degradam paredes celulares de outros fungos e produzem também substâncias antifúngicas. Além disso, certos isolados apresentam resistência a fungicidas, característica que os fazem potenciais agentes biorremediadores (RESENDE et al., 2004). Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antagônico *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. contra espécies de *Aspergillus* produtoras de micotoxinas em castanha-do-brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Ouriços de Castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa*) foram coletados no Campo experimental Confiança da Embrapa Roraima, localizado no município do Cantá/RR, onde há um sistema

¹Pesquisadora em Fitopatologia, Embrapa Roraima CPAF-RR, e-mail: hyanameyka.lima@embrapa.br;

²Estudante do curso de agronomia - UFRR, Bolsista PIBIC/CNPq, e-mail: daysemelolins@hotmail.com;

³Estudante do curso de Biologia, Faculdade Cathedral, Curso de Ciências Biológicas, e-mail: jawadeismel@gmail.com;

⁴Eng. Agrônomo, Técnico de Laboratório da Embrapa Roraima CPAF-RR, e-mail: giovanni.souza@embrapa.br;

⁵Estudante de mestrado em Biotecnologia - UFAM, Embrapa/INPA, e-mail: patty.cgbio@gmail.com.

32 agroflorestral (SAFs) instalado há 17 anos, contendo espécies de Castanha-do-brasil (*Bertholetia*
33 *excelsa*), cupiúba (*Goupia glabra*), pupunha (*Bactris gasipaes*), cupuaçu (*Theobroma*
34 *grandiflorum*); café (*Coffea canephora*); saman (*Samanea saman*); abiu (*Micropholis venulosa*); e
35 andiroba (*Carapa guianensis*). Os ouriços coletados no SAFs foram transportados até o laboratório
36 de fitopatologia da Embrapa Roraima, sendo os ouriços abertos com uma serra elétrica circular
37 (Makita®) para retirada das castanhas que foram posteriormente descascadas com auxílio de uma
38 faca para retirada das amêndoas.

39 Para o isolamento de fungos endofíticos presentes nas amêndoas de castanha do brasil adotou-
40 se o método de incubação em substrato de papel filtro “Blotter test”. Utilizou-se como substrato
41 duas folhas de papel filtro previamente esterilizados e umedecidos com água destilada esterilizada.
42 Foi realizada a desinfestação superficial das amêndoas de castanha submergindo-as em solução
43 aquosa de álcool 70% durante 30 segundos, sendo em seguida transferidas para solução de
44 hipoclorito de sódio 2,0%, mantendo-as imersas na solução durante 1 min. Posteriormente, as
45 amêndoas foram submersas em água destilada estéril para eliminar o excesso da solução
46 desinfestante, sendo distribuídas cinco amêndoas uniformemente sobre o substrato de papel em
47 caixas de acrílico tipo “gerbox”, tamanho de 11 x 11 x 3,5 cm, e mantidas sob a temperatura de 27
48 °C, por sete dias. Após este período, com auxílio de lupa, analisou-se a presença de sinais fúngicos
49 sobre as amêndoas e, fragmentos dos mesmos foram transferidos para placas de Petri contendo
50 meio de Batata-Dextrose-Agar (BDA), mantidas em incubadora incubadas em BOD a 27 °C À
51 medida que as colônias foram se desenvolvendo, as mesmas foram repicadas novamente até obter-
52 se cultura pura sem contaminação. Os isolados armazenados em BDA identificados como
53 *Aspergillus* spp. foram repicados em meio ágar coco. As placas foram incubadas por 6 dias a 27 °C.
54 O verso e reverso da colônia foram observados a cada 24h, por 6 dias (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e
55 144h), sob luz ultravioleta (365 nm), para verificar a presença de um halo fluorescente azulado, o
56 qual, indica a presença de micotoxina. Após a identificação de isolados de *Aspergillus* produtores
57 de micotoxinas, quatro isolados de *Aspergillus* spp. e seis isolados de *Trichoderma* foram
58 repicados para meio BDA e incubados em BOD à temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 12
59 horas. Discos de ágar (5 mm de diâmetro) contendo micélio de cada isolado de *Aspergillus* spp. e de
60 *Trichoderma* foram retirados de colônias com três dias de cultivo e depositados, simultaneamente,
61 em extremidades opostas das placas de Petri, contendo meio BDA solidificado para avaliar o
62 antagonismo dos isolados de *Trichoderma* contra as espécies de *Aspergillus* spp., conforme descrito
63 por Mello et al. (2007). Foram utilizadas três repetições para cada isolado. As placas foram
64 incubadas em BOD a 27 °C. Após oito dias de cultivo, avaliou-se o crescimento micelial dos fungos
65 adotando a escala proposta por Bell et al. (1982), modificada. Considerou-se o isolado como
66 antagônico ou eficiente quando sua nota era menor ou igual a 3,0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de *Trichoderma* inibiram o crescimento micelial dos isolados de *Aspergillus* spp. testados, pois apresentaram notas igual ou menores que 3 no teste de pareamento de culturas, conforme resumido na Tabela 1.

Tabela 1. Potencial antagonístico de seis isolados de *Trichoderma* spp. contra quatro isolados de *Aspergillus* spp. produtores de micotoxinas em castanha-do-brasil ao 8º dia de cultivo pareado

Código de acesso dos isolados de <i>Aspergillus</i> spp. testados	Notas de acordo com a escala de Bell et al. (1982) atribuídas aos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao antagonismo ao 8º dia*					
	TRIC01	TRIC02	TRIC03	TRIC04	TRIC05	TRIC06
ASPCB01	3	-	2	3	-	2,5
ASPCB02	2	2,5	2	2	2,5	2
ASPCB03	2,5	3	2	2,5	-	3
ASPCB04	3	2,5	2	2,5	-	2,5

*De acordo com a escala proposta por Bell et al. (1982), modificada, os isolados foram classificados como: Nota 1, crescimento de *Trichoderma* sobre o patógeno, ocupando toda a superfície do meio; Nota 1,5 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando 7/8 da superfície do meio; Nota 2 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando mais de 2/3 da superfície do meio; Nota 2,5 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando 5/8 da superfície do meio; Nota 3 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando aproximadamente metade da superfície do meio; Nota 3,5 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando 3/8 da superfície do meio; Nota 4 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando 1/3 da superfície do meio e Nota 5 - ausência de crescimento de *Trichoderma*, patógeno ocupando toda a superfície do meio.

O antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Aspergillus* spp. foi observado em 100% dos isolados. Dados obtidos por outros autores evidenciam que diversos mecanismos podem estar envolvidos na ação antagonista de fungos do gênero *Trichoderma*, tais como parasitismo direto, antibiose e competição (BENHAMOU e CHET, 1996). Por conta disso, várias espécies do gênero *Trichoderma* têm sido pesquisadas e desenvolvidas como agentes de biocontrole para diversos patógenos (MELLO et al., 2007). Com este trabalho, foram obtidos dados que indicam o potencial antagonista de isolados de *Trichoderma*, contra espécies de *Aspergillus* produtores de micotoxinas, ambos isolados de castanha-do-brasil. Na literatura, há relatos de que as espécies de *Trichoderma* agem como parasitas de uma ampla gama de fitopatógenos, e apresentam certo grau de especialização, podendo variar o nível de controle conforme o isolado e sua adaptação às condições bióticas e abióticas específicas, dentro e entre espécies de *Trichoderma* (DENNIS e WEBSTER, 1971). Wells et al. (1972), por sua vez, observaram que espécies de *Trichoderma* podem ser diferencialmente seletivas contra diferentes fungos. Neste trabalho, todos os isolados se revelaram altamente efetivos *in vitro* contra *Aspergillus* produtores de micotoxinas isolados de castanha-do-brasil. Esse potencial necessita agora ser examinado por meio de bioensaios conduzidos sob condições controladas e de campo, pois excelentes resultados com antagonistas obtidos *in vitro* podem não ser confirmados em condições de campo, já que esses organismos estão sujeitos às reações diferenciais do hospedeiro e do ambiente (LOUZADA et al., 2009).

102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136

CONCLUSÕES

Todos os isolados de *Trichoderma* utilizados no teste de pareamento de culturas contra isolados de *Aspergillus* spp. produtores de micotoxinas em castanha-do-brasil apresentaram potencial antagônico *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa PIBIC.

REFERÊNCIAS

- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, n.4, p.379-382, 1982.
- BENHAMOU, N.; CHET, I. Parasitism de Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. **Phytopathology**, v.86, n.4, p.405-416, 1996.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. **T. Brit. Mycol. Soc.**, v.57, n.1, p.25-39, 1971.
- KLICH, M.A. Health effects of *Aspergillus* in food and air. **Toxicol. Ind. Healt.**, v.25, p.657-667, 2009.
- LOUZADA, G.A.S.; Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotrop.**, v.9, n.3, p.145-149, 2009.
- MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad.**, v.11, n.1, p.3-9, 2007.
- MOHAMED, H.A.L.A.; HAGGAG, W.M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Braz. J. Microbiol.**, v.37, n.2, p.181-191, 2006.
- RESENDE, M.L.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; VON, R.G.P.; VIEIRA, A.R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Cienc. Agrotec.**, v.28, n.4, p.793-798, 2004.
- VAN EGMOND, H.P.; SCHOTHORST, R.C.; JONKER, M.A. Regulations relating to mycotoxins in food: Perspectives in a global and European context. **Anal. Bioanal. Chem**, v.389, p.147-157, 2007.
- WELLS, H.D.; BELL, D.K.; JAWORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent for *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v.62, n.4, p.442-447, 1972.