



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-se  
40 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-se  
52 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.