EFEITO INIBIDOR DE MICRORGANISMOS DO SOLO NO DESENVOLVIMENTO
DE ECTOMICORRIZAS EM MUDAS DE *Eucalyptus urophylla* INOCULADAS
IN VITRO COM *Pisolithus tinctorius*

JOÃO TAVARES BUENO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

S736a Sparovek, Gerd
Amostragem e análise de dados edafo-bio-climáticos
de um remanescente florestal no Município de Pindora-
ma (SP). Piracicaba, 1993.
132p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Delineamento do experimento 2. Floresta - Deli-
neamento de experimento I. Escola Superior de Agricul-
tura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634

EFEITO INIBIDOR DE MICRORGANISMOS DO SOLO NO DESENVOLVIMENTO
DE ECTOMICORRIZAS EM MUDAS DE *Eucalyptus urophylla* INOCULADAS
IN VITRO COM *Pisolithus tinctorius*

JOÃO TAVARES BUENO

Aprovada em: 10/03/94

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

ESALQ/USP

Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

ESALQ/USP

Profª Drª MARGARETE CAMARGO

UNESP/Jaboticabal

Prof. Dr. JOÃO BATISTA VIDA

UEM/Maringá

Dr. WAGNER BETTIOL

EMBRAPA/Campinas

Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

- Orientador -

Aos meus pais,

Francisca e

Francisco (in memorian)

esposa,

Zélia

e filhos,

Aline e

João Vinícius

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Tasso Leo Krüchner, pela orientação e pela amizade.
- À Fundação Faculdade de Agronomia "Luiz Meneghel", pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado.
- Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, professores e funcionários, pelos ensinamentos e apoio recebidos.
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pela convivência.
- À Prof^a Dr^a Beatriz Appezzato da Gloria e à laboratorista Magali Aparecida Rodrigues Machado, pelo auxílio na execução da análise para detecção de fenóis nas plantas.
- Aos Professores da FFALM, Maria Aparecida Valério e Walter Candioto, pela colaboração no processamento e análise estatística dos dados.
- Ao Departamento de Silvicultura da ESALQ, pelo fornecimento das sementes de eucalipto.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Micorrizas em eucalipto	5
2.2. Benefícios aos simbiontes	6
2.3. Métodos de inoculação de mudas com fungos ectomí- corrízicos	7
2.4. Fatores que afetam a formação de ectomicorrizas ...	10
2.5. Influência dos microrganismos do solo	11
2.6. Mecanismos microbianos inibidores da formação e de- senvolvimento ectomicorrízico	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Isolamento de microrganismos dos substratos de vi- veiro.....	17
3.2. Triagem dos microrganismos isolados dos substratos.	18
3.3. Desenvolvimento de <i>P. tinctorius</i> em meios com ex- tratos de culturas de fungos do solo	19
3.3.1. Desenvolvimento de <i>P. tinctorius</i> em extratos autoclavados	19
3.3.2. Desenvolvimento de <i>P. tinctorius</i> em extratos filtrados	20
3.4. Desenvolvimento de <i>P. tinctorius</i> pareado com bacté- rias do solo	21

3.5. Parasitismo de fungos do solo em <i>P. tinctorius</i>	21
3.5.1. Método do micro-cultivo	21
3.5.2. Método do micro-cultivo modificado	22
3.6. Acúmulo de compostos fenólicos nas raízes	23
3.7. Influência de microrganismos do solo na formação e desenvolvimento das ectomicorrizas	25
3.7.1. Características gerais dos experimentos	25
3.7.2. Tratamento das sementes e pré-germinação ...	25
3.7.3. Produção do inóculo ectomicorrízico	26
3.7.4. Produção do inóculo dos microrganismos iso- lados dos substratos de viveiro	26
3.7.5. Preparo do substrato para cultivo de <i>E. uro-</i> <i>phylla</i>	26
3.7.6. Transferência das sementes pré-germinadas para os tubos de ensaio e inoculação com <i>P.</i> <i>tinctorius</i>	27
3.7.7. Inoculação com microrganismos isolados dos substratos de viveiro	27
3.7.8. Incubação	28
3.7.9. Avaliação do desenvolvimento ectomicorrízico	29
3.7.10. Peso da matéria seca das plantas	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Microrganismos isolados dos substratos de viveiro .	30
4.2. Triagem dos isolados	33

4.3. Desenvolvimento de <i>P. tinctorius</i> nos meios com ex- tratos de culturas de fungos do solo	33
4.4. Desenvolvimento de <i>P. tinctorius</i> pareado com bacté- rias do solo	39
4.5. Parasitismo de fungos do solo em <i>P. tinctorius</i>	42
4.6. Formação de inclusões escuras nas raízes de <i>E. uro-</i> <i>phylla</i>	44
4.7. Influência de microrganismos do solo no desenvolvi- mento das ectomicorrizas	48
5. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
APÊNDICE	72

**EFEITO INIBIDOR DE MICRORGANISMOS DO SOLO NO DESENVOLVIMENTO
DE ECTOMICORRIZAS EM MUDAS DE *Eucalyptus urophylla* INOCULADAS
IN VITRO COM *Pisolithus tinctorius***

Autor: JOÃO TAVARES BUENO

Orientador: Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

RESUMO

A população de fungos e bactérias foi estimada em 3 substratos usados em viveiros florestais: turfa, terra de subsolo e casca de eucalipto decomposta, esta fumigada ou não com brometo de metila. Dentre os isolados fúngicos e bacterianos obtidos foram selecionados 3 isolados do gênero *Trichoderma* (denominados TR-1, TR-4 e TR-7), 1 isolado de *Penicillium* (PN-10), 1 da família *Mucoraceae* (MU-25) e 4 isolados bacterianos (B-40, B-41, B-43 e B-44) para verificação de antibiose a *P. tinctorius* em meio de cultura contendo ágar. Os 3 isolados do gênero *Trichoderma* e 1 isolado bacteriano (B-44) inibiram o desenvolvimento de *P. tinctorius*. Os isolados de *Trichoderma* não parasitaram hifas de *P. tinctorius* em meio com ágar. Os isolados TR-1, TR-4, TR-7, PN-10, PN-16, B-40, B-44 e os complexos microbianos dos 3 substratos de viveiro foram avaliados quanto a habilidade de inibirem o desenvolvimento de ectomicorrizas por *P. tinctorius* em mudas de *E. urophylla* cultivadas em tubos de ensaio contendo vermiculita-esfagno e solução de Melin-Norkrans modificada. Os isolados de *Trichoderma* (TR-1, TR-4 e TR-7) e os complexos microbia-

nos dos substratos inibiram fortemente o desenvolvimento ectomicorrízico. Os isolados de *Penicillium* (PN-10 e PN-16) também inibiram o desenvolvimento ectomicorrízico mas em menor intensidade. Os isolados TR-1, PN-10, B-44 e os complexos microbianos dos substratos foram avaliados quanto a habilidade de induzirem as raízes de *E. urophylla* formar inclusões no cortex indicando acúmulo de compostos fenólicos indutores de resistência ao desenvolvimento ectomicorrízico. Dentre estes, somente o isolado B-44 não induziu formação de inclusões nas raízes. Concluiu-se que os substratos de viveiro podem ser colonizados por espécies de *Trichoderma* e de *Penicillium*, potencialmente inibidoras do desenvolvimento de ectomicorrizas em *E. urophylla* por *P. tinctorius*.

THE INHIBITORY EFFECT OF SOIL MICRO-ORGANISMS ON ECTOMYCORRHIZAL
DEVELOPMENT OF *Eucalyptus urophylla* SEEDLINGS INOCULATED
IN VITRO WITH *Pisolithus tinctorius*

Author: JOÃO TAVARES BUENO

Adviser: Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

SUMMARY

It was estimated the fungal and bacterial population of 3 forest nurseries substrates: peat, subsoil and decomposed bark of eucalypt fumigated or not with methyl bromide. Three isolates of *Trichoderma* (designated TR-1, TR-4 and TR-7), 1 isolate of *Penicillium* (PN-10), 1 *Mucoraceae* (MU-25), and 4 bacterial isolates (B-40, B-41, B-43 and B-44) were selected for verification of antibiosis against *P. tinctorius* in agar culture. All isolates of *Trichoderma* and 1 bacterial isolate (B-44) inhibited *P. tinctorius* growth. Isolates of *Trichoderma* did not parasitize the hyphae of *P. tinctorius* in agar culture. The isolates TR-1, TR-4, TR-7, PN-10, PN-16, B-40, B-44, and the microbial complex of nursery substrates were tested for the ability to inhibit development of ectomycorrhiza by *P. tinctorius* on *E. urophylla* seedlings cultivated in tubes with a vermiculite-peat moss mixture moistened with modified Melin-Norkrans solution. The isolates of *Trichoderma* (TR-1, TR-4 and TR-7) and the microbial complex of nursery substrates were strongly inhibitory towards ectomycorrhizal

zal development. The *Penicillium* isolates (PN-10 and PN-16) also had inhibitory effects on the development of ectomycorrhiza but with a fewer intensity. The isolates TR-1, PN-10, B-44, and the microbial complex of substrates were evaluated for their ability to induce roots of *E. urophylla* to form phenolic inclusions in cortical cells which would be involved in a resistance mechanism. Except the isolate B-44, the isolates induced formation of inclusions on roots. It is concluded that nursery substrates might be colonized by *Trichoderma* and *Penicillium* species with potential to inhibit ectomycorrhizal development by *P. tinctorius* on *E. urophylla*.

1. INTRODUÇÃO

O eucalipto (*Eucalyptus* spp.), apesar de ser classificado como micorrízico facultativo (MEYER, 1973; MALAJCZUK et alii, 1982), pode se associar simbioticamente com fungos ecto e endomicorrízicos (BOUDARGA et alii, 1990; BELLEI & CARVALHO, 1992). Para a planta, a simbiose incrementa a absorção e acúmulo de nutrientes, a tolerância ao déficit hídrico e reduz, muitas vezes, a ocorrência e severidade das doenças das raízes, resultando em fator de aumento da produtividade. Os benefícios são especialmente marcantes quando as plantas são cultivadas sob condições ambientes adversas (BARROS et alii, 1978; SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Mudas de eucalipto com ectomicorrizas podem ser obtidas através da inoculação em viveiro (TRAPPE, 1977; KRÜGNER, 1986), incorporando-se o inóculo ao substrato ou através da inoculação *in vitro*, sob condições controladas. Por este último método, mais recentemente desenvolvido, as mudas obtidas a partir de sementes ou de tecido vegetativo são inoculadas em laboratório com linhagens específicas do fungo ectomicorrízico (CHILVERS et alii, 1986; VIDA, 1989). Após o desenvolvimento das ectomicorri-

zas, as mudas são transplantadas para recipientes contendo substrato previamente preparado e cultivadas em viveiro. A possibilidade da utilização de combinação específica fungo-planta, com consequente otimização da associação simbiótica, constitui-se na grande vantagem desta técnica (KRÜGNER, 1986).

Pelo processo de inoculação *in vitro* geralmente são produzidas mudas com altas quantidades de ectomicorrizas. Porém, após o transplante para viveiro pode não ocorrer o desenvolvimento de novas ectomicorrizas ou mesmo a manutenção da quantidade previamente desenvolvida. VIDA (1989) obteve plântulas e "plantlets" de eucalipto altamente colonizadas por isolados do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch em condições axênicas. Entretanto, quando as mudas foram transplantadas para substrato solo-areia previamente autoclavado e mantidas em condições de viveiro, não houve a constante manutenção da quantidade de ectomicorrizas formadas. Em várias combinações verificou-se o completo desaparecimento. Antagonismo exercido por fungos saprófitas do solo foi citado como um dos possíveis fatores envolvidos na redução da porcentagem de raízes ectomicorrízicas. Por outro lado, num trabalho realizado por BACCHI (1988), em condições de viveiro, onde mudas de eucalipto foram cultivadas em tubetes contendo mistura de turfa com vermiculita e inoculadas com *P. tinctorius*, verificou-se que não houve a formação de ectomicorrizas típicas. Embora não tenha sido considerada, a possível presença de microrganismos inibidores pode ter contribuído para o insucesso na formação de ectomicorrizas. Estes exemplos ilustram a existência de dificuldades na formação e desenvolvimento de ectomicorrizas em eucalipto, sob condições de vi-

veiro.

Além dos fatores abióticos ou de outros fatores bióticos inerentes ao hospedeiro ou ao fungo ectomicorrízico, a interação com microrganismos do solo pode influenciar a formação e o desenvolvimento de ectomicorrizas (SIQUEIRA & FRANCO, 1988; BELLEI & CARVALHO, 1992). Alguns microrganismos são benéficos e outros prejudiciais, anulando ou reduzindo o seu desenvolvimento. Antibiose, competição e parasitismo, atuando separadamente ou em conjunto, são comumente citados como possíveis mecanismos inibidores da formação e desenvolvimento de ectomicorrizas (BOWEN & THEODOROU, 1979; SUMMERBELL, 1987; GARBAYE & BOWEN, 1989; DUPONNOIS & GARBAYE, 1991). Porém, há necessidade de ser considerado que microrganismos podem induzir as plantas hospedeiras a produzirem e acumularem compostos fenólicos, substâncias que conferem resistência aos agentes causadores de doenças (SYLVIA & SINCLAIR, 1983). Quando o acúmulo é induzido pela ação de fungos ectomicorrízicos, os compostos produzidos atuam contra a infecção por fitopatógenos ou como fator de especificidade entre o fungo ectomicorrízico e a planta hospedeira. Porém, se houver indução pela ação de microrganismos saprófitas presentes e predominantes no substrato, os compostos fenólicos poderiam inibir a formação e desenvolvimento de ectomicorrizas.

Em viveiros florestais as mudas são geralmente produzidas em substratos compostos e desinfestados. Entretanto, tais substratos, com a população microbiana desequilibrada ou eliminada, podem ser recolonizados por espécies pioneiras. Isolados de *Trichoderma* e de *Penicillium* foram selecionados por MAROIS et alii (1981), visando verificar suas capacidades antagonísti-

cas, pela habilidade de desenvolverem-se rapidamente em solo fumigado e ocuparem o rizoplane. Em adição, SUMMERBELL (1987) cita que solos fumigados podem ser muitas vezes vigorosamente recolonizados por espécies de *Trichoderma* que tornam-se prevalentes. Microrganismos predominantes poderiam exercer antibiose, parasitismo, competição ou induzir as raízes a acumular compostos fenólicos oferecendo resistência a colonização ectomicorrízica.

VIDA (1989) observou ainda que o desenvolvimento de ectomicorrizas em mudas de eucalipto, inoculadas com *P. tinctorius*, em solo autoclavado foi mais afetado quando as mudas foram previamente cultivadas em meio com carbono orgânico disponível, em relação ao cultivo em meio inorgânico. O resíduo do meio com carbono orgânico que permaneceu aderido às raízes teria estimulado o desenvolvimento de microrganismos saprófitas do solo, afetando o desenvolvimento ectomicorrízico.

As evidências levantadas permitem supor que microrganismos do solo, especialmente os recolonizadores de substratos com população microbiana desequilibrada, interferem no desenvolvimento de ectomicorrizas, inibindo a simbiose.

Os objetivos deste trabalho foram:

- verificar a influência inibidora de representantes da população fúngica e bacteriana e de complexos microbianos originários de substratos de viveiro na formação e desenvolvimento de ectomicorrizas em mudas de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake por *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch; e
- obter evidências dos possíveis mecanismos envolvidos na inibição.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micorrizas em eucalipto

As plantas que formam micorrizas e mantém estreita relação de dependência com os fungos simbioss, ocorrendo benefícios marcantes aos membros da associação simbiótica, são classificadas como micorrízicas obrigatórias. Outras possuem sistemas radiculares mais desenvolvidos e mais eficientes na absorção de água e nutrientes do solo, exibem taxas de colonização geralmente mais baixas que as do grupo anterior, respondem com menor intensidade à inoculação e só se beneficiam da associação micorrízica em condições muito estressantes de crescimento. Estas são classificadas como micorrízicas facultativas (SIQUEIRA & FRANCO, 1988), situando-se neste grupo o eucalipto (MEYER, 1973; MALAJCZUK et alii, 1982).

A maioria das plantas vasculares forma, em associação com fungos simbioss, ou ectomicorriza ou endomicorriza. Contrastando, o gênero *Eucalyptus*, entre outros poucos gêneros, pode formar os dois tipos de micorrizas (BOUDARGA et alii, 1990; BELLEI & CARVALHO, 1992). Técnica para a inoculação dupla de fungos ecto e endomicorrízicos em *Eucalyptus* foi desenvolvida por BOUDARGA et alii (1990). Existem evidências da ocorrência de uma sucessão natural endo-ectomicorrízica em florestas de *Eucalyptus*, predominando a colonização endomicorrízica em plantas jovens e a

colonização ectomicorrízica em plantas adultas, no seu habitat natural (BELLEI et alii, 1989; BELLEI & CARVALHO, 1992).

A associação eucalipto-fungo ectomicorrízico exhibe ampla diversidade. CHILVERS & PRIOR (1965) avaliaram 154 espécies do gênero *Eucalyptus* e todas formaram micorrizas. Segundo BARROS et alii (1978), levantamentos realizados permitem concluir que todas as espécies de *Eucalyptus* são capazes de formar micorrizas, com pelo menos 14 espécies de fungos ectomicorrízicos. Oito tipos de ectomicorrizas, distinguidos pela organização do tecido do manto e estruturas das rizomorfas, encontrados em florestas australianas nativas de *Eucalyptus* spp., foram descritos por CHILVERS (1968). No Brasil já foram constatadas 3 espécies de fungos formando ectomicorrizas em *Eucalyptus* spp.: *Pisolithus tinctorius* (YOKOMIZO & KRÜGNER, 1985a; CARVALHO et alii, 1987; ZAMBOLIN et alii, 1989); *Scleroderma* sp. (CARVALHO et alii, 1987; ZAMBOLIN et alii, 1989) e *Ramaria flavo-brunescens* (CARVALHO et alii, 1987).

2.2. Benefícios aos simbiossiontes

A formação da ectomicorriza, como simbiose mutualística, promove benefícios para ambos os simbiossiontes. O fungo ectomicorrízico recebe os produtos do processo fotossintético da planta hospedeira, particularmente a sacarose que é hidrolisada em glicose e frutose. Destes açúcares simples originam-se as substâncias de reserva do fungo. Nos extratos radiculares estão também presentes vitaminas e promotores do crescimento que são essenciais ao desenvolvimento desses fungos (BARROS et alii, 1978; BELLEI & CARVALHO, 1992). À planta, a simbiose pode propor-

cionar, basicamente, aumento na absorção de nutrientes, especialmente de fósforo, na tolerância às condições abióticas adversas e redução na atuação dos agentes causadores de podridões das raízes (BARROS et alii, 1978; SIQUEIRA & FRANCO, 1988; AUER & KRÜGNER, 1991; BELLEI & CARVALHO, 1992), sendo os benefícios particularmente marcantes quando a planta desenvolve-se sob condições climáticas e edáficas adversas. Revisão detalhada sobre o papel de fungos micorrízicos na absorção de fósforo pelas plantas foi elaborada por BOLAN (1991).

Em eucalipto, foi constatado que a simbiose ectomicorrízica proporcionou aumento na absorção e consequente acúmulo de nutrientes (SOARES et alii, 1986; CARVALHO & MUCHOVEJ, 1987; VIEIRA & PERES, 1988; GARBAYE et alii, 1988; HEINRICH et alii, 1988), no peso da matéria seca (VIEIRA & PERES, 1988; HEINRICH et alii, 1988) na altura (SOARES et alii, 1986; CARVALHO & MUCHOVEJ, 1987; VIEIRA & PERES, 1988) e na produtividade, em termos de volume de madeira (GARBAYE et alii, 1988).

2.3. Métodos de inoculação de mudas com fungos ectomicorrízicos

Segundo TRAPPE (1977), o estabelecimento e manutenção de populações apropriadas de fungos ectomicorrízicos devem ser partes integrantes do manejo de viveiros florestais.

Mudas produzidas em viveiros podem ser espontânea ou artificialmente inoculadas. A inoculação espontânea provavelmente ocorre na maioria das vezes por esporos disseminados pelo ar. Caracterizam negativamente a inoculação espontânea o fato de

ser errática e de não permitir a seleção do fungo ectomicorrízico (TRAPPE, 1977; BELLEI & CARVALHO, 1992).

A inoculação artificial, além de permitir a introdução dos fungos simbiossiontes em áreas deficitárias, possibilita o plantio, no campo, de mudas com quantidade inicial adequada de ectomicorrizas, não dependendo do inóculo eventualmente presente no local. Pode permitir ainda, a escolha de espécies ou linhagens de fungos mais eficientes, especialmente para o reflorestamento de áreas marginais, com condições adversas de solo (KRÜGNER, 1986). Para inoculação de mudas em viveiros florestais, quatro tipos de inóculo de fungos ectomicorrízicos podem ser utilizados: a) solo e acículas (terriço), retirados de florestas estabelecidas; b) esporocarpos, esporos e escleródios; c) micélio vegetativo, obtido em meio de cultura (TRAPPE, 1977; KRÜGNER, 1986; BELLEI & CARVALHO, 1992) e d) raízes colonizadas destacadas (TRAPPE, 1977; BELLEI & CARVALHO, 1992).

O uso de terriço não permite a seleção dos fungos ectomicorrízicos, possibilita a disseminação de fitopatógenos, pragas e ervas daninhas e pode tornar-se oneroso, dependendo da distância da fonte do inóculo. Inóculo puro pode ser obtido a partir de esporos, esporocarpos e escleródios. Porém, é difícil obtê-lo em grande quantidade, exibe grande variabilidade genética e sua disponibilidade está condicionada à produção natural que é errática. O uso de inóculo micelial vegetativo é considerado o melhor método para boa micorrização. Entretanto, devido às dificuldades de produção, manutenção e aplicação, sua utilização em larga escala é bastante restringida (TRAPPE, 1977; KRÜGNER, 1986; BELLEI & CARVALHO, 1992). O uso de raízes destacadas facilita a

disseminação de fitopatógenos, não permite a seleção dos fungos ectomicorrízicos e só é viável para pequenas áreas (TRAPPE, 1977; BELLEI & CARVALHO, 1992).

Característica comum dos métodos de inoculação acima citados é a de não permitirem total controle da população microbiana presente no substrato. Reconhecidamente os microrganismos do solo podem desempenhar importante papel na introdução e persistência de fungos ectomicorrízicos (PAULITZ & LINDERMAN, 1991).

Estudos referentes à formação e desenvolvimento de ectomicorizas podem ser efetuados sob condições controladas, em laboratório. Basicamente a técnica consiste na obtenção de plântulas ou "plantlets" livres de microrganismos, cultivadas em meio com ágar em placas de Petri (CHILVERS et alii, 1986) ou em outros substratos esterilizados e subsequente inoculação com espécies ou linhagens definidas do fungo ectomicorrízico (SYLVIA & SINCLAIR, 1983; SUMMERBELL, 1987; McAFEE & FORTIN, 1988; GARBAYE & BOWEN, 1989; THOEN et alii, 1990; THEODOROU & REDDELL, 1991).

Em eucalipto, o método de produção de ectomicorizas em condições axênicas foi utilizado para diversas finalidades, como: exame da distribuição de fenóis em raízes colonizadas e não colonizadas (LING-LEE et alii, 1977), comparação entre as taxas de crescimento de raízes colonizadas e não colonizadas (CHILVERS & GUST, 1982), avaliação da especificidade entre fungo e hospedeiro (BACCHI, 1988; VIDA, 1989; TONKIN et alii, 1989; MALAJCZUK et alii, 1990; VIDA et alii, 1991), exame de alterações estruturais e bioquímicas das raízes nos primeiros estágios de formação da ectomicorriza (LEI et alii, 1990) e obtenção de plan-

tas duplamente colonizadas por fungos endo e ectomicorrízicos (BOUDARGA et alii, 1990). Sistemas axênicos podem ainda ser utilizados para estudos da interação entre fungos ectomicorrízicos e outros microrganismos do solo. Microrganismos interferidores detectados, porém, devem ser novamente testados em sistemas abertos, para verificar se os efeitos são persistentes (PAULITZ & LINDERMAN, 1991).

Eventualmente, plantas com ectomicorrizas formadas em sistemas axênicos podem ser transplantadas para sistemas abertos e mantidas em condições de viveiro (VIDA, 1989) com a vantagem de apresentarem interação já estabelacida, com fungo específico e selecionado (KRÜGNER, 1986).

2.4. Fatores que afetam a formação de ectomicorrizas

Além da própria habilidade do fungo colonizar o hospedeiro, envolvendo as capacidades genotípicas dos dois simbiotes (CHILVERS, 1968; YOKOMIZO & KRÜGNER, 1985b; VIEIRA & PERES, 1988; VIDA, 1989; THOEN et alii, 1990; LEI et alii, 1990; MALAJCZUK et alii, 1990, THEODOROU & REDDELL, 1991), outros fatores podem influenciar o estabelecimento e desenvolvimento ectomicorrízico. Podem ser relacionados fatores como: o teor de nutrientes do substrato, sua acidez, teor de umidade, teor de matéria orgânica, temperatura, intensidade luminosa, presença de elementos tóxicos e a interação com outros microrganismos do solo (TRAPPE, 1977; BETTIOL & KRÜGNER, 1986; BERINGER et alii, 1987; PAULITZ & LINDERMAN, 1991; BELLEI & CARVALHO, 1992).

2.5. Influência dos microrganismos do solo

Dentro da diversidade das interações entre fungos ectomicorrízicos e outros microrganismos do solo são conhecidas aquelas envolvendo patógenos de plantas, outros fungos ectomicorrízicos e outros microrganismos benéficos, como por exemplo bactérias fixadoras de nitrogênio (MARX, 1972; TRAPPE, 1977; PAULITZ & LINDERMAN, 1991).

Interações entre oito fungos ectomicorrízicos e oito isolados bacterianos foram testadas em meio de cultura e na rizosfera de *Pinus radiata* por BOWEN & THEODOROU (1979). A redução do crescimento dos fungos causada pelas bactérias variou com o meio utilizado e mostrou pequena relação com os resultados obtidos no rizoplane. No rizoplane, diferentes isolados bacterianos inibiram, estimularam ou não mostraram efeito no crescimento do fungo ectomicorrízico. Pelos resultados obtidos, os autores consideraram que a interação entre fungos ectomicorrízicos e microrganismos do solo pode determinar o sucesso ou o fracasso da micorrização, quanto à formação e desenvolvimento, quando os fungos micorrízicos são artificialmente inoculados. OLIVEIRA & GARBAYE (1989) detectaram diferenças na receptividade entre solos da França à colonização de *Fagus silvatica* pelos fungos *Hebeloma crestuliniforme* e *Paxillus involutus*. Em dois desses solos, um resistente e outro receptivo à micorrização, foram observados diferenças na colonização e na manutenção das ectomicorrizas. Em teste de confrontação *in vitro*, entre trinta e sete isolados bacterianos e os dois fungos ectomicorrízicos, foram observados e-

feitos estimulantes ou inibidores sobre o crescimento dos fungos. Em solo desinfestado, a inoculação dos isolados bacterianos revelou efeito favorável de uma bactéria isolada do solo receptivo e efeito desfavorável de outra bactéria isolada do solo resistente à micorrização. GARBAYE & BOWEN (1989) observaram, em experimentos conduzidos em condições axênicas e não axênicas, usando solo como substrato, que uma significativa população microbiana estava presente no manto ectomicorrízico formado por *Rhizopogon luteolus* em *Pinus radiata*, incluindo bactérias, leveduras e fungos miceliiais, com predomínio de bactérias Gram negativas. Entre onze isolados testados, incluindo bactérias e uma levedura, nove estimularam a formação de ectomicorrizas, enquanto dois a inibiram. Similarmente, RICHTER et alii (1989) testaram em meio de cultura a influência de doze isolados de actinomicetos, isolados do micorrizoplane de *Pinus resinosa*, no crescimento de três fungos ectomicorrízicos: *Laccaria laccata*, *L. bicolor* e *Thelephora terrestris*. Tanto efeitos estimulantes como inibidores foram observados. Nos três trabalhos acima citados são encontradas sugestões para o uso de microrganismos benéficos visando aumentar a eficiência de fungos ectomicorrízicos em viveiros florestais. Com este objetivo, DUPONNOIS & GARBAYE (1991) verificaram o efeito da inoculação simultânea de *Laccaria laccata* e cinco isolados de bactérias estimulantes (MHB - Mycorrhization Helper Bacteria), previamente selecionadas, na formação de ectomicorrizas em *Pseudotsuga menziesii*, em dois viveiros florestais. Com o isolado mais eficiente da MHB, quando comparada com a testemunha sem bactéria, a porcentagem de raízes ectomicorrízicas aumentou de 60 para 90 ou de 80 para 100, dependendo do viveiro.

MCAFEE & FORTIN (1988) cultivaram plântulas de *Pinus banksiana* e de *Larix laricina* em substrato (vermiculita + turfa) autoclavado e as inocularam com *Laccaria bicolor*, *Pisolithus tinctorius* e *Hebeloma cylindrosporum* e com fina suspensão de solo, contendo propágulos menores que 45 µm. A fina suspensão de solo aumentou significativamente a formação de ectomicorrizas por *L. bicolor* e por *P. tinctorius* em *P. banksiana* e aumentou a altura das plântulas. Em *L. laricina*, a suspensão de solo não influenciou a formação das ectomicorrizas. Estes resultados mostram que a influência de microrganismos do solo na formação de ectomicorrizas pode ser variável dependendo da combinação fungo-planta considerada.

O efeito de dez espécies de fungos de solo, obtidos através de lavagem em série de ectomicorrizas formadas por *L. bicolor* em *Picea mariana*, no desenvolvimento de ectomicorrizas por esses mesmos simbiontes, em condições axênicas, foi avaliado por SUMMERBELL (1987). Dentre as dez espécies, seis aparentemente não interferiram no desenvolvimento de ectomicorrizas. Duas espécies de *Trichoderma* (*T. viride* e *T. polysporum*) foram fortemente antagônicas à colonização ectomicorrízica. Outras duas espécies de fungos (*Tolypocladium inflatum* e *Trichosporan bergelii*) também inibiram a colonização mas não tanto quanto as espécies de *Trichoderma*.

Em viveiros florestais, as mudas são geralmente produzidas em substratos desinfestados. Nesses substratos, a formação e desenvolvimento das ectomicorrizas podem ser afetados por microrganismos do solo que rapidamente os recolonizam. Segundo

Mughogho¹ (1968), citado por SUMMERBELL (1987), solos fumigados são muitas vezes vigorosamente recolonizados por espécies de *Trichoderma*, as quais tornam-se mais prevalentes que em circunstâncias naturais. VIDA (1989) considerou, entre outros fatores, a possibilidade de microrganismos do solo, como *Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp., terem influenciado negativamente a manutenção de ectomicorrizas por *P. tinctorius* em plântulas e "plantlets" de eucalipto, produzidas em condições axênicas, transplantadas para solo autoclavado e mantidas em condições de viveiro. Em contraste, a formação de ectomicorrizas foi mais efetiva em solo fumigado que em não fumigado (MARX et alii, 1978) ou que em solo desinfestado por microondas, comparado com solo não desinfestado (GIBSON et alii, 1988).

2.6. Mecanismos microbianos inibidores da formação e desenvolvimento ectomicorrízico

A interação entre microrganismos do solo e fungos ectomicorrízicos pode tomar aparentemente uma grande variedade de formas - desde simples competição por nutrientes até letal antibiose (TRAPPE, 1977). BOWEN & THEODOROU (1979), avaliando a interação entre oito fungos ectomicorrízicos e oito isolados bacterianos oriundos do solo, sugeriram que a competição e a antibiose foram responsáveis pela inibição dos fungos ectomicorrízicos.

SUMMERBELL (1987), não conseguiu comprovar a ocor-

1. MUGHOGHO, L. K. The fungus flora of fumigated soils. *Transactions of the British Myc. Society*. London, 51:441-449, 1968.

rência de parasitismo de *Trichoderma viride* em *Laccaria bicolor*. Considerou que os resultados negativos obtidos em meio de cultura, rico em nutrientes, não eliminaram a possibilidade da existência de parasitismo. Porém, observou que duas espécies de *Trichoderma*, *T. viride* e *T. polysporum*, foram fortemente antagônicas à colonização ectomicorrízica. Parasitismo é citado por SIQUEIRA & FRANCO (1988) como um dos possíveis mecanismos de interação entre microrganismos e fungos ectomicorrízicos. É conhecido que fungos do solo, agentes de controle biológico de fitopatógenos, exercem sobre eles hiperparasitismo (HADAR et alii, 1979; PUNJA, 1985). Estes estudos reforçam a possibilidade de existência de parasitismo em fungos ectomicorrízicos por microrganismos do solo.

Existe ainda a possibilidade de microrganismos do solo influenciarem indiretamente a formação e desenvolvimento ectomicorrízico. Fungos ectomicorrízicos podem induzir as plantas hospedeiras a produzirem e acumularem compostos fenólicos quando com eles interagem (LING-LEE et alii, 1977; PICHE et alii, 1981; SYLVIA & SINCLAIR, 1983; TONKIN et alii, 1989; THOEN et alii, 1990). O acúmulo de compostos fenólicos nas raízes inibiu a ação de fungos fitopatogênicos (SYLVIA & SINCLAIR, 1983) ou a própria colonização pelo fungo ectomicorrízico (TONKIN et alii, 1989). SYLVIA & SINCLAIR (1983) observaram também que outros microrganismos não micorrízicos (*Pseudomonas cepacia*, *Trichoderma harzianum* e *Epiccocum purpurascens*) induziram raízes de *Pseudotsuga menziesii* a produzirem e acumularem compostos fenólicos, os dois primeiros em quantidades comparáveis à induzida pelo fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata*, possibilitando resistência à

infecção por fitopatógenos. Desse modo, é possível que microrganismos do solo, especialmente aqueles que rapidamente recolonizam substratos biologicamente desequilibrados, induzam as plantas a produzirem e acumularem compostos fenólicos, podendo, estes compostos, inibir a formação e desenvolvimento das ectomicorrizas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento de microrganismos dos substratos de viveiro

Três substratos, normalmente utilizados em compostos destinados à produção de mudas em viveiros florestais, foram amostrados para o isolamento de fungos e de bactérias: turfa moída, terra de subsolo e casca de eucalipto decomposta, sendo, este último, fumigado ou não com brometo de metila. Os substratos foram coletados em viveiro florestal, pertencente à Companhia Florein, situado no município de Jacareí, estado de São Paulo. Microrganismos desses substratos foram isolados através da técnica da diluição em série. Transferiu-se 1 g de cada substrato para tubos de ensaio contendo 9 ml de água esterilizada por autoclavagem e destas foram obtidas suspensões até a diluição 10^{-5} , em água esterilizada. Alíquotas de 0,1 ml das suspensões microbianas foram transferidas, em 4 repetições, para placas de Petri contendo Meio de Martin, para isolamento de fungos ou Meio de Extrato de Solo (TUIITE, 1969), para isolamento de bactérias. As suspensões foram distribuídas na superfície dos meios, nas placas, com auxílio de espátula de Drigalsky. Após incubação sob condições do ambiente por 2 a 4 dias, as colônias foram contadas com auxílio de contador de colônias. Foram utilizadas para contagem, as placas onde a concentração de propágulos permitiu a formação da maior quantidade de colônias distintas. Exemplares, com formas ou

cores distintas, das colônias fúngicas foram repicadas para BDA (batata-dextrose-ágar) e das bacterianas para NA (nutriente-ágar), em placas de Petri e tubos de ensaio para identificação e preservação.

3.2. Triagem dos microrganismos isolados dos substratos

Um ensaio foi desenvolvido, *in vitro*, para selecionar isolados de fungos e bactérias para os testes posteriores. Todos os isolados microbianos obtidos a partir dos substratos amostrados foram pareados com *P. tinctorius* (isolado CH-1, pertencente à coleção do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, obtido a partir de basidiocarpo coletado em talhão de eucalipto) em placas de Petri contendo meio de cultura (BDA). Um disco de meio, com 5 mm de diâmetro, retirado dos bordos de colônias de *P. tinctorius* cultivado em placas com BDA, foi colocado no centro de cada placa usada no pareamento. As placas foram mantidas por 2 semanas em câmara de crescimento para promoção do desenvolvimento prévio do *P. tinctorius*, alcançando, as colônias, aproximadamente 20 mm de diâmetro. Para as laterais da placa, em alinhamento com a colônia central, foram repicados os microrganismos isolados dos substratos de viveiro. Dois discos com 5 mm de diâmetro foram retirados dos bordos de colônias fúngicas com 3 a 7 dias de idade e colocadas a 10 mm do bordo da colônia central de *P. tinctorius*, 1 disco de cada lado. As bactérias foram transferidas para as placas com auxílio de alça de repicagem e depositadas nas placas como acima descrito. Foram feitas 2 repetições para cada isolado. As placas foram mantidas sob condições do ambiente por 2 semanas.

Foi avaliado o desenvolvimento diametral de *P. tinctorius*, medindo-se os diâmetros perpendicularmente cruzados das colônias, um deles na direção das colônias dos microrganismos isolados dos substratos.

3.3. Desenvolvimento de *P. tinctorius* em meios com extratos de culturas de fungos do solo

Fungos do solo isolados dos substratos de viveiro que proporcionaram alguns indícios de antibiose no ensaio descrito no item 3.2., foram selecionados para outros testes. Como padrões foram selecionados isolados que apresentaram crescimento vigoroso mas que não evidenciaram antibiose.

3.3.1. Desenvolvimento de *P. tinctorius* em extratos autoclavados

Três isolados de *Trichoderma*, denominados TR-1, TR-4 e TR-7, 1 isolado de *Penicillium* (PN-10) e 1 isolado de *Mucoraceae* (MU-25), estes 2 últimos usados como padrões, foram cultivados, em meio líquido BD (batata-dextrose) contido em frascos de Erlenmeyer de 500 ml até a metade do volume, por 2 semanas, nas condições do ambiente. Os extratos produzidos foram separados das colônias por filtração em gaze e misturados com BD recentemente preparado, nas proporções de 25 % e 50 % v/v. Adicionou-se ágar, 20 g/litro e os meios assim obtidos foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C e 1 atm de pressão e vertidos para placas de Petri de 90 mm de diâmetro, aproximadamente 20 ml por placa. Como

testemunha foram preparadas placas com BDA, sem extrato fúngico. Para o centro de cada placa repicou-se 1 disco de meio retirado de colônias de *P. tinctorius* com 3 semanas de idade. As placas foram mantidas em câmara de crescimento, sob temperatura de 26-28 °C e escuro contínuo, por 4 semanas. Diâmetros cruzados das colônias de *P. tinctorius* foram medidos após 1, 2, 3 e 4 semanas de incubação. Para cada tratamento foram preparadas 4 repetições, dispostas em delineamento inteiramente casualizado.

3.3.2. Desenvolvimento de *P. tinctorius* em extratos filtrados

Extratos dos isolados TR-1, TR-4, TR-7 e PN-10 foram obtidos conforme descrito do item 3.3.1.. Após primeira filtração em gaze, os extratos foram filtrados, para separação dos propágulos fúngicos dos produtos do metabolismo, em membranas "Milipore", número 17, tipo HCWG, com poros de 0,7 µm, sob vácuo fornecido por bomba Basil-Primor 141. Os objetos e recipientes utilizados no processo de filtração foram previamente esterilizados por autoclavagem. Os extratos filtrados foram diluídos em BDA, resfriado para 60 °C após autoclavagem, nas proporções de 25 % e 50 % v/v e transferidos para placas de Petri, aproximadamente 20 ml por placa. Para o centro das placas foram repicados discos de meio, retirados dos bordos de colônias de *P. tinctorius* com 3 semanas de idade. Após 1, 2, 3 e 4 semanas de incubação a 26-28 °C em escuro contínuo, foram medidos os diâmetros cruzados das colônias de *P. tinctorius*. Para cada tratamento foram preparadas 4 repetições, dispostas em delineamento inteiramente casualizado.

3.4. Desenvolvimento de *P. tinctorius* pareado com bactérias do solo

Discos de meio com micélio de *P. tinctorius*, retirados dos bordos de colônias com 3 semanas de idade, foram repicados para o centro de placas de Petri com 90 mm de diâmetro, contendo BDA. Após 2 semanas de incubação em câmara de crescimento, sob temperatura de 26-28 °C e escuro contínuo as colônias do fungo mediam aproximadamente 30 mm de diâmetro. Nesse momento foram repicados para as placas os isolados bacterianos, colocados em 2 pontos, 1 de cada lado da colônia fúngica, a 10 mm dela, de modo a ficarem alinhadas. As placas foram mantidas em câmara de crescimento por mais 2 semanas, nas mesmas condições acima citadas. Na avaliação, mediu-se o diâmetro das colônias de *P. tinctorius* no sentido das colônias das bactérias pareadas e ~~no sentido~~ perpendicularmente oposto a elas. Foram testados 4 isolados bacterianos, B-40, B-41, B-43 e B-44, em 6 repetições, dispostas em delineamento inteiramente casualizado.

3.5. Parasitismo de fungos do solo em *P. tinctorius*

3.5.1. Método do micro-cultivo

Blocos de meio BDA, com 10 mm de lado e 2-3 mm de espessura, foram retirados de placas de Petri e transferidos para

outras placas também contendo BDA, distribuindo-se 5 blocos por placa. Sobre os blocos foram colocadas lamínulas, de 20 x 20 mm, esterilizadas em autoclave. Discos de meio retirados dos bordos de colônias de *P. tinctorius* com 3 semanas de idade, foram repicados para as placas, colocados próximos a um dos lados de cada bloco recoberto com lamínula, 1 disco por bloco. As placas foram mantidas em câmara de crescimento por 1 semana para promoção do crescimento inicial do micélio de *P. tinctorius* sob as lamínulas. Discos de meio retirados dos bordos de colônias dos isolados TR-1, TR-4, TR-7 e PN-10, foram repicados para as placas, colocados próximos aos blocos de meio, no lado oposto ao ocupado pelo fungo micorrízico. Foram preparadas 20 placas para cada isolado. As placas foram mantidas sob condições do ambiente por 2 semanas. Após 1 e 2 semanas de pareamento, 50 lamínulas de cada tratamento foram examinadas, sobre lâminas, ao microscópio ótico para verificação de possíveis sinais de parasitismo, como entrelaçamento ou perfuração de hifas. O método acima descrito foi adaptado a partir do método utilizado por PESSOA (1986).

3.5.2. Método do micro-cultivo modificado

Para placas de Petri contendo BDA foram transferidos 5 discos de meio com *P. tinctorius*, dispostos circularmente nas placas. As placas foram mantidas por 1 semana em câmara de crescimento para desenvolvimento inicial das colônias. Cobriu-se as colônias pré-formadas com lamínulas esterilizadas e as placas foram novamente mantidas em câmara de crescimento por mais 1 semana. Repicou-se para o centro de cada placa os isolados TR-1,

TR-4, TR-7 e PN-10, procedendo-se nova incubação por 2 semanas. Após 1 e 2 semanas de incubação foram retiradas 50 lamínulas de cada tratamento e examinadas, sobre lâminas, ao microscópio ótico, para verificação de sinais de parasitismo.

3.6. Acúmulo de compostos fenólicos nas raízes

Raízes de eucalipto, retiradas de plantas cultivadas nos tubos de ensaio, na ausência e na presença de microrganismos do solo, foram examinadas para verificar o acúmulo de compostos fenólicos. O método empregado para o cultivo das plantas encontra-se descrito no item 3.7.. Foram examinadas raízes de eucalipto crescidas nas seguintes condições: 1) ausência de microrganismos; 2) presença de *P. tinctorius*; 3) presença de *Trichoderma*, isolado TR-1; 4) presença de *Penicillium*, isolado PN-10; 5) presença de bactéria, isolado B-44; 6) presença de complexo de microrganismos, oriundo da turfa; 7) presença de complexo de microrganismos, oriundo do subsolo e 8) presença de complexo de microrganismos, oriundo da casca decomposta não fumigada. As raízes foram coletadas 1 semana após a transferência dos microrganismos isolados dos substratos para os tubos de ensaio. O método de inoculação encontra-se descrito do item 3.7.7.. Para avaliar o acúmulo de compostos fenólicos nas raízes empregou-se o método descrito a seguir. As raízes de eucalipto foram lavadas em água destilada, cortadas em pequenos pedaços e imersas em sulfato ferroso por 48 horas. Após, foi retirado o ar dos recipientes, permanecendo as raízes sob vácuo por 10 minutos. Foram novamente lavadas em água destilada por várias vezes e imersas em álcool

etílico 30 % por 12 horas e em álcool butílico terciário 50 %, 70 %, 85 %, 100 % e puro, por 12 horas em cada concentração. Para inclusão, os pedaços das raízes foram colocados em recipientes com parafina sólida a qual foi liquefeita em estufa a 60-63 °C. Os recipientes foram retirados da estufa, abertos, permanecendo assim por 3 dias para evaporação do álcool. A parafina foi novamente liquefeita, colocada em caixinhas, resfriada e recortada, formando blocos que foram fixados na mesa do micrótomo. Com micrótomo rotatório foram retiradas fitas com 9 µm de espessura. Lâminas recobertas com adesivo de Haupt, aquecidas sobre chapa a 48 °C, receberam água destilada e a seguir as fitas de parafina contendo as raízes cortadas. As lâminas foram retiradas da chapa, secas com papel toalha e colocadas em estufa a 35 °C por 24 horas. Para retirar a parafina, as lâminas foram colocadas em cubetas de vidro contendo xilol puro, por 30 minutos. Após secagem com papel toalha as lâminas receberam gotas de bálsamo do Canadá, foram cobertas com lamínulas e levadas novamente para estufa, a 35 °C, por 15 dias, para secagem. Os finos pedaços das raízes foram observados ao microscópio ótico e a presença de inclusões escuras registrada (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951). O acúmulo de compostos fenólicos nas raízes, avaliado pela coloração de inclusões presentes no cortex, foi registrado como presença de intensa coloração marrom (++), presença de fraca coloração marrom(+), presença de coloração marrom em alguns cortes mas não em outros (+ -) e ausência de coloração marrom (-) indicando ausência de acúmulo de compostos fenólicos.

3.7. Influência de microrganismos do solo na formação e desenvolvimento das ectomicorrizas

3.7.1. Características gerais dos experimentos

Três isolados de *Trichoderma*, 2 de *Penicillium*, 2 isolados bacterianos, os complexos dos microrganismos e os extratos autoclavados dos 3 substratos amostrados foram comparados, em condições controladas, quanto suas capacidades de interferência na formação e desenvolvimento de ectomicorrizas em plantas de *E. urophylla* inoculadas com *P. tinctorius*. Para cada tratamento foram feitas 5 repetições, dispostas em delineamento inteiramente casualizado.

3.7.2. Tratamento das sementes e pré-germinação

Sementes de *E. urophylla* foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio a 2 % durante 2 minutos e lavadas em água destilada esterilizada, para assepsia superficial e incubadas em placas de Petri sobre papel de filtro umedecido, por 24 horas. Repetiu-se a assepsia superficial e as sementes foram distribuídas em placas de Petri, 50 sementes por placa, sobre meio de cultura BDA. As Placas foram mantidas em estufa por 3 dias, sob temperatura de 26-28 °C e escuro contínuo, para pré-germinação.

3.7.3. Produção do inóculo ectomicorrízico

O isolado de *P. tinctorius* foi cultivado durante a condução dos experimentos em meio BDA. Para cada placa de Petri contendo BDA repicou-se 3 discos de colônias do fungo e as placas foram mantidas em câmara de crescimento a 26-28 °C, em escuro contínuo, por 3 semanas. Dos bordos das colônias formadas foram retirados, com furador de rolha, discos com 5 mm diâmetro e transferidos para placas com BDA, por 3 dias, para estimular a regeneração das pontas das hifas do fungo ectomicorrízico. Discos contaminados foram descartados.

3.7.4. Produção do inóculo dos microrganismos isolados dos substratos de viveiro

Os isolados de *Trichoderma* e *Penicillium* foram cultivados em BDA, sob condições do ambiente. A partir de colônias com 1 semana de idade foram preparadas as suspensões de conídios utilizadas como inóculo.

Colônias bacterianas dos isolados B-40 e B-44 foram mantidas em NA, por 1 semana sob condições do ambiente. Destas, foram preparadas as suspensões bacterianas.

3.7.5. Preparo do substrato para cultivo de *E. urophylla*

Tubos de ensaio medindo 18 x 360 mm receberam 1 ml de esfagno moído, 30 ml de vermiculita com grânulos de tamanho

médio e 20 ml de solução mineral de Melin-Norkrans modificada. A composição desta solução encontra-se especificada no Apêndice 1. Os tubos foram vedados e autoclavados por 30 minutos, a 120 °C e 1 atmosfera de pressão.

3.7.6. Transferência das sementes pré-germinadas para os tubos de ensaio e inoculação com *P. tinctorius*

Os tubos de ensaio contendo substrato receberam, após o resfriamento ao ambiente, 4-5 sementes pré-germinadas de *E. urophylla*, retiradas das placas de Petri juntamente com discos de meio de cultura. As sementes foram colocadas na superfície do substrato. Ao mesmo tempo, transferiu-se para os tubos componentes dos tratamentos com *P. tinctorius*, 2 discos de colônias pré-incubadas por 3 dias. Os discos foram colocados em lados opostos nos tubos, a 10 mm de profundidade.

Os tubos foram mantidos por 2 semanas em câmara de crescimento, sob temperatura de 26-28 °C e luz fluorescente fornecida por 4 lâmpadas de 40 watts alternada com escuro, 14 por 10 horas.

3.7.7. Inoculação com microrganismos isolados dos substratos de viveiro

O inóculo dos isolados de *Trichoderma* e *Penicillium* consistiu de suspensão de conídios em água esterilizada, calibrada, através de hemocitômetro de Neubauer, para concentração de 6×10^6 conídios/ml.

Como inóculo bacteriano dos isolados B-40 e B-44 utilizou-se suspensão de células em água esterilizada, calibrada pra $1,5 \times 10^8$ células/ml pelo método de McFarland (KIRÁLY et ali-i, 1974).

As suspensões de inóculo dos complexos microbianos dos substratos turfa, subsolo e casca decomposta foram obtidas pela mistura de 1 g destes a 9 ml de água destilada esterilizada, em tubos de ensaio e os extratos foram obtidos autoclavando-se uma réplica destas suspensões.

Com pipeta esterilizada transferiu-se 0,5 ml das suspensões dos inóculos e dos extratos para os tubos de ensaio componentes dos tratamentos.

A transferência dos microrganismos do solo foi realizada 2 semanas após a semeadura nos tratamentos onde permaneceram ativos e 1 semana antes da semeadura nos tratamentos onde foram inativados. Para estes, procedeu-se a autoclavagem do substrato nos tubos por 30 minutos, a transferência do inóculo, a incubação por 1 semana em câmara de crescimento, nova autoclavagem, resfriamento ao ambiente e semeadura.

3.7.8. Incubação

Os tubos permaneceram em câmara de crescimento, nas mesmas condições descritas no item 3.7.6., por mais 6 semanas, para desenvolvimento das plantas e das ectomicorrizas. Antes da incubação procedeu-se o desbaste, com tesoura flambada, deixando-se 3 plantas por tubo.

3.7.9. Avaliação do desenvolvimento ectomicorrízico

Para avaliação da quantidade de ectomicorrizas formadas, as plantas foram retiradas dos tubos de ensaio e a vermiculita removida das raízes por lavagem. Os sistemas radiculares foram imersos em azul algodão a 1 % em lactofenol, lavadas suavemente em água destilada e a quantidade de raízes colonizadas pelo fungo ectomicorrízico foi medida, sob microscópio estereoscópico (BOWEN & THEODOROU, 1979; GARBAYE et alii, 1988; GARBAYE & BOWEN, 1989). A intensidade de colonização foi expressa em porcentagem de raízes laterais recobertas pelo manto fúngico (THEODOROU & REDDELL, 1991). Para facilitar a estimativa da quantidade de ectomicorrizas formadas, as raízes foram avaliadas sobre uma escala numérica confeccionada em papel milimétrico.

3.7.10. Peso da matéria seca das plantas

A parte aérea das 3 plantas constituintes de cada parcela, separadas dos sistemas radiculares ao nível do colo, foram secas em estufa a 80 °C por 48 horas e seus pesos determinados em balança de precisão milesimal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Microrganismos isolados dos substratos de viveiro

A população fúngica variou nos diferentes substratos. O número de propágulos presentes na turfa foi maior que nos demais substratos. Tratando-se de um substrato complexo e com alto teor de matéria orgânica, é provável que a turfa naturalmente seja habitada por numerosa população microbiana. Apesar de não terem diferido estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a população fúngica foi pelo menos 4 vezes maior na casca decomposta fumigada com brometo de metila que em não fumigada, indicando que houve recolonização após a fumigação (Tabela 1). A frequência de *Trichoderma* foi maior na casca decomposta, fumigada ou não, comparada com turfa ou subsolo, contrastando com a presença de *Penicillium*, maior nestes últimos substratos. Na casca decomposta fumigada destacou-se a população de fungos da família *Mucoraceae* (Tabela 2).

A presença e frequência de espécies de *Trichoderma* nos substratos avaliados merece ser destacada pois o gênero é bastante conhecido pelo seu antagonismo a fitopatógenos tendo uso potencial no controle biológico de doenças de plantas (HADAR et alii, 1979; PUNJA, 1985).

Casca de eucalipto decomposta e fumigada com brometo de metila foi o substrato onde se detectou a maior população

Tabela 1 - População fúngica e bacteriana em três substratos de viveiro: casca de eucalipto decomposta (CED), fumigada (F) ou não (NF) com brometo de metila, subsolo e turfa.

Substratos	Número de propágulos por g de substrato	
	Fungos	Bactérias
CED (NF)	$9,00 \times 10^3$ b*	$6,15 \times 10^6$ b
CED (F)	$39,75 \times 10^3$ b	$115,25 \times 10^6$ a
Subsolo	$7,75 \times 10^3$ b	$1,33 \times 10^6$ b
Turfa	$19,55 \times 10^5$ a	$0,95 \times 10^6$ b

* Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

CV Fungos = 29,71;

DMS Fungos (5 %) = 313.810,97

CV Bactérias = 22,36

DMS Bactérias (5 %) = 14.519.319,30

Tabela 2 - Frequência (%) de fungos isolados de três substratos de viveiro: casca de eucalipto decomposta (CED), fumigada (F) ou não (NF) com brometo de metila, subsolo e turfa.

Substratos	Fungos isolados				Outros
	<i>Tricho-</i> <i>derma</i>	<i>Penicil-</i> <i>lium</i>	<i>Clados-</i> <i>porium</i>	<i>Mucora-</i> <i>ceae</i>	
CED (NF)	63,8	5,6	5,6	0,0	25,0
CED (F)	29,4	2,9	0,0	67,7	0,0
Subsolo	0,0	71,0	9,6	0,0	19,4
Turfa	13,3	83,7	1,0	0,0	2,0

bacteriana (Tabela 1). Ou a fumigação estimulou o aumento da população remanescente de bactérias ou propiciou a recolonização por espécies pioneiras, como foi constatado para fungos.

BOWEN & THEODOROU (1979) isolaram bactérias de solo de viveiro, da rizosfera e da micorrizosfera de *Pinus radiata* e verificaram a interação entre elas (8 isolados) e 5 espécies de fungos ectomicorrízicos. Alguns isolados não influenciaram, outros estimularam e outros inibiram o crescimento dos fungos ectomicorrízicos. Diferentes espécies de *Penicillium* e de *Trichoderma*, entre outros fungos, foram isolados de ectomicorrizas, através de lavagem seriada, formadas por *Laccaria bicolor* em *Picea mariana* (SUMMERBELL, 1989). Fungos e bactérias foram isolados do manto de ectomicorrizas formadas por *Rhizopogon luteolus* em *Pinus radiata*, por GARBAYE & BOWEN (1989). Entre as bactérias predominaram tipos Gram negativos e entre os fungos *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* spp. e *Trichoderma viride*.

Espécies de fungos e bactérias presentes nos substratos avaliados podem, eventualmente, interagir com fungos ectomicorrízicos neles introduzidos, com a vantagem de estarem estabelecidos.

A princípio, a população microbiana dos substratos foi levantada para que representantes dela fossem utilizados nos testes subsequentes visando evidenciar antagonismo ao fungo ectomicorrízico. A população foi determinada somente uma vez, aproximadamente 1 mês após a coleta dos substratos. Para demonstrar a hipótese da recolonização microbiana seria necessário que a população fosse levantada periodicamente, após a autoclavagem ou fumigação dos substratos.

4.2. Triagem dos isolados

Os fungos e bactérias que apareceram com maior frequência nos 3 substratos amostrados, separados pela cor e forma das colônias no Meio de Martin ou no Meio de Extrato de solo, constam da Tabela 3. Foram obtidos 10 isolados do gênero *Trichoderma*, 7 de *Penicillium*, 2 de *Cladosporium*, 2 da família *Mucoraceae* e 9 isolados bacterianos. Considerando as diferenças entre os diâmetros cruzados das colônias de *P. tinctorius* (Tabela 3), pareadas em BDA com estes microrganismos, 5 isolados de *Trichoderma* (TR- 1, TR-4, TR-7, TR-8 e TR-9) e 1 isolado bacteriano (B-44) apresentaram evidências de antibiose, deformando as colônias de *P. tinctorius* ou apresentando halo de inibição. Todos os isolados de *Trichoderma*, porém, paralizaram o desenvolvimento das colônias de *P. tinctorius* após o contato entre eles. Os demais isolados de fungos e bactérias não apresentaram quaisquer evidências de antibiose (Tabela 3). Para os testes posteriores foram selecionados alguns isolados de microrganismos que apresentaram e outros que não apresentaram evidências de antibiose no teste preliminar. Os que não apresentaram evidências de antibiose foram usados com padrões.

4.3. Desenvolvimento de *P. tinctorius* nos meios com extratos de culturas de fungos do solo

Através da autoclavagem, método relativamente sim-

ples de esterilização, foi possível a obtenção de meios com a maioria dos extratos de culturas dos isolados testados. Somente o meio preparado com o extrato de cultura do isolado TR-7 de *Trichoderma* na proporção de 50 % v/v não solidificou. O extrato de cultura desse isolado atingiu, antes da autoclavagem pH 3,12. A acidez do meio foi atribuída a liquefação do ágar.

O gênero *Trichoderma* é reconhecido pelo seu antagonismo a outros fungos (MAROIS & MITCHELL, 1981; PUNJA, 1985; SUMMERBELL, 1987; MELO, 1991). Por apresentarem essa característica, evidenciada no teste preliminar, foram selecionados principalmente isolados de *Trichoderma*, entre os isolados fúngicos obtidos dos substratos, para o pareamento com *P. tinctorius*. Como padrões foram selecionados os isolados MU-25 e PN-10, que apresentaram crescimento vigoroso em BDA e aparentemente não inibiram *P. tinctorius*.

Tabela 3 - Diâmetro das colônias de *P. tinctorius* pareado em BDA com microrganismos isolados de substratos de viveiro, tomados na direção das colônias dos isolados (DI) e na direção perpendicular (DP) a eles (médias de 2 repetições).

Microrganismos	Denominação do isolado	Diâmetro das colônias (mm)	
		DI	DP
<i>Trichoderma</i>	TR-1	25,0	30,0
<i>Trichoderma</i>	TR-2	28,0	28,0
<i>Trichoderma</i>	TR-3	28,5	29,0
<i>Trichoderma</i>	TR-4	27,5	30,0
<i>Trichoderma</i>	TR-5	25,5	24,5
<i>Trichoderma</i>	TR-6	25,5	25,5
<i>Trichoderma</i>	TR-7	26,5	29,5
<i>Trichoderma</i>	TR-8	28,0	35,5
<i>Trichoderma</i>	TR-9	21,5	23,5
<i>Trichoderma</i>	TR-9.1	27,0	27,0
<i>Penicillium</i>	PN-10	37,5	37,0
<i>Penicillium</i>	PN-11	35,0	35,5
<i>Penicillium</i>	PN-12	35,0	36,0
<i>Penicillium</i>	PN-14	35,0	34,0
<i>Penicillium</i>	PN-16	37,5	37,0
<i>Penicillium</i>	PN-17	36,0	35,0
<i>Penicillium</i>	PN-19	29,5	30,5
<i>Cladosporium</i>	CL-21	39,0	39,0
<i>Cladosporium</i>	CL-22	36,0	36,5
<i>Mucoraceae</i>	MU-25	33,0	33,0
<i>Mucoraceae</i>	MU-26	34,0	34,0
Bactéria	B-40	39,0	39,0
Bactéria	B-41	33,5	34,0
Bactéria	B-42	34,0	34,0
Bactéria	B-43	34,0	34,0
Bactéria	B-44	30,5	33,5
Bactéria	B-45	38,0	37,0
Bactéria	B-46	38,5	38,0
Bactéria	B-47	32,5	33,5
Bactéria	B-48	38,5	38,5
Testemunha	-	38,0	38,0

Os extratos de culturas de *Trichoderma* proporcio-

naram redução no crescimento radial de *P. tinctorius*, com exceção do extrato do isolado TR-1 na proporção de 25% (Tabela 4).

Tabela 4 - Diâmetros médios de colônias (mm) de *P. tinctorius* cultivado em BDA contendo extrato autoclavado de culturas de isolados fúngicos oriundos de substratos de viveiro.

Extratos dos isolados	Concentrações (% v/v)	Tempo de incubação (dias)				Médias das avaliações
		7	14	21	28	
TR-1	50	11,6	20,5	34,1	45,9	28,0 cd*
TR-1	25	13,5	24,5	41,0	45,0	33,2 abc
TR-4	50	9,8	18,5	29,9	37,6	23,9 d
TR-4	25	12,4	24,8	37,8	51,4	31,6 bc
TR-7	25	10,2	17,9	29,0	41,0	24,5 d
MU-25	50	15,9	31,9	44,1	53,1	36,2 ab
PN-10	50	14,8	28,8	43,5	55,5	35,6 ab
Testemunha	--	15,6	31,5	48,8	58,4	38,6 a

TR = *Trichoderma*; PN = *Penicillium*; MU = *Mucoraceae*

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de tukey.

DMS (5 %) = 5,347; CV = 7,258 %

Os isolados MU-25 e PN-10 não reduziram o crescimento de *P. tinctorius*. Possivelmente a redução proporcionada por *Trichoderma* deveu-se à produção de substâncias inibidoras e não à exaustão de nutrientes do meio de cultura.

O extrato de cultura do isolado MU-25 não fluíu pelo filtro "Milipore", impedindo a filtração e consequente in-

clusão no teste com extratos filtrados.

Os resultados obtidos com os extratos filtrados (Tabela 5) foram semelhantes àqueles obtidos com os extratos autoclavados.

Tabela 5 - Diâmetros médios de colônias (mm) de *P. tinctorius* cultivado em BDA contendo extratos filtrados de culturas de isolados fúngicos oriundos de substratos de viveiro.

Extratos dos isolados	Concentrações (% v/v)	Tempo de incubação (dias)				Médias das avaliações
		7	14	21	28	
TR-1	50	10,4	17,5	32,8	42,8	25,8 b*
TR-1	25	10,9	22,5	39,1	55,8	32,1 b
TR-4	50	7,8	8,8	11,1	14,0	10,4 c
TR-4	25	11,9	18,6	34,4	50,0	28,7 b
TR-7	50	9,0	9,2	10,5	10,6	9,8 c
TR-7	25	9,9	19,8	35,2	52,9	29,4 b
PN-10	50	18,6	33,2	49,6	62,6	41,0 a
Testemunha	--	16,0	27,0	47,0	65,0	38,8 a

TR = *Trichoderma*; PN = *Penicillium*

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

DMS (5 %) = 6,688 CV = 10,575 %

Os extratos de culturas de *Trichoderma*, filtrados, também reduziram o crescimento radial de *P. tinctorius*. Do mesmo

modo, o crescimento de *P. tinctorius* no meio com extrato de PN-10 foi similar ao crescimento no meio testemunha, sem extrato. O aumento da concentração do extrato de TR-1 no meio não proporcionou redução significativa no crescimento de *P. tinctorius*. Porém, com os extratos dos isolados TR-4 e TR-7, inibidores mais efetivos, maior concentração significou maior redução (Tabela 5).

Verificou-se, em todos os tratamentos, crescimento praticamente constante de *P. tinctorius* entre os intervalos de tempo considerados nas avaliações, indicando a persistência do efeito inibidor durante a condução dos experimentos (Figura 1 e Figura 2).

Alguns trabalhos tem relatado o efeito inibidor de espécies de *Trichoderma* a fungos ectomicorrízicos (SINCLAIR et alii, 1982; SUMMERBELL, 1987). Porém, o mecanismo envolvido na inibição não foi concretamente esclarecido. SUMMERBELL (1987), em um experimento desenvolvido em meio de cultura para verificar a ocorrência de parasitismo de *T. viride* em *Laccaria laccata*, constatou que as colônias do fungo micorrízico pararam de crescer após o contato com *T. viride* e levantou a possibilidade da existência de antibiose. Os resultados obtidos no presente trabalho com os extratos autoclavados e filtrados de culturas de *Trichoderma*, inibindo o crescimento de *P. tinctorius* em meio de cultura, indicaram a possibilidade da antibiose estar envolvida na inibição da formação e desenvolvimento de ectomicorrizas.

4.4. Desenvolvimento de *P. tinctorius* pareado com bactérias do solo

Devido ao crescimento relativamente lento no meio de cultura, *P. tinctorius* foi transferido para as placas de Petri duas semanas antes da repicagem dos isolados bacterianos. Embora seja conhecido que *P. tinctorius* secrete metabólitos inibidores no meio (KOPE & FORTIN, 1990), aparentemente o crescimento das colônias bacterianas não foi afetado pelo fungo ectomicorrízico.

Dos quatro isolados bacterianos testados, somente o isolado B-44 interferiu no crescimento radial de *P. tinctorius*. Observou-se a existência de halo de inibição entre as colônias quando o isolado B-44 foi pareado com *P. tinctorius*. Os demais isolados (B-40, B-41 e B-43) não mostraram quaisquer evidências de antagonismo (Figura 3). As colônias de *P. tinctorius* cresceram sobre as colônias destes isolados.

Relações entre os diâmetros das colônias de *P. tinctorius* tomados na direção das colônias dos isolados bacterianos (A) e os diâmetros perpendiculares aos primeiros (B), foram calculadas para fins de análise estatística.

Redução no crescimento de colônias de fungos ectomicorrízicos pareados com bactérias do solo foi verificada por BOWEN & THEODOROU (1979). Oito isolados bacterianos foram pareados com cinco espécies de fungos ectomicorrízicos em diferentes meios de cultura. A redução no crescimento dos fungos provocada pelas bactérias foi influenciada pelo tipo de meio. Em BDA, a maioria dos isolados bacterianos reduziu o crescimento da maioria dos fungos testados.

Figura 1 - Crescimento radial de colônias de *P. tinctorius* em BDA contendo extrato autoclavado de culturas de fungos isolados de substratos de viveiro, nas concentrações de 25 % e/ou 50 % v/v e coeficientes de determinação linear (r^2).

Figura 2 - Crescimento radial de colônias de *P. tinctorius* em BDA contendo extrato filtrado de culturas de fungos isolados de substratos de viveiro, nas concentrações de 25 % e/ou 50 % v/v e coeficientes de determinação linear (r^2).

Resultados de interações entre microrganismos, obtidos em meio de cultura, muitas vezes tem pequena relação com os obtidos na rizosfera (BOWEN & TEODOROU, 1979; GARBAYE & BOWEN, 1989), por isso devem ser considerados com certas reservas. Tais resultados, entretanto, podem ser valiosos nos estudos dos mecanismos envolvidos nas interações (GARBAYE & BOWEN, 1989).

4.5. Parasitismo de fungos do solo em *P. tinctorius*

Em nenhuma das lâminas preparadas, contendo sobre elas lamínulas com os isolados fúngicos pareados pelo método do micro-cultivo, foram observados sinais de parasitismo, como perfurações nas hifas de *P. tinctorius* ou enrolamento de hifas dos isolados sobre as hifas do fungo ectomicorrízico. As hifas de *P. tinctorius* foram facilmente distinguidas das hifas dos isolados fúngicos (TR-1, TR-4, TR-7 e PN-10) pela sua coloração mais escura e pela presença de grampos de conexão.

As hifas do fungo ectomicorrízico cresceram somente nos bordos das lamínulas e não entre elas e os blocos de meio de cultura como era esperado. Decidiu-se então pela modificação do método e as lamínulas foram colocadas diretamente sobre colônias de *P. tinctorius*. Desta forma, tanto *P. tinctorius* como os isolados fúngicos pareados cresceram sob toda a lamínula. Também neste experimento não foram verificados sinais de parasitismo, confirmando os resultados obtidos pelo método do micro-cultivo.

ELAD et alii (1983), observaram a ocorrência de parasitismo de *Trichoderma* spp. sobre os fungos fitopatogênicos

Figura 3. Crescimento de colônias de *P. tinctorius** em BDA, após duas semanas de pareamento com bactérias isoladas de substratos de viveiro.

* = foi previamente incubado por 2 semanas.

A = diâmetro medido na direção das colônias bacterianas

B = diâmetro medido na direção perpendicularmente oposta

Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre os isolados, pelo teste de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade.

Sclerotium rolfSii e *Rhizoctonia solani*. Hifas de *Trichoderma* perfuraram as hifas dos fungos hospedeiros, em detrimento destes. *TrichoDerma viride* foi pareado em meio de cultura com o fungo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* por SUMMERBELL (1987), para detectar quaisquer dos sinais clássicos de parasitismo como enrolamento de hifas, perfuração ou coagulação do citoplasma do hospedeiro. Sinais de parasitismo não foram observados apesar das colônias de *L. bicolor* terem sido recobertas por *T. viride*, paralisando o crescimento. Resultados similares foram obtidos no presente trabalho, porém, como ressaltou SUMMERBELL (1987), os resultados negativos obtidos em meio de cultura, rico em nutrientes, não eliminam a possibilidade de espécies de *Trichoderma* parasitarem *P. tinctorius* em outras condições.

4.6. Formação de inclusões escuras nas raízes de *E. urophylla*

Os resultados obtidos referentes ao acúmulo de compostos fenólicos nas raízes de plantas de *E. urophylla* crescidas na presença de microrganismos do solo constam da Tabela 6.

Presença constante de inclusões escuras nas células do cortex das raízes foram observadas somente na interação com *Penicillium* (isolado PN-10). *P. tinctorius* e o isolado bacteriano B-44 não induziram acúmulo de fenóis nas raízes. Com relação ao isolado TR-1 de *Trichoderma* e com os complexos presentes na turfa, subsolo ou na casca de eucalipto decomposta, observaram-se resultados variáveis. Coloração marrom escura foi observada em alguns dos cortes. Na maioria deles a coloração não diferiu

da coloração dos cortes das raízes das plantas testemunhas crescidas na ausência de microrganismos.

As raízes foram coletadas uma semana após a inoculação com os microrganismos. Após uma semana as plantas inoculadas com os isolados de *Trichoderma* ou com os complexos microbianos mostraram sintomas de murcha que rapidamente evoluíram para seca, impossibilitando a interação por maior tempo. Para possibilitar comparação, as raízes das plantas dos outros tratamentos foram coletadas também uma semana após a inoculação. A inconsistência nos resultados com os isolados de *Trichoderma* ou com os complexos microbianos pode ter sido decorrente da curta duração da interação, não proporcionando tempo suficiente para o acúmulo de fenóis em todas as raízes ou decorrente do bloqueio no metabolismo das plantas imposto pela forte antibiose.

Os resultados obtidos, apesar de não serem conclusivos, indicaram a possibilidade de microrganismos do solo induzirem as raízes a produzir compostos fenólicos e, conseqüentemente, inibirem a formação e manutenção de ectomicorrizas.

Fenóis são compostos que possuem anel benzênico ligado a grupos como hidroxila, carboxila ou metoxila e, muitas vezes, com outras estruturas anelares não aromáticas. Com certas importantes exceções, a função da maioria dessas substâncias são obscuras. Porém, são conhecidos alguns compostos fenólicos que atuam na resistência de certas plantas às doenças (SALISBURY & ROSS, 1978).

Além da conhecida função exercida nas interações entre plantas e patógenos, o acúmulo de compostos fenólicos tem sido relatado em alguns sistemas micorrízicos. Segundo MARX

(1969), fungos ectomicorrízicos podem induzir resistência à infecção por fitopatógenos estimulando as células a elaborar compostos fenólicos. Neste sentido, SYLVIA & SINCLAIR (1983) observaram que o fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata* e seus metabólitos induziram acúmulo de compostos fenólicos nas células corticais das raízes primárias de *Pseudotsuga menziesii*. As raízes, incubadas com *L. laccata*, seus metabólitos ou com inóculo inativado, foram inoculadas com os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Pythium irregulare*. A infecção cortical pelos fitopatógenos foi significativamente menor em plântulas pareadas com *L. laccata* ou seus metabólitos que na testemunha. O acúmulo de fenóis induzido por *L. laccata* foi relacionado com a resistência à infecção. O acúmulo de compostos fenólicos nas raízes pode ainda ser relacionado com a especificidade entre fungo micorrízico e planta hospedeira. Diferenças foram observadas quando variou: o tipo de raiz, sendo maior nas raízes longas de pinos que nas curtas (PICHÉ et alii, 1981); o genótipo do hospedeiro (TONKIN et alii, 1989; THOEN et alii, 1990); o genótipo do fungo micorrízico (MALAJCZUK et alii, 1987; TONKIN et alii, 1989; THOEN et alii, 1990) ou a maturidade do hospedeiro (TONKIN et alii, 1989). LING-LEE et alii (1977) e TONKIN et alii (1989), em combinações simbióticas constantes, verificaram maior quantidade de fenóis em raízes de eucalipto colonizadas que em raízes não colonizadas, ocorrendo correlação positiva entre a falta de desenvolvimento ectomicorrízico e a abundância de fenóis. Como frisaram LING-LEE et alii (1977), fenóis produzidos pelo hospedeiro podem funcionar como selecionadores biológicos, de tal modo que somente fungos tolerantes a esses compostos podem estabelecer relação simbiótica

com a planta hospedeira. Em adição, segundo THOEN (1991), o acúmulo de fenóis possibilita, presumivelmente, o controle da agressividade do fungo ectomicorrízico.

A indução ao acúmulo de fenóis não é exclusividade das associações simbióticas. SYLVIA & SINCLAIR (1983) verificaram acúmulo de fenóis em raízes de *Pseudotsuga menziesii* induzido por microrganismos considerados saprófitas. Plântulas pareadas com *Pseudomonas cepacia* ou *Trichoderma harzianum*, em Condições axênicas, acumularam fenóis em densidade comparável à induzida pelo fungo Ectomicorrízico *L. laccata*. *Epicoccum purpurascens*, um saprófita comum do solo, induziu somente um fraco e difuso acúmulo. A esses microrganismos foi atribuída a possibilidade de induzirem resistência à infecção por fitopatógenos.

Observou-se, no presente trabalho, que *Penicillium* sp. e *Trichoderma* induziram a formação de inclusões escuras indicando acúmulo de compostos fenólicos em raízes de *E. urophylla*. Não foram obtidas evidências diretas do papel exercido pelos fenóis acumulados nas raízes de *E. urophylla*. Porém, sabendo-se que o acúmulo de fenóis induzido por fitopatógenos pode se constituir em mecanismo de resistência às doenças por eles causadas, que o acúmulo de fenóis induzido por fungos ectomicorrízicos interfere na ação de fitopatógenos ou dos próprios fungos ectomicorrízicos e que o acúmulo de fenóis induzido por microrganismos saprófitas do solo podem induzir resistência aos fitopatógenos é provável que o acúmulo de fenóis induzido por microrganismos saprófitas do solo possam também inibir a formação e desenvolvimento de ectomicorrizas.

4.7. Influência de microrganismos do solo no desenvolvimento das ectomicorrizas

Nas plantas inoculadas com *P. tinctorius* em média 93,6 % do sistema radicular foi colonizado. Houve, portanto, um incremento na colonização do sistema radicular de aproximadamente 74 %, a partir dos 19,5 % inicialmente considerados (Tabela 6).

Nos tratamentos que receberam os isolados de *Trichoderma* ou os complexos microbianos da turfa ou da casca decomposta verificou-se a paralização do desenvolvimento do fungo ectomicorrízico, a alteração da cor do seu micélio e a porcentagem do sistema radicular colonizado regrediu, a partir da quantidade inicial verificada no momento da inoculação. Somente resquícios do manto fúngico foram observados após as seis semanas de incubação. Nestes tratamentos ocorreu a morte das plantas, com os sintomas de murcha sendo observados a partir de uma semana da inoculação. No tratamento que recebeu o complexo microbiano do subsolo verificou-se a morte das plantas em uma das cinco repetições. Pela presença constante nos tubos com plantas mortas, *Trichoderma* foi considerado causador do efeito deletério.

P. tinctorius não colonizou as raízes das plantas nos tratamentos onde *Trichoderma* foi previamente cultivado por uma semana e inativado por autoclavagem (Tabela 7). Estes resultados indicam que *Trichoderma* inibiu *P. tinctorius* por antibiose e que o efeito inibidor foi termoe estável. A inativação do *Trichoderma* possibilitou, porém, o desenvolvimento da planta hospedeira, havendo crescimento comparável com o das plantas testemunhas,

em termos de peso do matéria seca da parte aérea (Tabela 7).

Tabela 6 - Efeito de microrganismos do solo na formação de inclusões indicadoras do acúmulo de compostos fenólicos no cortex das raízes, no desenvolvimento de ectomicorizas e no peso da matéria seca da parte aérea de *E.urophylla* inoculado com *P. tinctorius* *in vitro*.

Tratamentos	% Colonização ¹		Inclu- sões	Peso (mg) ¹
	inicial	final		
Testemunha	-	-	(-)	16,69 a
<i>P. tinctorius</i> (Pt)	19,5	93,6 a	(-)	12,18 ab
TR-1	-	-	(+ -)	plantas mortas
Pt + TR-1	20,0	6,2 d	-	plantas mortas
TR-4	-	-	-	plantas mortas
Pt + TR-4	20,1	7,0 d	-	plantas mortas
TR-7	-	-	-	plantas mortas
Pt = TR-7	20,5	4,4 d	-	plantas mortas
PN-10	-	-	(+)	13,88 ab
Pt + PN-10	20,0	78,0 bc	-	12,32 ab
PN-16	-	-	-	8,67 b
Pt + PN-16	19,9	66,4 c	-	10,64 ab
B-40	-	-	-	11,23 ab
Pt + B-40	20,4	88,4 ab	-	17,95 a
B-44	-	-	(-)	13,64 ab
Pt + B-44	20,6	94,0 a	-	18,52 a
Complexo da turfa (CT)	-	-	(+ -)	plantas mortas
Pt + CT	20,5	1,2 d	-	plantas mortas
Pt + extrato de turfa	20,1	91,6 a	-	14,00 ab
Complexo do subsolo (CSS)	-	-	(+ -)	plantas mortas
Pt + CSS	19,8	85,4 ab	-	12,69 ab
Pt + extrato de subsolo	20,2	90,6 a	-	14,45 ab
Complexo da casca (CC)	-	-	(+ -)	plantas mortas
Pt + CC	20,6	1,4 d	-	plantas mortas
Pt + extrato de casca	20,4	89,6 ab	-	13,02 ab

¹ % inicial = após 2 semanas de incubação. % final = após mais 6 semanas de incubação.

(-) ausência de inclusões; - não avaliado; (+) presença de inclusões; (+ -) presença de inclusões em alguns cortes e ausência em outros.

TR = *Trichoderma*; PN = *Penicillium*; B = Bactéria

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

CV da % de colonização = 14,6 %; CV do peso = 26,7 %

Não foram observadas diferenças significativas entre os isolados de *Trichoderma* quanto aos efeitos no desenvolvimento ectomicorrízico ou na planta hospedeira (Tabelas 6 e 7).

Tabela 7 - Efeito de microrganismos do solo, inativados por autoclavagem após incubação por 7 dias, no desenvolvimento de ectomicorrizas e no peso da matéria seca da parte aérea de *E. urophylla* inoculado com *P. tinctorius* *in vitro*.

Tratamentos	% de colonização ¹	Peso (mg)
01. Testemunha	-	16,33 abc
02. <i>P. tinctorius</i> (Pt)	93,4 a	13,47 bc
03. Pt + TR-1	1,6 d	14,89 abc
04. Pt + TR-4	2,4 d	14,64 abc
05. Pt + TR-7	1,4 d	14,81 abc
06. Pt + PN-10	70,6 abc	9,84 c
07. Pt + PN-16	58,0 bc	9,93 c
08. Pt + B-40	79,0 ab	21,65 a
09. Pt + B-44	93,0 a	14,01 bc
10. Pt + complexo da turfa	2,0 d	14,69 abc
11. Pt + complexo do subsolo	50,0 c	13,55 bc
12. Pt + complexo da casca	7,0 d	17,57 ab
CV (%)	30,67	22,89
DMS (5 %)	27,41	7,26

¹ Médias de 5 repetições.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

TR = *Trichoderma*; PN = *Penicillium*; B = Bactéria.

Os isolados de *Penicillium* reduziram a porcentagem de raízes colonizadas por *P. tinctorius*, mas com menor intensidade que os isolados de *Trichoderma* (Tabela 6). Redução semelhante foi verificada quando *P. tinctorius* desenvolveu-se nos substratos onde os isolados de *Penicillium* cresceram e foram inativados (Tabela 7), indicando ausência de competição. Competição poderia ser sugerida se a porcentagem de raízes colonizadas fosse maior nos tratamentos com os isolados de *Penicillium* inativados. Não foram observadas diferenças entre os isolados de *Penicillium* em afetar o desenvolvimento ectomicorrízico. *Penicillium*, porém, reduziu o peso da matéria seca da parte aérea das plantas, principalmente o isolado PN-16 (Tabelas 6 e 7).

A porcentagem de raízes colonizadas nos tratamentos que receberam 0,5 ml de extrato autoclavado dos substratos turfa, subsolo ou casca decomposta foi semelhante à porcentagem verificada no tratamento padrão (contendo somente *P. tinctorius*), mostrando que o conteúdo extra-inóculo presente no inoculante não interferiu no desenvolvimento ectomicorrízico (Tabela 6).

Os isolados bacterianos testados, B-40 e B-44, não inibiram o desenvolvimento ectomicorrízico e a porcentagem de raízes colonizadas foi semelhante entre os isolados e entre os tratamentos onde cresceram continuamente e aqueles autoclavados (Tabelas 6 e 7).

Nos tratamentos onde foram inoculados os isolados de *Trichoderma*, os complexos de microrganismos da turfa e da casca de eucalipto decomposta, fumigada ou não, verificou-se a morte das plantas em todas as repetições. No tratamento com complexo oriundo do subsolo, somente as plantas de uma parcela morreram.

Os isolados de *Penicillium* e os bacterianos aparentemente não causaram efeito deletério às plantas (Tabela 6).

Segundo citação de LINDERMAN (1988), alguns microrganismos, tais como *Azotobacter*, certas bactérias fluorescentes e *Trichoderma*, aumentaram o desenvolvimento de ectomicorrizas quando presentes no momento da inoculação. Outros, porém mostraram efeito inibidor. SINCLAIR et alii (1982) observaram que *Trichoderma* sp. retardou o desenvolvimento de ectomicorrizas formadas por *L. laccata* em *P. menziesii*. Do mesmo modo, segundo SUMMERBELL (1987), duas espécies de *Trichoderma*, *T. viride* e *T. polysporum* foram fortemente antagônicas à formação de ectomicorrizas em *P. mariana* por *L. bicolor*. Porém, outros microrganismos do solo, entre os quais *Penicillium spinulosum*, não inibiram o desenvolvimento ectomicorrízico.

Similarmente aos resultados encontrados relatando efeitos de fungos, trabalhos têm mostrado que bactérias do solo exercem variados efeitos sobre a formação de ectomicorrizas. Diferentes isolados bacterianos exerceram efeito inibidor ou estimulante na formação de ectomicorrizas por diferentes fungos (BOWEN & THEODOROU, 1979; OLIVEIRA & GARBAYE, 1989). Alguns isolados foram aparentemente neutros (BOWEN & THEODOROU, 1979). Os isolados bacterianos testados no presente trabalho não inibiram a formação e o desenvolvimento ectomicorrízico em *E. urophylla* por *P. tinctorius*, apesar do isolado B-44 ter inibido o seu desenvolvimento em meio de cultura.

De modo geral, pelos resultados obtidos, constatou-se que alguns dos isolados microbianos testados inibiram a formação e o desenvolvimento ectomicorrízico e que outros não.

Nesse sentido, os resultados assemelharam-se aos obtidos por BOWEN & THEODOROU (1979); SINCLAIR et alii (1982); SUMMERBELL (1987); LINDERMAN (1988); OLIVEIRA & GARBAYE (1989); GARBAYE & BOWEN (1989) e RICHTER (1989). Dos 5 isolados fúngicos avaliados 3 deles, os isolados TR-1, TR-4 e TR-7, inibiram significativamente a colonização das raízes de *E. urophylla* por *P. tinctorius*. Um isolado de *Penicillium* (PN-16) também inibiu a colonização ectomicorrízica mas em intensidade menor que as dos isolados de *Trichoderma*. Os complexos microbianos oriundos dos substratos de viveiro, especialmente daqueles com maior população microbiana (turfa e casca de eucalipto decomposta), também inibiram a colonização ectomicorrízica. *Trichoderma*, originário dos complexos, predominou nos tubos, sendo, provavelmente, o principal causador da inibição. O gênero *Trichoderma* é bastante conhecido pelo seu antagonismo a outros fungos (HADAR et alii, 1979; MAROIS & MITCHELL, 1981; SINCLAIR et alii, 1982; ELAD et alii, 1983; PUNJA, 1985; SUMMERBELL, 1987), podendo, eventualmente, inibir o desenvolvimento de *P. tinctorius*. Em alguns sistemas, porém, causaram efeito estimulante (LINDERMAN, 1988; CALVET et alii, 1993). Espécies de *Penicillium* tem sido frequentemente isolados a partir de manto ectomicorrízico (SUMMERBELL, 1989; GARBAYE & BOWEN, 1989). Resultados indicando o potencial antagonista deste gênero são variáveis. Segundo VAARTAJA & SALISBURY (1965), espécies de *Penicillium* inibiram o desenvolvimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura agarizado, porém, SUMMERBELL (1987) demonstrou que *P. spinulosum* não inibiu a formação de ectomicorrizas em *Picea mariana* por *Laccaria bicolor*.

Antibiose dos isolados de *Trichoderma* a *P. tinctorius*

rius foi verificada quando pareados em BDA, com ênfase para os isolados TR-4 e TR-7 e também nos tubos com vermiculita. Nestes, não houve desenvolvimento de ectomicorrizas nas plantas de *E. urophylla* quando *P. tinctorius* interagiu com *Trichoderma* inativado por autoclavagem ou houve redução da quantidade de ectomicorrizas previamente desenvolvidas quando juntos conviveram. Parasitismo dos isolados TR-1, TR-4 e TR-7 de *Trichoderma* e do isolado PN-10 de *Penicillium* sobre *P. tinctorius* não foi observado em teste específico em BDA, avaliado como perfuração ou enrolamento de hifas. Competição poderia ser sugerida se tivesse sido observada inibição no desenvolvimento de ectomicorrizas nos tratamentos com isolados ativos e não nos tratamentos onde foram autoclavados. Competição não foi constatada mas não descartou-se a possibilidade dela ter sido mascarada por outros mecanismos inibidores.

Estes resultados foram similares aos obtidos por SUMMERBELL (1987). Trabalhando com *P. mariana* e *L. bicolor*, observou que a simbiose foi fortemente inibida por espécies de *Trichoderma*, inibida em menor intensidade por *Tolypocladium inflatum* e por *Trichosporon beigelii* e não inibida por alguns outros microrganismos. A inibição foi atribuída principalmente à antibiose.

Presença de inclusões escuras indicadoras do acúmulo de compostos fenólicos foi verificada em alguns dos 50 cortes de raízes crescidas em contato com o isolado TR-1 de *Trichoderma* e em todos os 50 cortes de raízes crescidas em contato com o isolado PN-10 de *Penicillium*, sugerindo que microrganismos do solo podem induzir resistência à colonização ectomicorrízica. A

morte das plantas nos tubos com vermiculita provocada pelos isolados de *Trichoderma* não possibilitou a correlação da presença de compostos fenólicos nas raízes com a inibição na formação e desenvolvimento ectomicorrízico. Segundo SYLVIA & SINCLAIR (1983), *Trichoderma harzianum*, *Epicoccum purpurascens* e *Pseudomonas cepacia* induziram raízes de *P. menziesii* a acumularem fenóis, proporcionando resistência à colonização das raízes pelo fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*. Nenhum trabalho foi encontrado correlacionando o acúmulo de compostos fenólicos em raízes induzido por microrganismos do solo e resistência à formação ectomicorrízica.

Dos 4 isolados bacterianos testados (B-40, B-41, B-43 e B-44) somente 1, o isolado B-44, inibiu o crescimento de *P. tinctorius* em BDA. A inibição verificada em BDA não foi confirmada no rizoplano. O isolado B-40 não inibiu o desenvolvimento de *P. tinctorius* em BDA ou no rizoplano. Relação inconstante entre a inibição em meio de cultura e no rizoplano foi observada por BOWEN & THEODOROU (1979), estudando interações entre isolados bacterianos e fungos ectomicorrízicos. Resultados obtidos em meio de cultura devem ser considerados com reservas (GARBAYE & BOWEN, 1989). Microrganismos que inibem o desenvolvimento de outros em meio de cultura poderiam não produzir os mesmos compostos antibióticos ou produzi-los em quantidade insuficiente no rizoplano. Existe porém a possibilidade do substrato utilizado nos tubos, originalmente preparados para o desenvolvimento de fungos, não ter proporcionado condições ótimas para o desenvolvimento bacteriano. Os isolados bacterianos aparentemente não competiram com *P. tinctorius* nos tubos com vermiculita. Inclusões escuras não

foram observados nos cortes de raízes de *E. urophylla* crescidas na presença dos isolados bacterianos.

Não é esperado que a intensidade de inibição verificada *in vitro* manifeste-se em condições naturais. A intensa atividade inibidora exercida em testes de laboratório é, muitas vezes, atenuada na presença da comunidade microbiana natural (SUMMERBELL, 1987). O papel da comunidade microbiana nas interações ectomicorrízicas foi ressaltado por MCAFEE & FORTIN (1988), quando considerou que o sucesso de *P. tinctorius* em formar ectomicorrizas em ambientes desfavoráveis pode ser devido à exclusão de competidores.

Em viveiros florestais frequentemente são usados substratos autoclavados ou fumigados (MARX et alii, 1978; SUMMERBELL, 1987; VIDA, 1989). A simples mistura de substratos possivelmente também propicie situação de desequilíbrio da população microbiana. Entretanto, substratos com população microbiana desequilibrada possivelmente não permaneçam como tal por muito tempo, sendo prontamente recolonizados por espécies pioneiras. Isolados de *Trichoderma* e de *Penicillium* foram selecionados por MAROIS et alii (1981), visando verificar suas capacidades como antagonistas, pela habilidade em crescerem rapidamente em solo fumigado e ocuparem o rizoplane. Então, microrganismos inibidores podem exercer importante papel na formação de ectomicorrizas em eucalipto por *P. tinctorius* em condições de viveiro ou no seu desenvolvimento, quando mudas com ectomicorrizas já estabelecidas *in vitro* são transplantadas.

O meio MMN tem sido regularmente utilizado para o cultivo de fungos ectomicorrízicos (SINCLAIR et alii, 1982; SYL-

VIA & SINCLAIR, 1983; McAFEE & FORTIN, 1988; BACCHI, 1988; RICHTER et alii, 1989; VIDA, 1989; CAIRNEY & ASHFORD, 1991). Entretanto, o crescimento de *P. tinctorius* foi similar quando cultivado em MMN ou em BDA (MARX, 1969). Considerando também a relativa facilidade no preparo, optou-se pelo BDA para a manutenção e para os testes envolvendo o cultivo de *P. tinctorius* em meio agarizado.

Foi observado maior desenvolvimento inicial de *P. tinctorius* nas placas com BDA ou nos tubos com vermiculita quando para eles foram repicados discos de micélio pré-incubados por 3 dias possibilitando a formação de novas pontas de hifas.

A assepsia das sementes de eucalipto com hipoclorito de sódio, para cultivo em condições axênicas, pareceu melhorada quando feita por duas vezes, com intervalo de 24 horas, comparada com uma única vez, como preconizada por VIDA (1989) e MALAJCZUK et alii (1990) e a transferências das plântulas para os tubos de ensaio com vermiculita tornou-se mais fácil quando as sementes foram incubadas para germinação por 3 dias em relação a 7 dias, período este utilizado por VIDA (1989).

O cultivo das plantas no substrato vermiculita irrigado com solução MMN proporcionou bom desenvolvimento, facilidade na retirada das impurezas e na mensuração das ectomicorizas formadas. Porém, nestas condições os isolados de *Trichoderma* causaram a morte das plantas, prejudicando a obtenção dos dados. Este foi o maior entrave metodológico encontrado.

5. CONCLUSÕES

- Substratos de viveiro, como turfa, subsolo e casca de eucalipto decomposta, fumigada ou não com brometo de metila, podem ser habitados por fungos e bactérias do solo potencialmente inibidores da formação e desenvolvimento de ectomicorrizas em eucalipto por *Pisolithus tinctorius*.

- Os três isolados de *Trichoderma* testados inibiram o crescimento de *P. tinctorius* em meio de cultura, a formação e o desenvolvimento de ectomicorrizas em *Eucalyptus urophylla*, *in vitro*, destacando-se os isolados TR-4 e TR-7. Um isolado de *Penicillium* inibiu o desenvolvimento de ectomicorrizas em *E. urophylla* mas em menor intensidade que os isolados de *Trichoderma*.

- A antibiose foi o mecanismo inibidor constatado com maior evidência. Houve indícios de acúmulo de compostos fenólicos no córtex das raízes de *E. urophylla*, induzido pelos isolados de *Trichoderma* e *Penicillium*, podendo constituir-se em outro mecanismo de inibição. Parasitismo e competição entre os fungos do solo e *P. tinctorius* não foram constatados.

- Os isolados de *Trichoderma* produziram substâncias inibidoras termoestáveis e o efeito inibidor ao fungo ectomicorrízico, *P. tinctorius*, em meio de cultura persistiu durante

todo o período de pareamento.

- Bactérias isoladas dos substratos de viveiro não inibiram a formação e o desenvolvimento de ectomicorrizas em *E. urophylla* por *P. tinctorius*, *in vitro*, apesar de um isolado ter inibido o crescimento do fungo ectomicorrízico em meio de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUER, C.G. & KRÜGNER, T.L. Potencial de controle de doenças de plantas com fungos ectomicorrízicos. In: BETTIOL, W., org. *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.71-85. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15)
- BACCHI, L.M.A. Desenvolvimento ectomicorrízico em mudas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* em viveiro comercial. Piracicaba, 1988. 81p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BARROS, H.F.; BRANDI, R.M.; REIS, M.S. Micorrizas em eucalipto. *Revista Árvore*, Viçosa, 2: 130-140, 1978.
- BELLEI, M.M. & CARVALHO, E.M. Ectomicorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N., coord. *Microbiologia do Solo*. Campinas, SBCS, 1992. p.297-319.
- BELLEI, M.M.; GARBAYE, J.; GIL, M. Ocorrência de uma dupla simbiose micorrízica em *Eucalyptus* jovens em plantações em Santa Catarina. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 3., Piracicaba, 1989. *Anais*. Piracicaba, CENA/ESALQ, 1989. p.91.

- BERINGER, J.E.; BURGGRAAF, J.P.; REDDELL, P.; TURNER, G. The role of mycorrhizas in growth and prospects for producing modified strains of mycorrhizal fungi. In: DAY, P.R. & JELLIS, G.J., ed. *Genetics and plant pathogenesis*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987. p.91-100.
- BETTIOL, W. & KRÜGNER, T.L. Influência da matéria orgânica na formação de ectomicorrizas em mudas de *Pinus* por *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris*. *Pesquisa Agrapecuária Brasileira, Brasília*, 21: 619-624, 1986.
- BOLAN, N.S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil, The Hague*, 134: 189-207, 1991.
- BOUDARGA, K.; LAPEYRIE, F.; DEXHEIMER, J. A technique for dual vesicular-arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal infection of *Eucalyptus* "in vitro". *New Phytologist, Cambridge*, 114: 73-76, 1990.
- BOWEN, G.D. & THEODOROU, C. Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem., Oxford*, 11: 119-126, 1979.
- CAIRNEY, J.W.G. & ASHFORD, A.E. Release of a reducing substance by the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus tinctorius* and *Paxillus involutus*. *Pl. and Soil, The Hague*, 135: 147-150, 1991.

- CALVET, C.; PERA, J.; BAREA, J.M. Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlit mixture. *Plant and Soil*, The Hague, 148: 1-6, 1993.
- CARVALHO, A.M.F.; PEREIRA, A.G.; AUER, C.G. Distribuição de basidiocarpos de *Pisolithus tinctorius* em talhões de *Eucalyptus* spp., na região de Alfenas, MG. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2., São Paulo, 1987. *Anais*. São Paulo, Instituto de Botânica, 1987. p.29.
- CARVALHO, E.F. & MUCHOVEJ, R.M.C. Comportamento de mudas de *Eucalyptus grandis* na presença de fungos endo e ectomicorrízicos. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2., São Paulo, 1987. *Anais*. São Paulo, Instituto de Botânica, 1987. p.3.
- CHILVERS, G.A. Some distinctive types of eucalypt micorrhiza. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, 16: 49-70, 1968.
- CHILVERS, G.A.; DOUGLASS, P.A.; LAPEYRIE, F. A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. *New Phytologist*, Cambridge, 103: 397-402, 1986.
- CHILVERS, G.A. & GUST, L.W. Comparison between the growth rates of mycorrhizas, uninfected roots and a mycorrhizal fungus of *Eucalyptus st-johnii* R. T. Bak. *New Phytologist*, Cambridge, 91: 453-466, 1982.

- CHILVERS, G.A. & PRYOR, L.D. The structure of eucalypt mycorrhizas. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, 13: 245-259, 1965.
- DUPONNOIS, R. & GARBAYE, J. Effect of dual inoculation of Douglas-Fir with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* and mycorrhization helper bacteria (MHB) in two bare-root forest nurseries. *Plant and Soil*, The Hague, 138: 169-176, 1991.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - scanning electron microscopy. *Phytopathology*, Saint Paul, 73: 85-88, 1983.
- GARBAYE, J. & BOWEN, G.D. Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytologist*, Cambridge, 112: 383-388, 1989.
- GARBAYE, J.; DELWAULLE, J.C.; DIANGANA, D. Growth response of *Eucalyptus* in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, 24: 151-157, 1988.
- GIBSON, F.; FOX, F.M.; DEACON, J.W. Effects of microwave treatment of soil on growth of birch (*Betula pendula*) seedlings and infection of them by ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, Cambridge, 108: 189-204, 1988.

- HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology, Saint Paul*, 69: 64-68, 1979.
- HEINRICH, P.A.; MULLIGAN, D.R.; PATRICK, J.W. The effect of ectomycorrhizas on the phosphorus and dry weight acquisition of *Eucalyptus* seedlings. *Plant and Soil, The Hague*, 109: 147-149, 1988.
- JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book, 1940.
- KIRÁLY, Z.; KLEMENT, Z.; SALYMOSEY, F.; VÖRÖS, J. *Methods in plant pathology*. New York, American Elsevier, 1974. 509p.
- KOPE, H.H. & FORTIN, J.A. Antifungal activity in culture filtrates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany, Ottawa*, 68: 1254-1259, 1990.
- KRÜGNER, T.L. Ectomicorrizas: caracterização, produção de inóculo e inoculação. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1. Lavras, 1985. *Anais. Lavras, FAEPE*, 1986. p.138-141.

- LEI, J.; LAPEYRIE, F.; MALAJCZUK, N.; DEXHEIMER, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *P. tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *E. urophylla* S. T. Blake *in vitro*. II. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhiza formation. *New Phytologist*, Cambridge, 116: 115-122, 1990.
- LINDERMAN, R.G. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology*, Saint Paul, 78: 366-371, 1988.
- LING-LEE, M.; CHILVERS, G.A.; ASHFORD, A.E. A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of *Eucalyptus fastigata* Deane and Maiden. *New Phytologist*, Cambridge, 78: 313-328, 1977.
- MALAJCZUK, N.; DELL, B.; BOUGUER, N.L. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*: III. Superficial ectomycorrhizas initiated by *Hysterangium* and *Cortinarius* species. *New Phytologist*, Cambridge, 105: 421-428, 1987.
- MALAJCZUK, N.; LAPEYRIE, F.; GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* "in vitro". 1. Mycorrhiza formation in model systems. *New Phytologist*, Cambridge, 114: 627-631, 1990.

- MALAJCZUK, N.; MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. 1. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New Phytologist*, Cambridge, 91: 467-482, 1982.
- MAROIS, J.J. & MITCHELL, D.J. Effectes of fungal communities on pathogenic and saprophydtic activities of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytophatology*, Saint Paul, 71: 1251-1256, 1981.
- MAROIS, J.J.; MITCHELL, D.J.; SONODA, R.M. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato under field conditions. *Phytophatology*, Saint Paul, 71: 1257-1260, 1981.
- MARX, D.H. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Ann. Rev. Phytopathology*, Saint Paul, 10: 429-454, 1972.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection: I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, Saint Paul, 59: 153-163, 1969.
- MARX, D.H.; MORRIS, W.G.; MEXAL, J.G. Growth and ectomycorrhizal developement of loblolly pine seedlings in fumigated and non-fumigated nursery soil infected with different fungal symbionts. *Forest Science*, Washington, 24: 193-203, 1978.

- McAFEE, B.J. & FORTIN, J.A. Comparative effects of the microflora on ectomycorrhizal inoculation of conifer seedlings. *New Phytologist, Cambridge*, 108: 443- 449, 1988.
- MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W., org. Controle biológico de doenças de plantas. *Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA*, 1991. p.135-156. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).
- MEYER, F.H. Distribution of ectomycorrhizal in native and man-made forests. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. ed. *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology*. New York, Academic Press, 1973. p.79-105.
- OLIVEIRA, V.L. & GARBAYE, J. Importância dos microrganismos do solo para a simbiose ectomicorrízica. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 3. Piracicaba, 1989. *Anais*. Piracicaba, CENA/ESALQ, 1989. p.90.
- PAULITZ, T.C. & LINDERMAN, R.G. Mycorrhizal interaction with soil organisms. In: ARORA, D.K.; RAI, B.; MUKERJI, K.G.; KNUDSEN, G.R. eds. *Handbook of applied mycology*. New York, Marcel Dekker, 1991. v.1., p.77-129.
- PESSOA, M.N.G. Detecção e localização de *Macrophomina* (Tass.) Goid. em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) - controle químico e biológico. Recife, 1986. (Mestrado. UFRP).

- PICHÉ, Y.; FORTIN, J.A.; LA FONTAINE, J. Cytoplasmic phenols and polysaccharide in ectomycorrhizal and nonmycorrhizal short roots pine. *New Phytologist*, Cambridge, 88: 695-703, 1981.
- PUNJA, Z.K. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annu. Rev. Phytopathology*, Saint Paul, 23: 97-127, 1985.
- RICHTER, D.L.; ZUELLING, T.R.; BAGLEY, S.T.; BRUHN, J.N. Effects of red pine (*Pinus resinosa*) mycorrhizoplane-associated actinomycetes on "in vitro" growth of ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, The Hague, 115: 109-116, 1989.
- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. *Plant physiology*. 2.ed. Belmont, Wadsworth, 1978.
- SASS, J.E. *Botanical microtechnique*. Ames, Iowa State University Press, 1951.
- SINCLAIR, W.A.; SYLVIA, D.M.; LARSEN, A.O. Disease suppression and growth promotion in Douglas-Fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Forest Science*, Washington, 28: 191-201, 1982.
- SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. *Biotechnologia do solo; fundamentos e perspectivas*. Lavras, ESAL/FAEPE, 1988. 235p.

SOARES, J.; BORGES, A.C.; BARROS, J.F.; NEVES, J.C.L.; BELLEI, M.M. Absorção de nutrientes e crescimento de mudas de eucalipto micorrizadas com *Pisolithus tinctorius* em diferentes níveis de fósforo no solo. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1., Lavras, 1985. *Anais.* Lavras, FAEPE, 1986. p.211.

SUMMERBELL, R.C. The inhibitory effects of *Trichoderma* species and other soil microfungi on formation of mycorrhiza by *Laccaria bicolor* "in vitro". *New Phytologist, Cambridge*, 105: 437-448, 1987.

SUMMERBELL, R.C. Microfungi associated with mycorrhizal mantle and adjacent microhabitats within the rhizosphere of black spruce. *Canadian Journal of Botany, Ottawa*, 67: 1085-1090, 1989.

SYLVIA, D.M. & SINCLAIR, W.A. Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-Fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Phytopathology, Saint Paul*, 73: 390-397, 1983.

THEODOROU, C. & REDDELL, P. "In vitro" synthesis of ectomycorrhizas on *Casuarinaceae* with a range of mycorrhizal fungi. *New Phytologist, Cambridge*, 118: 279-288, 1991.

- THOEN, D.; SOUGOUFARA, B.; DOMMERGUES, Y. In vitro mycorrhization of *Casuarina* and *Allocasuarina* species by *Pisolithus* isolates. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 68: 2537-2542, 1990.
- TONKIN, C.M.; MALAJCZUK, N.; McCOMB, J.A. Ectomycorrhizal formation by micropropagated clones of *Eucalyptus marginata* inoculated with isolates of *Pisolithus tinctorius*. *New Phytologist*, Cambridge, 109: 209-214, 1989.
- TRAPPE, J.M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculations in nurseries. *Ann. Rev. Phytop.*, S. Paul, 15: 203-222, 1977.
- TUITE, J. *Plant pathological methods*. Minneapolis, Burgess, 1969. \$
- VAARTAJA, O. & SALISBURY, P.J. Mutual effects "in vitro" of micro-organisms isolated from tree seedlings, nursery soil, and forests. *Forest Science*, Washington, 11: 160-186, 1965.
- VIEIRA, R.F. & PERES, J.R.R. Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para *Eucalyptus grandis*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 12: 231-235, 1988.

VIDA, J.B. Obtenção de ectomicorrizas em mudas de *Eucalyptus* a partir de "plantlets" e plântulas inoculadas "in vitro" com *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch. Piracicaba, 1989. 177p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

VIDA, J. B.; KRÜGNER, T. L.; GONÇALVES, A. N. Formação de ectomicorrizas em "plantlets" de clones de *Eucalyptus* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* "in vitro". *Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas*, 15: 395-399, 1991.

YOKOMIZO, N.K.S. & KRÜGNER, T.L. *Pisolithus tinctorius* Coker et Couch e ectomicorrizas em espécies de *Eucalyptus* L'Heritier. *Silvicultura em São Paulo, São Paulo*, 17/19: 1-8, 1985a.

YOKOMIZO, N.K.S. & KRÜGNER, T.L. Avaliação comparativa e efeitos de isolados de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch em mudas de espécies de *Pinus* e *Eucalyptus*. *Silvicultura em São Paulo, São Paulo*, 17/19: 17-23, 1985b.

ZAMBOLIM, L.; BORGES, R.C.G.; COELHO, L.; COUTO, C.; BARBOSA, MM. Ecologia de fungos ectomicorrízicos em eucalipto. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 3., Piracicaba, 1989. *Anais. Piracicaba, CENA/ESALQ*, 1989. p.92.

APÊNDICE 1 - Composição da solução nutritiva Melin-Norkrans modificada, do meio de extrato de solo e do meio de Martin.

SOLUÇÃO MELIN-NORKRANS:

1. Glucose.....5,0 g/l
2. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$0,25 g/l
3. KH_2PO_40,5 g/l
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,15 g/l
5. CaCl_20,05 g/l
6. FeCl_3 (1%).....1,2 ml/l
7. NaCl0,025 g/l
8. Água.....1,0 l

EXTRATO DE SOLO:

1. Solo.....1,0 kg
2. Água.....1,0 l
3. Autoclavar por..30 minutos
4. CaCO_30,5 g
5. Filtrar

EXTRATO DE SOLO-ÁGAR:

1. Glucose.....1,0 g
2. Extrato de solo..100,0 ml
3. K_2HPO_40,5 g
4. Ágar.....15,0 g
5. Água.....900,0 ml

MEIO DE MARTIN:

1. KH_2PO_41,0 g
2. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,5 g
3. Peptona.....5,0 g
4. Dextrose.....10,0 g
5. Rose Bengal.....0,033 g
6. Ágar.....20,0 g
7. Água.....1,0 l
8. Estreptomicina..0,03 g
(após autoclavagem)