INFLUÊNCIA DE FONTES DE MATÉRIA ORGÂNICA NA FORMAÇÃO
DE ECTOMICORRIZAS EM MUDAS DE *Eucalyptus citriodora*
INOCULADAS COM *Pisolithus tinctorius*.

MARCO ANTONIO GALLI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof.Dr. Tasso Leo Krugner

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
Julho - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Galli, Marco Antonio

Influência de fontes de matéria orgânica na formação de ectomicorizas
em mudas de *Eucalyptus citriodora* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* /
Marco Antonio Galli. - Piracicaba, 1996.

90p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Eucalipto - Muda 2. Matéria orgânica 3. Micorriza I. Título

CDD 634.9734

INFLUÊNCIA DE FONTES DE MATÉRIA ORGÂNICA NA FORMAÇÃO
DE ECTOMICORRIZAS EM MUDAS DE *Eucalyptus citriodora* COM
Pisolithus tinctorius

MARCO ANTONIO GALLI

Aprovado em: 29/08/1996

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Tasso Leo Krugner
Prof. Dr. João Batista Vida
Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza
Dr. Wagner Bettiol
Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais

ESALQ/USP
UEM
UNESP
EMBRAPA
ESALQ/USP

Prof. Dr. TASSO LEO KRUGNER
Orientador

ofereço

a todas as pessoas que contribuíram para
a realização desse trabalho,
... e aos que se interessarem pelo mesmo

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Tasso Leo Krugner, pela orientação na pesquisa, experiência e conhecimentos transmitidos, e pela amizade.
- Ao Professor Sérgio Florentino Paschollati, pelo profissionalismo e dinamismo no laboratório de fisiologia do Departamento de Fitopatologia - ESALQ.
- Ao Professor Murilo de Melo e aos funcionários do CEBTEC - ESALQ, por contribuir com equipamentos e idéias durante toda a fase experimental da pesquisa;
- Ao Professor Wanderlei de Melo do Depto. de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias -UNESP- Jaboticabal, por contribuir com parte da metodologia.
- Ao IPEEF - Instituto de Pesquisas e Empresas Florestais, e Ao Departamento de Ciências Florestais / ESALQ-USP.
- As colegas Kátia Regina F.Schwann Estrada pelo companherismo e colaboração durante toda pesquisa e Célia Regina Tremocoldi pela amizade e por contribuir na metodologia em parte desse trabalho
- Ao colega e professor Luis Eduardo Aranha Camargo pela amizade e por colocar a disposição equipamentos e estagiários para auxiliar parte deste trabalho
- A Técnica de laboratório do Depto de Fitopatologia Fernanda Yeda Bassa Groppo pela participação e sugestões nos trabalhos de laboratório;
- Aos funcionários do Departamento Pedro da Silva, Pedro Arthuso e Edivaldo Buriolla, principalmente pela amizade e apoio na montagem dos experimentos. ®
- Aos que contribuíram de alguma forma para este trabalho, e não foram aqui mencionados.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1 - INTRODUÇÃO	01
2 - REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1 - Efeito da matéria orgânica sobre a micorriza e sobre a população microbiana do substrato	05
2.2 - Caracterização e fracionamento da matéria orgânica	12
2.3 - Quantificação da infecção micorrízica	14
2.4 - Antagonismo <i>in vitro</i> entre <i>P. tinctorius</i> e fungos isolados da micorrizosfera	17
3 - MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 - Seleção do isolado de <i>P. tinctorius</i> e da espécie de <i>Eucalyptus</i>	22
3.2 - Fracionamento de fontes de matéria orgânica e efeito das frações no crescimento micelial de <i>P. tinctorius</i>	24
3.3 - Efeito de fontes de matéria orgânica no desenvolvimento de micorrizas de <i>P. tinctorius</i> em <i>E. citriodora</i> após 90 dias em condições de viveiro	27

3.3.1 - Montagem e condução dos experimentos	27
3.3.2 - Extração do ergosterol e análise em cromatografia líquida (HPLC)	28
3.4- Quantificação da população fúngica nos substratos	31
3.5 - Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>P. tinctorius</i> a alguns fungos isolados do substrato de casca de eucalipto	31
3.5.1- Efeito de <i>P. tinctorius</i> sobre fungos isolados do substrato	31
3.5.2- Efeito de fungos isolados do substrato sobre <i>P. tinctorius</i>	32
3.6 - Avaliação do desenvolvimento de ectomicorrizas inoculadas <i>in vitro</i> após 7 meses em condições de campo	33
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 - Escolha do Isolado de <i>P. tinctorius</i> e espécie de eucalipto	36
4.2 - Fracionamento de fontes de matéria orgânica e efeito de cada fração no crescimento micelial de <i>P. tinctorius</i>	44
4.3 - Efeito de fontes de matéria orgânica no desenvolvimento de ectomicorrizas de <i>P. tinctorius</i> em <i>Eucalyptus citriodora</i>	49
4.4 - Efeito da inoculação de mudas de <i>E. citriodora</i> com <i>P. tinctorius</i> na população fúngica do substrato em diferentes fontes de matéria orgânica em condições de viveiro	55
4.5 - Antagonismo entre <i>P. tinctorius</i> e alguns fungos isolados do substrato de casca de eucalipto	61

4.5.1 - Efeito de <i>P. tinctorius</i> sobre fungos isolados do substrato	62
4.5.2- efeito de fungos isolados do substrato sobre <i>P. tinctorius</i>	66
4.6 - Desenvolvimento de ectomicorrizas de <i>P. tinctorius</i> inoculados <i>in vitro</i> em <i>E. citriodora</i> após 7 meses em condições de campo	68
4.7 - Discussão geral	73
5 - CONCLUSÕES	78
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise química do solo, da perlita, e das fontes de matéria orgânica utilizadas nos experimentos	35
Tabela 2 - Porcentagem de raízes com manto fúngico, visualmente avaliadas, em 5 espécies de eucalipto inoculadas <i>in vitro</i> com 3 isolados de <i>P. tinctorius</i> em substrato de vermiculita /esfagno (9:1) umidecidos com solução mineral do meio MMN com 5g de sacarose/litro, após 5 semanas de crescimento	41
Tabela 3 - Quantificação visual da porcentagem de raízes com manto fúngico, em 5 espécies de eucalipto inoculads <i>in vitro</i> com 3 isolados de <i>P. tinctorius</i> em condições de viveiro com substrato de vermiculita (50%) + solo (25%) + composto de casca de eucalipto (25%), após 90 dias	42
Tabela 4 - Altura das mudas (cm) em 5 espécies de eucalipto inoculadas <i>In vitro</i> com 3 isolados de <i>P. tinctorius</i> em condições de viveiro com substrato de vermiculita (50%) + solo (25%) + composto de casca de eucalipto (25%), após 90 dias	43
Tabela 5 - Efeito de concentrações crescentes de frações de composto de casca de eucalipto e do extrato autoclavado incorporados ao meio MMN sólido, no crescimento radial (cm) das colônias de <i>P. tinctorius</i>	45

- Tabela 6** - Efeito de concentrações crescentes de frações de composto de bagacilho de cana e do extrato autoclavado incorporados ao meio MMN sólido, no crescimento radial das colônias de *P. tinctorius* 46
- Tabela 7** - Efeito de concentrações crescentes de frações de composto de casca de Pinus e do extrato autoclavado incorporados ao meio MMN sólido no crescimento radial das colônias de *P. tinctorius* 46
- Tabela 8** - Análise química das substâncias obtidas a partir do fracionamento químico de composto de casca de eucalipto, obtidas pelo método da digestão nitro-perclórica 48
- Tabela 9** - Desenvolvimento micorrízico (% de superfície radicular micorrizada) visualmente observado* em mudas de *E. citrodora* inoculadas *in vitro* com *P. tinctorius*, em 4 substratos contendo perlita em diferentes concentrações de fontes de matéria orgânica, após 90 dias em condições de viveiro 51
- Tabela 10** - Quantidade de ergosterol no substrato contendo mudas de *E. citriodora* inoculadas *in vitro* com *P. tinctorius* e não inoculadas após 90 dias em condições de viveiro 52
- Tabela 11** - Altura das mudas de *E. citriodora* inoculadas *in vitro* com *P. tinctorius* e não inoculadas, em substrato (perlita) contendo diferentes concentrações de 4 fontes de matéria orgânica após 90 dias em condições de viveiro 53

- Tabela 12** - Peso de matéria seca da parte aérea das mudas de *E. citriodora* inoculadas *in vitro* com *P. tinctorius* e não inoculadas, em substrato (perlita) contendo diferentes concentrações de 4 fontes de matéria orgânica após 90 dias em condições de viveiro 54
- Tabela 13**- Raio médio das colônias de alguns fungos isolados no substrato composto por casca de eucalipto pareados com *P. tinctorius* e crescendo isoladamente no meio MMN 61
- Tabela 14**- Diâmetro médio das colônias de *P. tinctorius* crescendo em meio MMN sólido preparado com diferentes concentrações de filtrados de culturas de *Fusarium*, *Trichoderma*, e *Penicillium* 66
- Tabela 15** -Desenvolvimento micorrízico em plantas de *E.citriodora* inoculadas *in vitro* com *P.tinctorius* após 7 meses no campo, avaliado através da presença ou ausência de manto fúngico nas raízes amostradas 68
- Tabela 16**- Quantidade de ergosterol em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de raízes obtidas em mudas de *E. citriodora* inoculadas *in vitro* com *P. tinctorius* e não inoculadas, cultivadas em viveiro durante 90 dias em substrato composto por casca de eucalipto, bagacilho de cana e casca de pinus em 3 níveis, 7 meses após o transplante em condições de campo 71
- Tabela 17**- Altura das plantas após 7 meses em condições de campo em mudas de *E. citriodora* produzidas com e sem inoculação de *P. tinctorius* 73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Protocolo para fracionamento da matéria orgânica 26
- Figura 2** - Protocolo para extração de ergosterol 30
- Figura 3** - A) Plântulas de *E. citriodora* inoculadas e plântulas não inoculadas *in vitro* com *P. tinctorius*, após 5 semanas de incubação em câmara de crescimento; B) Plântulas com alta infecção micorrízica no sistema radicular utilizadas nos experimentos conduzidos no viveiro e no campo.... 40
- Figura 4** - População fúngica total / g de substrato em três fontes de matéria orgânica utilizadas para produção de mudas de *E. citriodora*, inoculadas *in vitro* e não inoculadas com *P. tinctorius*, após 90 dias em condições de viveiro 60
- Figura 5** - Número de colônias de *Trichoderma sp* /g de substrato em três fontes de matéria orgânica utilizadas para produção de mudas de *E. citriodora*, inoculadas e não inoculadas com *P. tinctorius*, após 90 dias em condições de viveiro 64
- Figura 6** - Número de colônias de *Aspergillus sp* e *Penicillium sp* /g de substrato em três fontes de matéria orgânica utilizadas para produção de mudas de *E. citriodora*, inoculadas e não inoculadas com *P. tinctorius*, após 90 dias em condições de viveiro 60

- Figura 7** - Número de colônias de *Fusarium sp*/g de substrato em três fontes de matéria orgânica utilizadas para produção de mudas de *E. citriodora*, inoculadas e não inoculadas com *P. tinctorius*, após 90 dias em condições de viveiro 60
- Figura 8** - Vista geral dos fungos isolados de substrato para produção de mudas de *E. citriodora* inoculadas com *P. tinctorius* e não inoculadas, composto por perlita e casca de eucalipto em três concentrações, após 90 dias em condições de viveiro 61
- Figura 9**- Efeito do pareamento em meio MMN de *P. tinctorius* contra espécies de *Fusarium*, *Trichoderma*, e *Penicillium*, isoladas do substrato de casca de eucalipto 65

INFLUÊNCIA DE FONTES DE MATÉRIA ORGÂNICA NA FORMAÇÃO
DE ECTOMICORRIZAS EM MUDAS DE *Eucalyptus citriodora*
INOCULADAS COM *Pisolithus tinctorius*.

Autor: Marco Antonio Galli

Orientador: Prof. Dr. Tasso Leo Krugner

RESUMO

Plântulas de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. maculata* e *E. citriodora* foram inoculadas *in vitro* com 3 isolados de *Pisolithus tinctorius* (1604, 1605 e 1607), com o objetivo de se encontrar uma combinação fungo-hospedeiro com alto índice de infecção micorrízica para se estudar os efeitos da matéria orgânica no estabelecimento da associação no viveiro. A melhor combinação foi *E. citriodora* com o isolado 1604, obtendo-se 95% de micorrização *in vitro* cinco semanas após a inoculação, e 50 % após 90 dias em condições de viveiro, através de avaliação da proporção do sistema radicular micorrizado. A partir desta combinação entre isolado-hospedeiro, foram conduzidos quatro experimentos em viveiro, testando-se três fontes de matéria orgânica (bagacilho de cana, casca de pinus e casca de eucalipto) e uma mistura destas três fontes, sobre o desenvolvimento micorrízico. Com exceção da mistura, todas as fontes de matéria orgânica inibiram a associação, avaliada visualmente, quando adicionadas ao substrato de cultivo das mudas na fase de viveiro, sendo o composto de casca de pinus o que apresentou maior inibição na micorrização. Estas fontes foram fracionadas quimicamente em laboratório, para verificar o efeito de cada fração no

crescimento micelial *in vitro* de *P. tinctorius*. A fração solúvel em água não inibiu o crescimento micelial. As frações compostas por matéria húmica, ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e ainda o extrato bruto autoclavado, propiciaram no entanto, efeito inibitório sobre o fungo micorrízico. A adição de matéria orgânica no substrato aumentou a população fúngica neste, independente da fonte utilizada, e a inoculação de *P. tinctorius* teve um efeito seletivo sobre os gêneros de fungos presentes, favorecendo o crescimento de *Trichoderma*, enquanto que nos tratamentos não inoculados predominaram espécies de *Fusarium*. Não foi observado antagonismo *in vitro* entre *P. tinctorius* e o isolado de *Trichoderma* testado. A micorrização nos experimentos de viveiro e campo foi avaliada visualmente e indiretamente pelo teor de ergosterol no substrato, em condições de viveiro, e nas raízes das árvores, em condições de campo. Houve aumento do ergosterol sempre que se inoculou o fungo micorrízico, mostrando que o método de extração de ergosterol pode ser utilizado como método adicional para detecção e quantificação de infecção micorrízica. Os resultados obtidos em condições de campo, mostraram que a associação se manteve nas plantas inoculadas sete meses depois de transplantadas, independente da quantidade de matéria orgânica presente no substrato de viveiro.

INFLUENCE OF SOURCES OF ORGANIC MATTER ON THE
ECTOMYCORRHIZAL FORMATION IN *Eucalyptus citriodora* SEEDLINGS
INOCULATED WITH *Pisolithus tinctorius*.

Author: Marco Antonio Galli

Adviser: Prof. Dr. Tasso Leo krugner

SUMMARY

Seedlings of *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. maculata* and *E. citriodora*) were inoculated in vitro with 3 isolates of *Pisolithus tinctorius* (1604, 1605 and 1607) to select a fungus-host combination with high mycorrhizal infection for further studies on the effects of organic matter on the association. The best combination chosen was *E. citriodora* x isolate 1604, with 95% and 50% of mycorrhization obtained in vitro (after 5 weeks from inoculation) and in the nursery (after 90 days from seedling transplant) respectively. Four nursery experiments were carried out to test the effects of 3 sources of organic matter (sugar cane bagasse, pine bark and eucalyptus bark) and a mixture of these sources on the ectomycorrhizal development and fungal population of the substrate. With the exception of the mixture, all sources of organic matter inhibited the degree of mycorrhizal infection when visually evaluated, the pine bark being the most inhibitory. One these sources were chemically fractionated to verify the effect of each fraction on the mycelial growth of *P. tinctorius*. The water soluble fraction did not affect the mycelial growth. The fractions composed by humic

matter, fulvic acids, humic acids and autoclaved raw extracts inhibited, however, the growth of the fungus. The addition of organic matter increased the fungal population in the substrates, regardless the source employed. The inoculation of *P. tinctorius* had a selective effect on the fungal genera present, favoring *Trichoderma*, whereas in non inoculated substrates species of *Fusarium*, *Penicillium* and *Aspergillus* prevailed. Tests of antagonism performed *in vitro* showed mutual inhibitory effects between *P. tinctorius* and an isolate of *Penicillium* and an isolate of *Fusarium*. There was no antagonistic effect between *P. tinctorius* and the *Trichoderma* isolate tested. Mycorrhizal infection was evaluated visually and indirectly through the use of the ergosterol assay, both in the nursery and in the field. The ergosterol content of the substrate and on roots always increased when the ectomycorrhizal fungus was inoculated, showing that the ergosterol assay can be an additional tool for the quantification of infection. The mycorrhizal association persisted under field conditions in inoculated plants up to 7 months after planting.

1 - INTRODUÇÃO

Os efeitos benéficos dos fungos ectomicorrízicos em espécies de *Eucalyptus* sp., no que se refere a maior absorção de fósforo, resistência a estresse hídrico e sobrevivência em condições adversas, são descritos por vários autores (Malajczuk *et al.*, 1975; Heirinch *et al.*, 1988; Garbaye *et al.*, 1988; Poissonnier, 1990). A inoculação de fungos ectomicorrízicos é utilizada em viveiros de *Pinus* nos EUA por Marx e colaboradores, e experimentalmente em alguns países na Europa (Marx & Byran, 1974). Embora existam várias maneiras de inocular fungos ectomicorrízicos, como o uso de terriço de floresta no viveiro, esporos polvilhados, peletizados em hidrogel ou em suspensão aquosa, inóculo micelial em vermiculita e outros substratos, a inoculação *in vitro* é uma opção preferida por alguns pesquisadores (Poissonnier, 1986; Poissonnier, 1990; Vida, 1989; Vida *et al.*, 1991; Galli, 1991; Burgess *et al.*, 1994). Esta técnica permite associar fungos ectomicorrízicos selecionados, livres da competição com fungos micorrízicos indígenas e outros microrganismos inibidores da associação, possibilitando estudar separadamente fatores físicos e químicos do substrato que influenciam a simbiose.

Burgess *et al.* (1994), trabalhando com 20 isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus grandis*, encontraram grande variação na habilidade do fungo formar micorrizas *in vitro* e no desenvolvimento das mudas em casa de vegetação. Resultados dessa natureza, sugerem entre outras coisas, que se tenha uma combinação eficiente entre o isolado e o hospedeiro quando se deseja estudar outros fatores envolvidos na associação, como por exemplo os efeitos da matéria orgânica.

Nos substratos utilizados para produção de mudas de eucalipto em empresas florestais, utilizam-se grandes quantidades de matéria orgânica, obtida das mais variadas fontes, tanto como suprimento de fonte de nutrientes, como para suporte físico para as mudas. A incorporação de matéria orgânica ao substrato para produção de mudas em tubetes, melhora as suas características físicas, químicas e biológicas, tornando a drenagem mais eficiente e fornecendo micronutrientes. Entretanto, o efeito da adição de matéria orgânica ao meio de cultura sobre o crescimento de fungos micorrízicos (Tan & Nopamornbodi, 1979; Bettiol, 1984; Auer & Bettiol, 1986) tem sido ora estimulante, ora inibitório. Por outro lado, em condições de viveiro tem geralmente inibido a associação micorrízica, em função da quantidade e da fonte de matéria orgânica utilizada (Galli, 1991; Bettiol & Krugner, 1986). Os estudos não identificaram no entanto, qual ou quais substâncias constituintes da matéria orgânica causam tais efeitos.

Para estudar os efeitos da matéria orgânica humificada na micorrização, esta pode ser dividida em frações através de métodos analíticos em laboratório. Schnitzer (1982) propôs um protocolo para fracionamento de matéria orgânica, através do qual

se obtém quatro frações com características químicas distintas: fração solúvel em água, matéria húmica, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos. O efeito de cada fração da matéria orgânica no crescimento micelial do fungo ectomicorrízico, poderá indicar qual ou quais substâncias contidas na matéria orgânica tem efeito inibidor ou estimulante no crescimento do fungo.

A matéria orgânica também influencia a população microbiana do substrato e da micorrizosfera. Segundo Linderman (1988), a presença de micorrizas nas raízes modifica sua morfologia e fisiologia, afetando a população microbiana da micorrizosfera através de exsudatos que podem influenciar diretamente ou indiretamente estes microrganismos. Paulitz *et al.* (1991), afirmam que a presença de ectomicorrizas induz a mudanças na ramificação e fisiologia das raízes, resultando em trocas metabólicas diretas entre o fungo simbiote e a raiz, e indiretas através de um microrganismo intermediário. A matéria orgânica por sua vez, pode ter efeitos sobre a planta hospedeira, sobre o fungo ectomicorrízico e sobre a população microbiana do substrato.

Poucas informações existem sobre o resultado da inoculação de *Eucalyptus* com fungos ectomicorrízicos em condições de campo. Alguns trabalhos com espécies de *Pinus* relatam benefícios no campo no reflorestamento em áreas de mineração com solos degradados (Marx *et al.*, 1985), e com *Eucalyptus* na Austrália (Malajczuk *et al.*, 1990) e no Congo (Garbaye *et al.*, 1988).

O presente trabalho teve por objetivos: a) selecionar uma combinação entre hospedeiro e fungo com bom índice de infecção micorrízica para estudos sobre

os efeitos da matéria orgânica na associação em condições de viveiro; b) avaliar o efeito das diferentes fontes de matéria orgânica utilizadas na produção de mudas em viveiros sobre a formação de micorrizas em eucalipto e sobre a população fúngica do substrato; c) caracterizar qual ou quais substâncias presentes na matéria orgânica tem efeito inibidor ou estimulante no crescimento micelial de *P.tinctorius*; d) verificar o desenvolvimento das micorrizas nas mudas inoculadas após transplante para o campo.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 -Efeito da matéria orgânica sobre a formação de micorrizas e sobre a população microbiana do substrato

As pesquisas para utilização de fungos micorrízicos em espécies florestais vem aumentando nos últimos anos, devido principalmente aos avanços nas técnicas de inoculação, e pela possibilidade de recuperação de áreas degradadas com a utilização de mudas micorrizadas (Marx *et al.*, 1985). Se, por um lado, a possibilidade de maior sobrevivência e crescimento das mudas em condições ambientes adversas, tornam esse tipo de associação interessante, por outro lado, as dificuldades encontradas para se obter mudas de eucalipto micorrizadas em condições de viveiros comerciais em larga escala, vêm limitando o uso das técnicas de inoculação desenvolvidas.

Alguns autores (Tan & Nopamornbodi, 1979; Bettiol, 1984; Bettiol & Krugner, 1986; Auer & Bettiol, 1986) sugeriram que fatores físicos, químicos e biológicos de algumas fontes de matéria orgânica utilizadas como substrato para formação das mudas, tem efeito no crescimento de *Pisolithus tinctorius*, estimulando

quando em pequenas concentrações, mas inibindo drasticamente seu crescimento com o aumento das doses. A matéria orgânica obtida de diversas fontes vegetais, tem sido utilizada em grande quantidade nos viveiros de produção de mudas, constituindo muitas vezes 100% do substrato. Em substratos orgânicos constituídos por diversas fontes, espera-se que ocorra uma grande variação nas características texturais, nutricionais e microbianas, em função de sua composição orgânica (material de origem) e de seu grau de decomposição (humificação). Estas variações podem causar os mais diversos efeitos no desenvolvimento das mudas e da associação micorrízica.

Estudos sobre o efeito da adição de matéria orgânica na produção de mudas e na micorrização tem mostrado resultados controversos, não revelando entretanto quais substâncias presentes na matéria orgânica beneficiam ou prejudicam o estabelecimento da associação. Tan & Nopamornbodi (1979), discutem em seu trabalho a necessidade de mais pesquisas nessa área para solucionar esses conflitos de idéias.

Schnitzer (1982), propôs um método para fracionamento da parte orgânica presente no solo, separando substâncias orgânicas e inorgânicas com características químicas diferentes, determinando inclusive o seu grau de humificação. Este método de fracionamento em substâncias orgânicas permite testar o efeito de cada fração sobre o crescimento do fungo *in vitro*, dando uma idéia das substâncias constituintes da matéria orgânica que podem inibir ou estimular a associação micorrízica (Melo, 1994 comunicação pessoal).

Para se estudar diretamente o efeito da matéria orgânica na micorrização, o substrato para inoculação e crescimento das mudas no viveiro deve ser química e microbiologicamente neutro. Em pesquisas com ectomicorrizas de *Pisolithus tinctorius* inoculadas *in vitro* em *Eucalyptus gunnii*, testando vários substratos sólidos, Poissonnier (1986), obteve os melhores resultados nos tratamentos com a utilização de perlita, uma rocha natural 100% inerte do ponto de vista químico e biológico. David *et al.* (1983), estudando o efeito de auxinas e dos fungos micorrízicos *Hebeloma cylindrosporium* e *Pisolithus tinctorius* no enraizamento de *Pinus pinaster*, em substratos de vermiculita e de perlita umedecidos com meio líquido, obtiveram os melhores resultados na presença dos fungos, especialmente nos tratamentos com meio composto por perlita. Cudlin *et al.* (1983) também utilizaram perlita como substrato sólido inerte para avaliar o efeito de pesticidas nas ectomicorrizas em “seedlings” de *Pinus sylvestris*, com bons resultados.

Embora a matéria orgânica utilizada como fonte de nutrientes para muitos microrganismos propicie melhores características físico-químicas ao substrato para formação de mudas, dependendo da fonte utilizada e do estado de humificação, esta pode conter substâncias tóxicas ao desenvolvimento de fungos micorrízicos. Segundo Bowen & Theodorou (1973) e Slankis (1974), a matéria orgânica exerce efeito tanto sobre o hospedeiro como sobre o fungo ectomicorrízico, sendo que a inibição ou estímulo são determinados pela interação de fatores físicos, químicos e biológicos da matéria orgânica no substrato. Slankis (1974), testando algumas fontes de matéria orgânica, obteve inibição da associação simbiótica com o aumento dos

teores dessas fontes no substrato em condições de viveiro. Embora este autor não tenha identificado nem caracterizado quimicamente quais substâncias causaram a inibição, entre as hipóteses levantadas como prováveis causas, estão a liberação de substâncias tóxicas pela matéria orgânica influenciando na atividade biológica, como fenóis e outros compostos orgânicos e a presença de elementos inorgânicos.

Auer & Bettiol (1986), estudando o efeito de serrapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial de *P. tinctorius* em meio de cultura, observaram uma redução no diâmetro e no peso seco das colônias com o aumento da concentração de extrato de serrapilheira no meio de cultura.

Estudando o efeito de ácidos fúlvicos no desenvolvimento do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius in vitro*, Tan & Nopamoknbodi (1979) verificaram efeito inibitório desses ácidos quando incorporados a 3200 ppm no meio Melin-Norkrans modificado (MMN), enquanto que a 320, 640 e 1600 ppm aumentaram o crescimento radial e o peso seco das colônias. Embora não tenham caracterizado o grau de humificação e a composição dos ácidos fúlvicos testados, sugeriram que o estímulo no crescimento do fungo *in vitro* em pH 7,0 foi melhor que em pH 4,0, principalmente pela maior absorção de sacarose e dos ácidos fúlvicos em pH neutro.

Os ácidos húmicos e ácidos fúlvicos que constituem a matéria orgânica, são fontes de nutrientes para muitos microrganismos do solo (Mathur & Paul, 1966; Neelakatan *et al.*, 1970). Em seus estudos sobre a origem e a formação do húmus, Varadachari & Ghosh (1984), concluíram que as únicas diferenças entre os ácidos

fúlvicos e os ácidos húmicos são o grau de polimerização, e que os ácidos fúlvicos não são necessariamente alifáticos como os ácidos húmicos. Microrganismos que além da capacidade de absorver açúcares como fonte de carbono, absorverem ácidos orgânicos, são menos susceptíveis a competição no solo do que aqueles que utilizem somente açúcares. Os fungos micorrízicos, incluindo-se o *P. tinctorius*, são sensíveis a concentrações elevadas de substâncias húmicas no solo (Tan & Nopamoknbodi 1979).

Estudando a influência de composto de casca de eucalipto e de algumas doses de fósforo na micorrização com *P. tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* inoculados *in vitro* em condições de viveiro, Galli (1991) verificou que mesmo em baixas concentrações de fósforo no solo, incrementos na quantidade de composto causaram inibição na associação, embora aumentassem a altura e o peso seco das mudas.

Além de afetar diretamente a associação, o incremento de matéria orgânica pode alterar também a população microbiana do substrato. Linderman (1988), estudando as interações entre as micorrizas e a microbiota da rizosfera, observou alterações morfológicas e fisiológicas nos tecidos da raiz e na população da rizosfera, da micorrizosfera e da micosfera. Entre os fatores envolvidos nessas mudanças estão as alterações na permeabilidade das membranas celulares, afetando a qualidade e a quantidade dos exsudatos radiculares e secreções, e mudanças na composição nutricional dos tecidos do hospedeiro. Segundo este autor, comentando os efeitos na micorrizosfera, quando se estabelece a micorriza, as mudanças que

ocorrem na fisiologia e/ou na morfologia das raízes, alteram a quantidade e a qualidade dos exsudatos, resultando em um novo equilíbrio microbiológico a ser estabelecido. Essas mudanças envolvem presumivelmente os mesmos tipos de organismos envolvidos na rizosfera antes da formação da micorriza, mas mudanças quantitativas ocorrem como resultado de interações metabólicas diretas com a hifa do fungo micorrízico, ou por efeitos indiretos mediados pelo hospedeiro.

O conceito de rizosfera se originou na microbiologia do solo. A rizosfera, segundo vários autores citados por Oliveira (1988), se caracteriza por uma forte atividade microbiana em razão da intensidade das interações entre as raízes e os microrganismos do solo. Segundo esse autor, no que se refere à micorrizas, muitas observações evidenciam mudanças ao nível das comunidades microbianas da rizosfera, entre raízes micorrizadas e não micorrizadas.

Uma diferença chave entre o efeito da rizosfera no solo ao redor das raízes não micorrizadas e a micorrizosfera, é a presença de hifas extra-matriciais do fungo micorrízico que se estendem para fora da raiz no solo (Linderman, 1992). Segundo esse autor, hifas extra-matriciais e rizomorfos de fungos ectomicorrízicos tem um profundo efeito na microflora do solo, e sugere o termo “efeito da micosfera” para descrever o aumento na população de microrganismos específicos próximos à estruturas fúngicas no solo. Segundo Paulitz & Linderman (1991), implícito no conceito de micorrizosfera está a hipótese de que a micorriza exerce uma forte influência na microbiota da rizosfera.

Segundo Gilbert & Linderman (1990), citados por Linderman (1992), as interações metabólicas entre o fungo micorrízico e estruturas vegetativas, e esporos de fungos presentes no solo, podem favorecer o aumento e a seleção de determinados microrganismos, e inibir o desenvolvimento de outros. Por outro lado, o tipo e a quantidade de propágulos na micosfera pode afetar profundamente a infecção e a eficiência micorrízica. Segundo Linderman (1992), independente do tipo de micorrizas presente, as substâncias exsudadas das raízes micorrizadas podem ter efeitos diretos e indiretos sobre outros microrganismos habitantes da rizosfera.

A formação da rede de Hartig no córtex e do manto fúngico externamente, aumentam a superfície de troca entre o hospedeiro e o fungo micorrízico. Esse tipo de colonização induz mudanças na ramificação das raízes devido a produção de fitohormônios nos tecidos colonizados, aumentando muitas vezes a área para absorção de nutrientes (Paulitz & Linderman, 1991). Quando a planta se torna micorrizada, sua fisiologia muda significativamente. Ocorrem mudanças na concentração de compostos reguladores de crescimento, como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno. A razão fotossintética aumenta, alterando a partição de fotossintatos entre parte aérea e raízes. A composição nutricional do hospedeiro, muda em resposta a um aumento na absorção de minerais do solo. Em função dessas alterações morfológicas e fisiológicas, outros microrganismos do solo são afetados, resultando em um novo balanço na rizosfera. Não há dúvidas que a presença de micorrizas afeta outros microrganismos do solo, e outros microrganismos afetam a micorriza. Essas interações podem ser tanto diretas por trocas metabólicas, ou

indiretas como por intermédio de mudanças na planta hospedeira. Segundo esses autores, nós estamos sómente começando a compreender quais mudanças ocorrem, como ocorrem, e quais organismos são afetados.

2.2 - Caracterização e fracionamento da matéria orgânica

Diferentes fontes de matéria orgânica têm sido utilizadas em viveiros de *Eucalyptus* no preparo dos substratos das mudas. A maioria dessas fontes, geralmente de baixo custo e disponível em grandes quantidades nas empresas florestais, fornecem nutrientes minerais e tem boa textura para formação de mudas. Entretanto, seus efeitos sobre o desenvolvimento de ectomicorrizas nessa cultura é pouco conhecido. Segundo Bowen & Theodorou (1973) e Slankis (1974), o grau de humificação de uma matéria orgânica pode ser determinante no estabelecimento da associação micorrízica.

Varadachari & Ghosh (1984) propuseram um esquema para formação do húmus no solo, em que a lignina e os carboidratos, principais fontes de carbono para os microrganismos, são os primeiros a serem degradados por enzimas extracelulares a unidades menores. Unidades solúveis em água são absorvidas pelas células microbianas onde parte delas são convertidas a fenóis e quinonas. Estes, juntos com as enzimas oxidantes são descarregados para um ambiente onde ocorre polimerização por mecanismos de preenchimento dos radicais livres. A formação de ácidos fúlvicos e ácidos húmicos seguem a mesma linha em um estágio mais avançado de humificação, e estes autores concluíram que a diferença entre ácidos fúlvicos e

ácidos húmicos, está meramente no grau de polimerização e que os ácidos fúlvicos não são necessariamente mais alifáticos que os ácidos húmicos.

A matéria orgânica presente em um substrato, pode ser separada quimicamente em frações através de métodos analíticos em laboratório (Schnitzer, 1982). A classificação química da matéria orgânica, segundo Nascimento *et al.* (1983) a separa em dois grupos principais: substâncias húmicas de composição complexa e não bem definida (húmus), e substâncias não húmicas (frações quimicamente definidas). As propriedades químicas do húmus diferem consideravelmente entre si em função do material de origem.

Volkoff & Andrade (1975), trabalharam com caracterização da matéria orgânica em alguns solos ferralíticos no Estado da Bahia, através de um método de fracionamento de substâncias húmicas por precipitação em soluções ácidas e básicas. Esse método, embora empírico, por trabalhar com grupos relativamente grandes de compostos com características químicas semelhantes, permitiu diferenciar a quantidade e a estabilidade da matéria orgânica nos solos analisados.

O fracionamento químico da matéria orgânica humificada, proposto por Schnitzer (1982), reúne estas frações em 4 grupos funcionais com base em suas características de solubilidade: fração solúvel em água ; matéria húmica, solúvel em meio alcalino; ácidos fúlvicos, solúveis em meio ácido; e ácidos húmicos, solúveis em meio alcalino. Como resíduo sólido precipitam-se as huminas, estáveis e insolúveis em quaisquer desses reagentes.

Para verificar isoladamente o efeito de cada fonte de matéria orgânica sobre a associação micorrízica, alguns substratos orgânicos utilizados para a produção de mudas e as diferentes fontes de matéria orgânica que fazem parte destes, podem ser fracionados analiticamente em laboratório pelo método acima proposto por Schnitzer (1982) e adaptado por Melo (1994).

2.3 - Quantificação da infecção micorrízica

Os métodos para quantificação de ectomicorrizas através de cortes histológicos para observação da rede de Hartig nas células do córtex, ou da contagem visual da porcentagem de ápices com manto fúngico, são excessivamente trabalhosos e não quantificam biomassa nem atividade fúngica. Por outro lado, a estimativa visual da porcentagem de raízes micorrizadas, é um método rápido e prático, porém subjetivo e carece de precisão. Segundo Nylund & Wallander (1992), a quantificação de ectomicorrizas sempre tem sido um problema, ressaltando que os métodos tradicionais usados por Melin e seus seguidores através da contagem de “root tips” são insatisfatórios para estudos fisiológicos. Esses autores utilizaram com resultados satisfatórios o método da análise de ergosterol para quantificação da biomassa fúngica, justificando o seu uso pela sensibilidade para pequenas infecções e por quantificar somente biomassa metabolicamente ativa do fungo micorrízico.

Para estudos sobre a associação *in vitro*, e, principalmente na fase de viveiro, torna-se muito difícil separar a biomassa micelial do substrato utilizado para crescimento das mudas. Tais limitações impedem a quantificação do micélio intramatricial, sendo a avaliação da micorrização feita sobre todo o substrato

composto por raízes, matéria orgânica e perlita. Quando uma biomassa fúngica não pode ser separada de um substrato sólido, o crescimento do fungo pode ser monitorado pela medição de um componente químico (Seitz *et al.*, 1979). O ergosterol é o esterol predominante na maioria dos fungos e ausente nos tecidos das plantas e outros organismos. O ergosterol é o principal componente das membrana celular, e isso permite uma boa relação da mensuração dessa substância com a biomassa “metabolicamente ativa” de um fungo (Nylund & Wallander, 1992). Uma rápida extração do ergosterol do substrato com as raízes e uma quantificação através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi utilizada com sucesso pelos autores acima para quantificar a invasão fúngica em grãos de cereais. Esses autores sugeriram que o ergosterol poderia ser utilizado para quantificar a atividade fúngica em outros materiais naturais.

Essa metodologia para análise do ergosterol proposta originalmente por Seitz *et al.*(1979) para detectar micotoxinas em grãos armazenados, tem sido utilizada para outros tipos de pesquisa, como citados por Nylund & Wallander (1992), para estimar a fração fúngica em detritos (Lee *et al.*, 1980), para resistência de folhas de trigo a patógenos fúngicos(Griffits *et al.*, 1985), biomassa de fungos de solo (Matcham *et al.*, 1985; Grant & West,1986), micoflora de solo de floresta (Zelles *et al.*,1986), e biomassa de fungos decompositores de material vegetal (Newell *et al.*, 1987, Newell *et al.*, 1988).

A técnica de análise do ergosterol foi utilizada ainda por outros autores com sucesso para quantificação de biomassa micorrízica (Salmanowicz & Nylund, 1988;

Johnson & McGill,1990; Nylund & Wallander,1990; Martin *et al.*, 1990). Esta técnica foi utilizada no presente trabalho como método alternativo de avaliação de micorrizas pela quantidade de ergosterol,comparado a um método tradicional de avaliação através da observação visual da porcentagem de raízes com manto fúngico. De acordo com Nylund & Wallander (1992), os procedimentos básicos envolvem amostragem, extração, saponificação, separação, filtragem da amostra e determinação do ergosterol com um aparelho de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Algumas variações entre os procedimentos para extração são observadas em vários trabalhos, principalmente em função do tipo de tecido vegetal ou substrato utilizado como amostra, ou ainda do solvente orgânico utilizado durante a extração. Esses autores concluíram que, embora preciso, o método possui ainda falhas básicas, vindas das variações no conteúdo de ergosterol, dependendo das condições de crescimento e das variações entre as espécies fúngicas. Do mesmo modo que culturas axênicas em micorrizas formadas com uma única espécie de fungo são estudados, este mesmo problema pode estar sendo negligenciado na técnica do ergosterol, limitando os resultados e conclusões obtidas, sugerindo para uma avaliação mais completa da eficiência desse método, a necessidade de se trabalhar com culturas axênicas do fungo, com a associação micorrízica e comparados simultâneamente com outros métodos de avaliação.

2.4-Antagonismo *in vitro* entre *P. tinctorius* e fungos isolados da micorrizosfera

Pesquisas nessa área têm demonstrado que certos microrganismos estimulam a formação de ectomicorrizas, outros a inibem, e outros aparentemente

não exercem influência sobre a associação. Segundo Oliveira (1988), a respeito da ação de *Trichoderma spp.*, um reconhecido antagonista, as observações são as vezes contraditórias, comentando que é bem provável que exista uma certa tendência por parte dos pesquisadores em considerar esses fungos como elementos indesejáveis a micorrização. Isto pode ser consequência das pesquisas se concentrarem na utilização de espécies com ação antagônica a patógenos de raízes. De um modo geral, a atividade antagonista se manifesta de duas formas: antibiose (Dennis e Webster, 1971), e micoparasitismo (Dennis e Webster, 1971; Oliveira *et al.*, 1984), citados por Oliveira (1988).

Summerbell (1987), verificou que *Trichoderma viridi* e *Trichoderma polysporum* isolados da micorrizosfera de “blackspruce”, foram fortemente antagonistas a colonização micorrízica por *Laccaria bicolor* inoculada axenicamente em “seedlings” de *Picea mariana*.

Estudando o antagonismo de *P. tinctorius* contra alguns patógenos de raízes, Marx (1969) relatou a ineficiência do fungo micorrízico na inibição dos fitopatógenos avaliados. Segundo Kope & Fortin (1989), o método utilizado por Marx (1969) mostrava-se mais favorável ao antagonismo do fungo patogênico sobre *P. tinctorius*, subestimando os efeitos do fungo micorrízico. O método clássico utilizado por vários autores para testar o antagonismo entre fungos micorrízicos e fitopatógenos é a confrontação de duas colônias em uma mesma placa de Petri. Este método não considera as diferenças na velocidade de crescimento dos fungos, e têm demonstrado que a competição por nutrientes, espaço, ou acidificação do meio

podem ser maiores que a produção de substâncias antibióticas (Kope & Fortin, 1989).

Bueno (1994) encontrou efeito inibidor sobre *P. tinctorius* de substâncias extraídas por autoclavagem de culturas de três isolados de *Trichoderma* spp. e um isolado bacteriano, obtidos em substratos de viveiro de eucalipto, incorporados ao meio de cultivo MMN. Apesar do forte antagonismo verificado, os isolados de *Trichoderma* não parasitaram as hifas de *P. tinctorius* em meio com ágar, concluindo que a antibiose foi o principal mecanismo de inibição constatado. Nos testes *in vitro* com plântulas de *Eucalyptus urophylla* inoculadas com *P. tinctorius*, os isolados de *Trichoderma* e *Penicillium* mostraram indícios de acúmulo de compostos fenólicos nas raízes, podendo ser este mais um mecanismo de inibição. A ocorrência de parasitismo e de competição não foram observadas.

Entre os casos favoráveis a associação, encontram-se os resultados de Chakravarty & Unestam (1987), que estudaram por mais de um ano em condições de casa de vegetação, a influência dos fungos ectomicorrízicos *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme* e *P. tinctorius* na resistência de “seedlings” ao ataque por *Fusarium moliniforme* e *Rhizoctonia solani*, com balanceada mas baixa suplementação nutricional. As plantas micorrizadas tiveram maior estímulo que as não micorrizadas, a severidade das doenças e a mortalidade das plantas foram menores na presença dos fungos micorrízicos, sempre que estes se estabeleceram antes dos fitopatogênicos. Esta proteção continuou durante todo tempo de estudo para *P. tinctorius* e *L. lacata*, mas o estímulo no crescimento e a frequência de

micorrização nem sempre foram correlacionados com o nível de proteção aos patógenos. Os fungos micorrízicos tiveram pequeno ou nenhum efeito sobre os patógenos *in vitro*.

McAfee & Fortin (1988), cultivando plântulas de *Pinus banksiana* e *Larix laricina* em substrato de vermiculita mais turfa autoclavados e as inocularam com *Laccaria bicolor*, *Pisolithus tinctorius* e *Hebeloma cylindrosporum*, com e sem uma fina suspensão de solo. Os tratamentos que receberam a adição da suspensão de solo aumentaram significativamente a formação de ectomicorrizas por *L. bicolor* e *P. tinctorius* em *P. banksiana* e aumentaram também a altura das plântulas.

Segundo Kope & Fortin (1989), muitos estudos tem investigado as formas de proteção das raízes por fungos micorrízicos, como resultado da formação de uma barreira física ou química, ou competição com os patógenos, mas poucos tem diferenciado as formas de proteção ou de antagonismo que podem ocorrer na micorrizosfera. Estes autores montaram em condições de laboratório, um “screening” para seleção de fungos ectomicorrízicos, e mostraram que metabólitos extracelulares causaram uma morfogênese generalizada de fitopatógenos. Mais especificamente, *P. tinctorius* produziu metabólitos em meio agarizado que lisaram as hifas e causaram outras alterações morfológicas que indicaram disfunção no metabolismo celular em *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e outros patógenos de solo. Existem trabalhos relatando reações antagônicas como resultado de ação direta de uma hifa sobre outra, mas segundo Kope & Fortin (1989), este é o primeiro relato da ação de enzimas

extracelulares causando o rompimento de disfunção nas hifas em outras espécies fúngicas.

Chakravarty *et al.* (1990), estudando o efeito da inoculação de *Paxillus involutus* em “red pine” (*Pinus resinosa*) combinado com diferentes doses de alguns fungicidas, obteve melhor controle do “damping-off” causado por *Fusarium oxysporum* nos tratamentos inoculados com o fungo micorrízico na presença de 10 ppm dos fungicidas, em relação aos não inoculados. O crescimento micelial de *P. involutus in vitro* não foram alterados por concentrações de até 1000 ppm dos fungicidas, sugerindo um controle integrado do “damping-off” causado por *Fusarium* em *P. resinosa*.

Kope & Fortin (1990), trabalhando com filtrados de *P. tinctorius* incorporados ao meio de cultivo sólido, observaram que metabólitos de *P. tinctorius* lisavam as hifas e os conídios e inibiam a germinação de conídios de fungos fitopatogênicos, como hifas de *Rhizoctonia sp.*, e hifas e conídios de *Fusarium solani*, *Truncatella hartigii*, *Sphaerospora brunnea* e outros fungos, em concentrações de 20% de volume de filtrado por volume de meio de cultivo.

Suh *et al.* (1991), estudando os efeitos de metabólitos antifúngicos produzidos por *P. tinctorius* em árvores de “old growth fir” (*Abies*) no Tennessee - U.S.A., encontraram um isolado de *P. tinctorius* com forte inibição sobre o crescimento de *Fusarium solani*, *Verticillium dahliae*, *Geotrichum candidum* e *Phanerochaete chrysosporium* quando pareados em meio sólido. Evidências da inibição de crescimento no pareamento das colônias, indicaram a produção de

substâncias antifúngicas pelo isolado de *P. tinctorius*. Os demais isolados testados não tiveram, ou tiveram menor atividade inibitória. A atividade antifúngica nesse estudo foi associada a um metabolismo induzido, com a produção de metabólitos fenólicos solúveis em água liberados no meio de cultivo.

Tzantrizos *et al.* (1991) isolaram dois metabólitos com atividade antifúngicas produzidos por *P. tinctorius* em meio de cultura, que causaram inibição na germinação de esporos e lisaram as hifas dos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Pythium spp*, *Phytophthora sp.*, *Fusarium solani* e *Pyrenochaeta terrestris*. Estas substâncias antibióticas, denominadas de pisolitinas, pertencem ao grupo dos ácidos fórmico-poli-hidroxi-benzóico e ácido poli-hidroxi-mandélico, os quais mostraram evidências que seu modo de ação sobre outros fungos, envolve a quelatação de íons metálicos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Seleção do isolado de *P. tinctorius* e da espécie de *Eucalyptus*

Este experimento teve por objetivo selecionar uma combinação com bom desenvolvimento micorrízico entre fungo-hospedeiro para posteriores estudos com matéria orgânica na associação, utilizando para isto, três isolados de *Pisolithus tinctorius* coletados em diferentes locais e 5 espécies de *Eucalyptus* utilizadas comercialmente em povoamentos florestais, em condições de viveiro com plântulas inoculadas *in vitro*.

Como espécies de eucalipto para experimentação, foram utilizadas *Eucalyptus grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. citriodora* e *E. maculata*, fornecido pelo Departamento de Ciências florestais da ESALQ-USP. Os isolados do fungo micorrízico *P. tinctorius* foram escolhidos na micoteca do Departamento de Fitopatologia da ESALQ-USP, sendo selecionados para teste os isolados de números 1604 (isolado de *E. grandis* procedência Rio Claro-SP), 1605 (isolado de *E. saligna* procedência. Tupi-SP), e 1607 (isolado de *E. grandis* procedência Anhembi-SP).

Seguindo a metodologia de inoculação *in vitro* desenvolvida por Vida (1989), com algumas modificações, como a redução da fonte de carboidratos no meio de cultivo, visando diminuir problemas na fase de viveiro pela competição com outros microrganismos deletérios à associação, utilizou-se como substrato uma mistura de vermiculita-esfagno (9:1 V/V) umedecida com solução nutritiva MMN , contendo 5g de sacarose por litro, colocadas em tubos de ensaio (18 x 150mm), autoclavados durante 50 minutos a 120 °C.

As sementes foram desinfestadas em álcool (50 %) e hipoclorito de sódio (2 % de cloro ativo) por 10 a 15 minutos, transferidas para meio BDA, e incubadas por quatro dias em temperatura ambiente (ao redor de 27°C), em placas de Petri contendo meio BDA. As sementes que apresentaram qualquer tipo de crescimento fúngico ou bacteriano foram descartadas. Com aproximadamente 4 dias, as sementes livres de contaminações microbianas iniciaram a germinação .

Após a germinação, plântulas com tamanho padronizado entre 1 a 2 cm de altura, foram transferidas axenicamente com pinça para os tubos com substrato autoclavado e a solução nutritiva acima descrita, e simultâneamente inoculadas com dois discos de micélio de *P. tinctorius* depositados lateralmente junto a plântula, entre 1 a 2 cm de profundidade. O inóculo foi préviamente cultivado em meio MMN sólido por três semanas a 27 °C, e dois dias antes da inoculação foram repicados discos de micelio para meio MMN sólido dando um pré-crescimento do fungo antes da inoculação nas plântulas. Após a inoculação, os tubos foram colocados em câmara de crescimento com fotoperíodo de 14 horas de luz/dia a 27°C por cinco

semanas. Cada tratamento (cinco espécies de eucalipto x três isolados do fungo micorrízico) foi constituído por 20 plântulas inoculadas sendo cada plântula uma repetição, com 15 tratamentos, totalizando 300 plântulas.

Após um período de crescimento de cinco semanas nas condições acima descritas, as plântulas nos tubos de ensaio foram avaliadas visualmente, estimando-se a porcentagem de raízes micorrizadas em relação ao volume total do sistema radicular de cada plântula. Nesta avaliação visual, foram selecionadas 15 mudas em cada tratamento com alto índice de infecção micorrízica, para verificar qual espécie e isolado obtiveram melhor micorrização sob condições de viveiro.

As plântulas selecionadas foram transferidas para substrato composto por uma mistura de 50% vermiculita, 25% de terra de subsolo peneirado e 25% de composto de casca de eucalipto, sendo este substrato foi mantido irrigado diariamente com água (2 a 4 vezes ao dia), mantendo um nível nutricional adequado para a micorrização e desenvolvimento das plântulas com solução nutritiva mineral de Sarruge (1975), adicionada periodicamente a cada 2 ou 3 dias, para possibilitar o desenvolvimento das mudas sem sintomas de deficiências minerais, e da associação sem inibição por elevados níveis de nutrientes (Apêndice 2).

Depois de aproximadamente 90 dias em condições de viveiro, as mudas foram retiradas dos tubetes, e seu sistema radicular avaliado visualmente para quantificação de micorrizas nas raízes. Além da avaliação da quantidade de micorrizas, também foi avaliado ainda a altura das mudas após este período.

3.2 - Fracionamento de fontes de matéria orgânica e efeito das frações no crescimento micelial de *P. tinctorius*.

Seguindo a metodologia proposta por Schnitzer (1984), (Figura 1), foram fracionados um substrato orgânico completo utilizado nos viveiros da Ripasa S/A (município de Ibaté-SP), composto pela mistura de três fontes de matéria orgânica, bem como seus componentes separadamente: composto de casca de eucalipto, composto de casca de pinus e composto de bagacilho de cana, amplamente utilizados em viveiros comerciais.

Esta metodologia separa por centrifugação através do uso de ácidos e álcalis, as seguintes frações: fração solúvel em água, matéria húmica, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos, como substâncias extraídas em meio líquido e huminas, como resíduo sólido insolúvel da matéria orgânica. Para cada fração líquida obtida (fração solúvel em água, matéria húmica, ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) foi testado seu efeito *in vitro* sobre o crescimento do fungo micorrízico e montado um experimento em condições de viveiro, na presença da associação fungo-planta, incorporando-se diferentes doses da matéria orgânica original

As diferentes frações obtidas por fracionamento químico, foram incorporadas ao meio de cultura MMN nos níveis de 10%, 20% e 40%, com 5 repetições por tratamento. Como testemunha foi utilizado o meio MMN completo, e diluído com 10% e 20% de água destilada. Como inóculo foi utilizado o isolado 1604 que teve maior crescimento após três semanas no meio MMN a 27°C.

Figura 1 - Protocolo para fracionamento da matéria orgânica (Schnitzer, 1984).

3.3 - Efeito de fontes de matéria orgânica no desenvolvimento de micorrizas de *P. tinctorius* em *E. citriodora* após 90 dias em condições de viveiro.

3.3.1 - Montagem e condução dos experimentos

Estes experimentos foram conduzidos a partir de plântulas germinadas axenicamente e inoculadas *in vitro* em tubos de ensaio, contendo como substrato perlita (química e biologicamente inerte) e solução nutritiva mineral com 5g de sacarose por litro, visando dar um arranque inicial do fungo no substrato. A metodologia utilizada para limpeza das sementes, obtenção das plântulas, inoculação *in vitro* e incubação foi a mesma descrita no item 3.1. Nestes experimentos, foram utilizadas apenas a espécie de *E. citriodora* inoculada com o isolado 1604 de *P. tinctorius*, em função de seu melhor resultado nos testes de micorrização *in vitro*.

Decorridas quatro semanas de incubação, plântulas com 90% ou mais de infecção micorrizica foram transplantadas para bandejas de isopor (60ml cada célula) em condições de viveiro.

Os tratamentos foram constituídos por doses crescentes (0, 25 e 50% V/V) de diversas fontes de matéria orgânica. No primeiro experimento foi utilizado o substrato fornecido pela Cia. Ripasa S/A, usado normalmente em seus viveiros. Nos demais experimentos foram testados o composto de bagacilho de cana, composto de casca de pinus e composto de casca de eucalipto. A escolha destas fontes de matéria orgânica foi com base na sua ampla utilização em viveiros florestais e disponibilidade em grande quantidade. A utilização de perlita como suporte físico quimicamente inerte, incorporada a diferentes níveis e fontes de

matéria orgânica nos tubetes, possibilitou avaliar alguns efeitos inibitórios ou estimulantes dessas fontes na micorrização e na população microbiana do substrato durante a formação das mudas no viveiro, livre de outras interferências nutricionais.

As avaliações constaram da estimativa visual da quantidade de micorrizas nas raízes; da quantificação do ergosterol no substrato; da medição da altura das mudas; do peso seco da parte aérea; e da contagem da população microbiana (fúngica) através de diluição em série e plaqueamento em meio de cultura para cada tratamento.

3.3.2 - Extração do ergosterol e análise por cromatografia líquida (HPLC)

Este método, foi utilizado no presente trabalho como uma alternativa ao método de quantificação tradicional, que consta de avaliações através da observação de cortes histológicos ou da estimativa visual da porcentagem de raízes com formação de manto fúngico em relação ao total de raízes, subjetivos e/ou excessivamente trabalhosos.

O protocolo para extração de ergosterol, adaptado por Sung* (comunicação pessoal), é resumidamente descrito na Figura 2. As etapas iniciais de secagem e centrifugação podem variar em função do tipo de material a ser analisado. Para extração feita diretamente a partir de micélio ou raízes finas não há necessidade de centrifugação, sendo o material seco em liofilizador até peso

* USDA - Forest Service, Athens, GA.

constante e triturado diretamente em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Para extração de ergosterol presente no substrato com raízes, após secagem ao ar o material deve ser centrifugado para separar as partículas mais grosseiras em suspensão. As demais etapas do processo são as mesmas independente do material utilizado para extração.

A análise do ergosterol foi feita em equipamento Shimadzu para cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), após a extração e filtragem do ergosterol, injetando-se uma amostra de volume conhecido (entre 5 a 10 μ l, dependendo da concentração da amostra) no cromatógrafo, equipado com coluna para detecção de ergosterol (Supelco 150 x 4,5mm), com um fluxo de 1 ml de metanol/min. O tempo de retenção para leitura do ergosterol foi de aproximadamente 4 minutos, e o comprimento de onda utilizado (ultra-violeta) foi de 282 nanômetros, conforme proposto por Salmanowicz & Nylund (1988).

Para extração e análise do ergosterol foram utilizadas 5 mudas escolhidas ao acaso dentro de cada tratamento, sendo cada muda considerada uma repetição.

Figura 2 - Protocolo para extração de ergosterol.

3.4 - Quantificação da população fúngica nos substratos

Uma amostra de cada substrato, do qual foram retiradas as mudas para avaliação visual de micorrizas e quantificação do ergosterol nas raízes, foi utilizado para contagem da população fúngica presente no mesmo, para verificar quantitativa e qualitativamente as espécies fúngicas predominaram após o período de crescimento no viveiro e o efeito da inoculação de micorrizas sobre essa população.

O método utilizado para contagem foi a diluição em série em meio de Martin (Johnson & Curl, 1972) para isolamento de microrganismos presentes no solo. Para cada amostra foram plaqueadas cinco repetições, as quais foram incubadas sob condições ambientes. A contagem do número total de colônias e a identificação das espécies mais frequentes foram realizadas feita no quinto dia após o plaqueamento. A amostragem do substrato foi padronizada em 5 gramas por amostra, e a diluição utilizada nas amostras foi determinada em testes preliminares, sendo padronizada a diluição 10^{-3} com uma alíquota de 0,1 ml por placa para todas as amostras.

3.5 - Antagonismo *in vitro* entre *P. tinctorius* e alguns fungos isolados do substrato contendo casca de eucalipto

3.5.1 - Efeito de *P. tinctorius* sobre fungos isolados do substrato

Para avaliar o antagonismo de *P. tinctorius* sobre os fungos isolados do substrato, o fungo micorrízico foi repicado para o meio MMN sólido, colocando-se um disco de 5mm de diâmetro com micélio de *P. tinctorius* próximo ao bordo da placa. As placas contendo *P. tinctorius* foram incubadas por duas semanas a

temperatura ambiente para proporcionar o crescimento do fungo até aproximadamente o centro das placas, quando então foram repicados para o confronto os fungos isolados do substrato, de crescimento muito mais rápido.

A avaliação da inibição *in vitro* foi feita 5 dias após o pareamento. Foram mensuradas a formação de halo de inibição e a redução do tamanho das colônias na presença do fungo ectomicorrízico. Como testemunhas, foram repicados isoladamente discos de micélio contendo *P. tinctorius* para meio MMN sólido e discos contendo os fungos obtidos no substrato também isoladamente, para se obter medidas de crescimento de cada fungo na presença e na ausência de seu competidor.

3.5.2 - Efeito de filtrados dos fungos isolados do substrato sobre *P. tinctorius*.

Para avaliar o efeito dos fungos isolados do substrato sobre o fungo micorrízico, estes foram cultivados durante 10 dias em meio MMN líquido em frascos Erlenmeyer de 125ml incubados em condições ambientes. O extrato obtido foram separados das colônias por filtração funil de Buckner com papel de filtro e bomba de vácuo. Os extratos obtidos, para cada um dos fungos, foram incorporados ao meio MMN sólido nas proporções de 0, 25 e 50%. O meio foi autoclavado por 30 minutos à 121°C, sendo em seguida vertidos em placas de Petri. Após resfriado o meio, foram repicados um disco de micélio no centro de cada placa, avaliando-se após três semanas o crescimento micelial de *P. tinctorius* nos meios com extratos dos fungos isolados do solo comparados ao desenvolvimento das colônias no meio completo. Para cada tratamento foram montadas 5 repetições, e os fungos foram

incubados sob condições ambientes ao redor de 27°C. Como testemunhas, foram repicados discos contendo micélio de *P. tinctorius* para meio MMN sólido completo e para meio MMN com a adição de água destilada nas proporções de 25 e 50% do volume, para verificar um possível efeito da diluição do filtrado incorporado ao meio de cultivo sobre o crescimento micelial de *P. tinctorius*.

3.6 - Avaliação do desenvolvimento de ectomicorrizas após 7 meses em condições de campo.

Visando obter algumas respostas em condições de campo que justifiquem a inoculação *in vitro*, mudas de eucalipto obtidas através desse método de inoculação foram levadas ao campo para avaliação da sobrevivência das mudas e perpetuação da associação no campo em condições naturais. Após avaliação dos resultados no viveiro, as mudas inoculadas e as sem inoculação, produzidas no substrato composto da Ripasa S/A, foram transplantadas para um local com solo tipo areia quartzosa (Tabela 1) onde havia pastagem anteriormente. O local escolhido, próximo da divisa dos municípios Piracicaba e Anhenbi-SP, reflete condições adversas no que se referem a nutrientes e água, visando avaliar o efeito da micorrização nessas condições.

A montagem do experimento foi em linhas com 11 plantas por tratamento no sentido ascendente do terreno, de modo que todas as plantas dentro dos tratamentos ficaram localizados na mesma faixa de solo. Os níveis de 0, 25 e 50% de matéria orgânica nos tubetes foram colocados um ao lado do outro no campo, dentro dos fatores com inoculação e sem inoculação de micorrizas,

totalizando 6 linhas com 11 mudas cada linha. O espaçamento utilizado foi de 1,2 x 1,2 metros entre plantas, com preparo manual do terreno através de capina da pastagem, abertura das covas e coroamento. A adubação de plantio empregou 50 gramas de 4-14-8 por cova junto com o transplante das mudas. O transplante foi realizado em setembro de 1995, e devido à ausência de chuvas nesta época, as mudas foram irrigadas nas três primeiras semanas após o transplante para facilitar o pegamento. No segundo mês após o transplante, foi feita uma calagem sob a copa polvilhando-se 100g de cal hidratada por planta. Na mesma época foi feito um controle de saúvas novcivas a lavoura através do uso de isca granulada Mirex-S, a qual se mostrou eficiente no controle desta praga.

A análise química do solo solo utilizado no presente experimento, bem como do substrato completo, e das fontes de matéria orgânica utilizadas no viveiro, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise química do solo*, da perlita e das fontes de matéria orgânica utilizadas nos experimentos.

	pH	M.O. (%)	P (ppm)	K -----	Ca	Mg meq/100cm ³	H+Al -----	S.B. -----	T	V (%)
Substrato completo	4,5	14,2	238	1,24	35,5	7,0	13,5	43,7	57,2	76
Bagacilho de cana	5,0	7,3	235	0,49	40,0	5,0	5,2	45,5	50,7	90
Casca de pinus	3,7	15,5	258	1,95	39,5	9,0	28,1	50,5	78,6	64
Casca de eucalipto	5,6	18,6	46	2,58	29,0	10,0	4,2	41,6	45,8	91
Perlita	6,2	0,7	24	0,08	4,9	0,2	0,8	5,2	6,0	87
Solo arenoso	5,4	1,2	16	0,11	1,3	0,6	1,6	2,0	3,6	56

* Laboratório de análises de solos - Depto. de Ciência do Solo, ESALQ-USP.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Seleção do isolado de *P. tinctorius* e da espécie de eucalipto

Houve grande variação na formação de micorrizas entre as combinações do fungo micorrízico com as espécies de eucalipto. A melhor combinação, que obteve maior quantidade de micorriza tanto na fase *in vitro* quanto no viveiro, foi a do isolado número 1604 com a espécie *E. citriodora*, obtendo em média 95% de formação de manto fúngico *in vitro*, e 50% após 90 dias em condições de viveiro, visualmente avaliadas (Tabelas 2 e 3). A elevada infecção micorrízica desta combinação fungo-hospedeiro está ilustrada na Figura 3. Houve interação entre isolados e espécies, embora o isolado 1604 tenha proporcionado maior infecção micorrízica para todas as espécies, tanto *in vitro* como no viveiro.

Foi observado durante a repicagem e manutenção dos isolados de *P. tinctorius* em meio de cultura, que o isolado 1604, apresentava um crescimento mais vigoroso que os outros dois isolados, formando uma colônia maior e mais densa na placa sob as mesmas condições de incubação.

Vida (1989) trabalhando com plantlets de *E. grandis*, *E. urophylla* e um híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* inoculados com diversos isolados de *P. tinctorius*,

observou que os isolados que formaram maior quantidade de micorrizas foram os que possuíam maior taxa de crescimento, independente da agressividade, pelo fato de entrarem em contato mais rapidamente com as raízes hospedeiras. Grenville *et al.* (1986), testando a infectividade de de cinco strains de *P. tinctorius* em plântulas de *E. pilularis*, observaram que os isolados de crescimento mais rápido formaram micorrizas no 4º dia após a inoculação, enquanto os de crescimento mais lento formaram após o 8º dia. Burgess *et al.* (1994) testando 20 isolados de *P. tinctorius* em *E. grandis*, encontraram resultados semelhantes, afirmando que geralmente o isolado mais agressivo *in vitro*, e com maior taxa de desenvolvimento micorrízico, também proporciona maior estímulo no crescimento das mudas no viveiro. Esses autores sugerem que, *in vivo*, estes isolados colonizam as raízes novas mais rapidamente, produzindo comparativamente mais micélio extramatricial, sendo por isso mais hábeis para conferir vantagens ao hospedeiro através de um maior volume de solo explorado.

A variação entre os isolados no desenvolvimento micorrízico observado no presente estudo e o maior desenvolvimento micorrízico do isolado 1604 para todas as espécies de eucalipto, foram decisivos na seleção da combinação *E. citriodora* e *P. tinctorius* (isolado 1604) para estudar os efeitos de fontes de matéria orgânica na associação de modo mais consistente. Este isolado, obtido a partir de basidiocarpos desenvolvidos sob a copa de *E. grandis*, mostrou grande capacidade de formar micorrizas com as espécies de eucalipto testadas. O isolado 1607, obtido a partir de *E. grandis* também seguiu esta mesma tendência, porém menos efetivo que o isolado

1604. O isolado 1605 obtido de *E. saligna*, não mostrou bom índice de micorrização, tendo sido observado que esta espécie de eucalipto, teve menor formação de micorrizas com todos os isolados, sugerindo um menor micotrofismo de *E. saligna* por *P. tinctorius*. As espécies *E. citriodora* e *E. maculata*, apresentaram sempre os maiores índices de infecção micorrízica *in vitro* e mantiveram esta tendência durante a fase de viveiro.

Estas variações na infectividade dos isolados por determinadas espécies, têm sido observadas em vários trabalhos (Marx & Byran (1970); Lei *et al.*, 1990; Malajczuk *et al.*, 1990; Burgess *et al.*, 1994), são atribuídas a existência de genótipos do fungo micorrízico e da espécie hospedeira influenciando o desenvolvimento micorrízico e o subsequente crescimento das plântulas.

As diferenças em altura das mudas, embora não tenham sido estatisticamente significativa entre os isolados em apenas três meses sob condições de viveiro, foi numericamente maior no tratamento com a espécie *E. citriodora* inoculada com o isolado 1604 (Tabela 4). Portanto a combinação que obteve maior infecção micorrízica *in vitro* e *in vivo*, indicando uma tendência deste isolado em promover maior crescimento das mudas em relação aos outros testados. O isolado 1604 promoveu maior altura das mudas para as espécies de *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. saligna*, e *E. maculata*, não proporcionando melhor crescimento apenas para *E. urophylla*, o qual curiosamente obteve maior altura com o isolado 1607, já que a micorrização nessa espécie, avaliada visualmente, foi menor do que com o isolado 1604 (Tabelas 3 e 4).

Malajczuk *et al.*(1990); Lei *et al.* (1991) e Burgess *et al.*(1994), trabalhando com vários isolados de *P. tinctorius* e espécies de *Eucalyptus*, afirmam que os ganhos em sobrevivência, peso e altura das mudas inoculadas, durante o breve estágio que passam em condições de viveiro, muitas vezes são de difícil mensuração, uma vez que estão sujeitas a outros fatores variáveis no ambiente de viveiro. Burgess *et al.* (1994) confirmam a existência de grande variação entre isolados de *P. tinctorius* inoculados em *E. grandis*, resultando em ganhos no crescimento que vão desde duas até 45 vezes nas mudas inoculadas em relação as não inoculadas. Bacchi & Krugner (1988), trabalhando com inoculação de *P. tinctorius* em *E. grandis* e *E. urophylla* e Chan & Griffiths (1991), com inoculação de *P. tinctorius* em *E. microcorys* e *E. torelliana*, não observaram ganhos no crescimento nas mudas durante a fase de viveiro.

Baseando-se nos resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* em condições de viveiro, foi selecionada a combinação do isolado 1604 de *P. tinctorius* com a espécie *E. citriodora* e para estudar os efeitos da matéria orgânica no crescimento do fungo *in vitro* e no desenvolvimento da associação em condições de viveiro e de campo. A quantificação de micorrizas nos experimentos seguintes em condições de viveiro e de campo, foram feitas com base na observação visual, e também com base na quantidade de ergosterol presente nas raízes e na rizosfera pelo método de extração de ergosterol. Este método pode detectar pequena infecção micorrízica e a presença de micélio extramatricial no substrato, muitas vezes imperceptíveis em avaliações visuais no mínimo subjetivas.

Figura 3 - A) Plântulas de *Eucalyptus citriodora* inoculadas (esq.) e plântulas não inoculadas (dir.) com *Pisolithus tinctorius* *in vitro*, após 5 semanas de incubação em câmara de crescimento; B) Plântulas com alta infecção micorrízica no sistema radicular, utilizadas nos experimentos conduzidos no viveiro e no campo.

Tabela 2 - Porcentagem de raízes com manto fúngico, visualmente avaliadas, em cinco espécies de eucalipto inoculadas *in vitro** com três isolados de *Pisolithus tinctorius*, após cinco semanas de crescimento.

Espécie	isolados de <i>P. tinctorius</i>		
	1604	1605	1607
<i>Eucalyptus grandis</i>	62,1**c***	50,3 c	54,0 a
<i>E. saligna</i>	41,8 d	25,1 e	15,3 c
<i>E. urophylla</i>	75,0 b	40,4 d	31,9 b
<i>E. citriodora</i>	95,2 a	62,0 b	60,2 a
<i>E. maculata</i>	80,0 b	74,3 a	62,1 a
c.v. = 14,78%			

* Substrato composto de vermiculita e esfagno (9:1) e umedecidas com a solução nutritiva do meio MMN com 5g de sacarose/litro.

** Médias de 15 repetições por tratamento.

*** Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey).

Tabela 3 - Quantificação visual da porcentagem de raízes com manto fúngico em cinco espécies de eucalipto inoculadas *in vitro* com três isolados de *Pisolithus tinctorius* em condições de viveiro* por 90 dias.

Espécie	Isolados de <i>P. tinctorius</i>		
	1604	1605	1607
<i>Eucalyptus grandis</i>	22,2** b***	10,1 b	5,2 b
<i>E. saligna</i>	8,1 c	5,2 b	5,1 b
<i>E. urophylla</i>	27,9 b	10,3 b	11,8 ab
<i>E. citriodora</i>	50,1 a	30,1 a	22,0 a
<i>E. maculata</i>	35,0 b	14,9 b	15,0 ab
c.v. = 48,7 %			

* Substrato composto por vermiculita (50%) + solo (25%) + composto de casca de eucalipto (25%).

** Médias de 10 repetições por tratamento

*** Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey).

Tabela 4 - Altura das mudas* (cm) em cinco espécies de eucalipto inoculadas *in vitro* com três isolados de *Pisolithus tinctorius* em condições de viveiro por 90 dias.

Espécie	Isolados de <i>P. tinctorius</i>		
	1604	1605	1607
<i>Eucalyptus grandis</i>	22,5**	22,2	21,5
<i>E. saligna</i>	20,1	19,2	19,5
<i>E. urophylla</i>	19,3	19,5	21,1
<i>E. citriodora</i>	24,8	22,2	21,2
<i>E. maculata</i>	17,2	16,2	15,7
c.v. = 1,57			

* Substrato de vermiculita (50%) + solo (25%) + composto de casca de eucalipto (25%)

** Médias de 10 repetições por tratamento

*** As médias não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% (Tukey).

4.2 - Fracionamento de fontes de matéria orgânica e efeito de cada fração no crescimento micelial de *P. tinctorius*.

Em todos os experimentos montados *in vitro*, incorporando substâncias orgânicas fracionadas quimicamente e o extrato autoclavado de composto de casca de eucalipto, composto de bagacilho de cana e composto de casca de pinus, as três fontes de matéria orgânica testadas inibiram o crescimento micelial quando seus extratos autoclavados foram incorporados no meio de cultura acima de dez por cento do volume total (Tabelas 5; 6; e 7). Entretanto, quando cada matéria orgânica foi fracionada em substâncias quimicamente diferentes, a fração solúvel em água não teve efeito inibidor no crescimento micelial, possivelmente devido a uma compensação nutricional no meio mesmo quando incorporado a 40% do volume. Este efeito de compensação pode ser observado quando se compara diferentes concentrações da fração solúvel em água com os tratamentos testemunha para a casca de eucalipto e a casca de pinus, aos quais foram adicionados água ao meio em iguais proporções, diluindo a concentração do meio e diminuindo o crescimento das colônias no meio de cultura. Nos tratamentos com a adição da fração solúvel em água o diâmetro das colônias se manteve praticamente constante.

No caso das frações insolúveis em água, a matéria húmica, os ácidos húmicos e os ácidos fúlvicos inibiram acentuadamente o crescimento micelial, sendo esse efeito mais forte para as frações matéria húmica e ácidos fúlvicos obtidas da casca de *Pinus*. O extrato autoclavado de composto de casca de *Pinus* e suas frações insolúveis em água foram as substâncias que mais inibiram o crescimento micelial em

meio de cultura. Para o composto de casca de eucalipto e para o de bagacilho de cana os resultados seguiram a mesma linha, embora com diferenças menos acentuadas (Tabelas 5; 6; e 7). Esses resultados indicam que as substâncias que podem interferir negativamente no crescimento micelial de *P. tinctorius* não são substâncias solúveis em água, mas sim compostos presentes na matéria húmica e nos ácidos húmicos e fúlvicos formados durante o processo de compostagem, podendo variar com a fonte originária e com o estado de compostagem desse material. Segundo Schnitzer (1984), a umidade, a temperatura e a população microbiana presente durante o processo de compostagem são os principais fatores que influenciam na humificação de um material orgânico.

Tabela 5 - Efeito de frações de composto de casca de eucalipto e do extrato autoclavado incorporados ao meio MMN* sólido, no crescimento radial (cm) das colônias de *Pisolithus tinctorius*.

Conc. (%V/V)	Extrato autoclavado	F.S.A.**	Matéria. Húmica	Ácidos Fúlvicos	Ácidos húmicos
0	8,6a***	8,6 a	8,6 a	8,6 a	8,6 a
10	5,6 b	7,8 a	6,2 b	6,2 b	7,8 a
20	1,2 d	7,0 ab	6,2 bc	5,8 c	7,5 a
40	0.5 e	7,8 a	5,2 c	4,0 d	6,6 b

* MMN - Modified Melin-Norkans.

** F.S.A. - Fração solúvel em água.

*** Média de 5 repetições por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente a 5% pelo teste de Tukey.

Tabela 6 - Efeito de frações de composto de bagacilho de cana e do extrato autoclavado incorporados ao meio MMN* sólido, no crescimento (cm) das colônias de *Pisolithus tinctorius*.

Conc. (% V/V)	Extrato autoclavado	F.S.A. **	Matéria Húmica	Ácidos Fúlvicos	Ácidos Húmicos
0	7,9 a***	7,9 a	7,9 a	7,9 a	7,9 a
10	6,4 bc	6,0 c	7,4 a	7,0 ab	7,7 a
20	4,5 c	6,3 a	5,3 bc	6,1 ab	6,3 a
40	0,5 d	6,4 a	3,4 c	4,9 b	5,1 b

* MMN - Modified Melin-Norkans.

** F.S.A. - Fração solúvel em água.

*** Média de 5 repetições por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente a 5% pelo teste de Tukey.

Tabela 7 - Efeito de frações de composto de casca de pinus e do extrato autoclavado incorporados ao meio MMN* sólido, no crescimento (cm) das colônias de *Pisolithus tinctorius*.

Conc. (% V/V)	Extrato autoclavado	F.S.A. **	Matéria Húmica	Ácidos Fúlvicos	Ácidos Húmicos
0	8,1 a***	8,1 a	8,1 a	8,1 a	8,1 a
10	2,2 c	8,1 a	8,0 a	8,2 a	5,9 b
20	0,6 d	8,0 a	5,1 c	7,0 ab	4,3 c
40	0,5 d	8,0 a	1,8 c	3,6 b	0,5 d

* MMN - Modified Melin-Norkans

** F.S.A. - Fração solúvel em água.

*** Média de 5 repetições por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem significativamente a 5% pelo teste de Tukey.

Tan & Nopamornbodi (1979), verificando o efeito de ácidos fúlvicos no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius in vitro*, observou que o efeito inibitório destas substâncias é maior em pH ácido que em pH neutro, sugerindo que os ácidos fúlvicos adicionados e os açúcares presentes no meio de cultivo são absorvidos em maiores concentrações em pH 7,0 do que em pH 4,0. Isto explica em parte, o efeito inibidor mais acentuado da casca de *Pinus* adicionada ao meio tanto na forma de extrato autoclavado como através do fracionamento químico. Esta fonte de matéria orgânica apresentou pH em torno de 3,7; o mais baixo de todas as fontes testadas (Tabela 1). Esta acidez, embora tenha sido corrigida durante o preparo do meio para todas as fontes e frações testadas para próximo de 5,6; deve ter abaixado durante o período de crescimento do fungo, uma vez que a matéria orgânica tem um certo efeito tampão no pH, tendendo a voltar para próximo do pH original.

Para o composto de casca de eucalipto, cada fração separada quimicamente foi analisada através do método da digestão nitro-perclórica para saber se existem grandes variações nos teores de fósforo, cálcio, magnésio e potássio. Estes resultados, embora analisados somente para frações obtidas com composto de casca de eucalipto, indicam que a inibição do crescimento micelial por estes compostos insolúveis em água não são de origem nutricional, sugerindo a presença de substâncias mais complexas limitando o crescimento do fungo.

A análise química das substâncias obtidas pelo fracionamento do composto de casca de eucalipto (Tabela 9), mostra que os níveis de fósforo presentes em cada substância não atingem níveis limitantes ao crescimento do fungo no meio de cultura.

Tabela 8 - Análise química das substâncias obtidas a partir do fracionamento químico de composto de casca de eucalipto, obtidas pelo método da digestão nitro-perclórica*.

Fração	P	Ca	Mg	K
F.S.A.	20**	630	150	210
Ác. Húmico	30	50	10	10
Mat. Húmica	30	140	10	10
Ac. Fúlvico	30	470	40	40

* Laboratório de Análises Químicas do Depto. Ciências Florestais - ESALQ.

** ppm .

Estes resultados sugerem que a inibição no crescimento do fungo por essa matéria orgânica não é, como poderia se supor, por elevados níveis de fósforo presentes no mesmo.

Segundo Tan (1977), o peso molecular dos constituintes da matéria orgânica também exerce influência na sua capacidade de ser absorvida e degradada por um fungo ou outro microrganismo do solo. Este autor sugeriu que as substâncias solúveis em água, em geral de baixo peso molecular, são as primeiras a serem absorvidas e utilizadas, e a medida que a matéria húmica e os ácidos húmicos e fúlvicos, vão se tornando cada vez mais estáveis em moléculas mais complexas e de alto peso

molecular, vão sendo gradativamente mais difíceis de serem absorvidas através das membranas e metabolizados pelos microrganismos, sendo este mais um efeito inibitório destas substâncias.

Os resultados obtidos com as três fontes de matéria orgânica, embora estudados isoladamente *in vitro*, sem passar por muitas das transformações e interações que podem ocorrer no solo e na micorrizosfera, sugerem que os fatores de inibição da matéria orgânica sobre o fungo micorrízico, estão presentes em substâncias complexas, estáveis e de alto peso molecular, sendo de difícil degradação como os ácidos fúlvicos e os ácidos húmicos.

4.3 - Efeito de fontes de matéria orgânica no desenvolvimento de ectomicorizas de *P.tinctorius* em *Eucalyptus citriodora*.

Os resultados obtidos com plântulas de *E. citriodora* inoculadas *in vitro* com o isolado 1604 de *P.tinctorius* que apresentaram melhor combinação funfo-hospedeiro (Figura -3), permitiram montar quatro experimentos em condições de viveiro, nos quais foram avaliados a quantidade de raízes com manto fúngico observadas visualmente, a quantidade de ergosterol em $\mu\text{g/g}$ de substrato, a altura das mudas (cm), e a população fúngica qualitativa e quantitativa no substrato.

Os resultados obtidos para a quantidade de manto fúngico visualmente observados, mostram que a adição de matéria orgânica inibiu o desenvolvimento da associação, sendo esse efeito mais acentuado quando se utilizou cada fonte de matéria orgânica separadamente, enquanto que o substrato completo composto pela mistura de

casca de eucalipto, bagacilho de cana e casca de pinus em iguais proporções, resultou em maior quantidade de micorrizas (Tabela 9) e em maior altura das mudas (Tabela 11). A matéria orgânica que resultou em maior efeito inibitório foi a casca de *Pinus*, apresentando uma redução mais significativa no desenvolvimento micorrízico quando adicionada acima de 25% do volume do substrato. Nos testes de inibição *in vitro*, esta fonte de matéria orgânica também resultou em maior inibição do crescimento micelial de *P. tinctorius*.

Entretanto, a avaliação da quantidade de micorrizas visualmente através da presença ou não de manto fúngico externamente (Tabela 9), pode ser falha no caso da existência de pequena quantidade de micélio extramatricial. A quantidade de ergosterol obtida nos tratamentos inoculados em diferentes níveis de matéria orgânica, indicam que há a presença de uma biomassa fúngica maior nas mudas inoculadas em relação as não inoculadas, sendo este efeito mais acentuado após algum tempo sob condições naturais no campo (Tabela 10).

Tabela 9 - Desenvolvimento micorrízico (% de superfície radicular micorrizada) visualmente observado em mudas de *Eucalyptus citrodora* inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius*, em 4 substratos contendo perlita em diferentes concentrações de fontes de matéria orgânica, após 90 dias em condições de viveiro .

	% de matéria orgânica			C.V. (%)
	0	25	50	
Substrato completo	81,1 a*	68,8 ab	56,5 b	11,5
Bagacilho de cana	77,0 a	59,2 b	44,5 c	12,7
Casca de pinus	65,2 a	35,5 b	21,1 c	16,9
Casca de eucalipto	75,3 a	62,5 b	52,2 b	11,8
Média	74,65	56,53	43,57	

* Médias de 11 repetições por tratamento. Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si a 5% (Tukey).

Tabela 10 - Quantidade de ergosterol (g / g substrato) o substrato contendo mudas de *Eucalyptus citriodora* inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius* e não inoculadas após 90dias sob condições de viveiro.

	inoculado			não inoculado			C.V. %
	0 %	25 %	50%	0 %	25 %	50 %	
substrato completo	67,2 abc*	100,1 ab	128,2 a	26,4 c	56,4 bc	63,8 abc	46,3
bagacilho de cana	52,1 bc	77,2 ab	89,1 a	8,6 d	26,1 cd	44,8 bc	33,9
casca de pinus	48,6 a	33,8 ab	25,6 bc	2,6 d	5,6 d	10,2 cd	45,6
casca de eucalipto	17,8 b	25,2 b	58,3 a	6,2 b	13,3 b	23,2 b	42,7

*Médias de 5 repetições por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha, não diferem entre si a 5% (Tukey).

Tabela 11 - Altura das mudas (cm) de *Eucalyptus citriodora* inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius* e não inoculadas, em substrato (perlita) contendo diferentes concentrações de fontes de matéria orgânica após 90 dias sob condições de viveiro.

	inoculado			não inoculado			C.V.(%)
	% de matéria orgânica						
	0	25	50	0	25	50	
substrato completo	17,8*c	20,2 bc	23,2 ab	21,8 bc	23,8 ab	25,4a	17,1
bagacilho de cana	15,6 b	19,4 ab	23,1 a	21,0 ab	22,0a	23,5 a	15,4
casca de pinus	13,8 d	16,6 cd	18,4 bc	18,8 abc	20,0 ab	21,4a	10,3
casca de eucalipto	18,2 c	20,0 bc	23,0 a	20,4 bc	21,8 ab	23,8a	15,7

* Médias de 10 repetições por tratamento. Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente entre si a 5% (Tukey).

A altura das mudas na fase de viveiro variou tanto em função da adição de matéria orgânica no substrato quanto em função da inoculação com *P. tinctorius*, sendo o melhor resultado obtido nos tratamentos inoculados em substratos com 50% de matéria orgânica incorporada (Tabela 11).

Tabela 12 - Peso de matéria seca (g) da parte aérea das mudas de *Eucalyptus citriodora* inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius* e não inoculadas, em substrato (perlita) contendo diferentes concentrações de fontes de matéria orgânica após 90 dias sob condições de viveiro.

	inoculado			não inoculado			
(% M.O.)	0	25	50	0	25	50	C.V.(%)
bagacilho de cana	0,81 b	1,33a	1,66a	0,67 b	0,81 b	1,21a	6,7
casca de pinus	1,03a	1,51a	1,71a	0,85 b	1,23a	1,30a	11,6
casca de eucalipto	1,17a	1,42a	1,80a	0,82 b	1,55a	1,78a	9,7
Média	1,00	1,42	1,72	0,78	1,20	1,43	

* Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra dentro do fator inoculação, não diferem entre si a 5% (Tukey).

4.4- Efeito da inoculação de mudas de *E. citriodora* com *P. tinctorius* sobre a população fúngica do substrato com diferentes fontes de matéria orgânica em condições de viveiro.

A adição de matéria orgânica no substrato influenciou a população fúngica no substrato, provocando mudanças quantitativas e qualitativas nas espécies colonizadoras da rizosfera e da micorrizosfera. A contagem da população fúngica total para as três fontes de matéria orgânica testadas, mostram que a adição de matéria orgânica aumenta o número de propágulos fúngicos no substrato, independente da fonte incorporada (Figura 4). Estes resultados quantitativos, embora previsíveis, pelo fato da matéria orgânica estimular a atividade microbiana no substrato, mostraram mudanças qualitativas muito mais interessantes quando se fez a identificação dessas espécies, para os tratamentos inoculados com *P. tinctorius* e para os não inoculados. Do ponto de vista qualitativo, houve um aumento no número de colônias de *Trichoderma* em todos substratos contendo mudas inoculadas com *P. tinctorius* em relação aos não inoculados (Figura 5). No substrato composto por casca de eucalipto este efeito foi mais acentuado (Figura 5 e Figura 8). Nos tratamentos não inoculados com *P. tinctorius*, houve um aumento no número de colônias de *Aspergillus* e *Penicillium* nas três fontes de matéria orgânica testadas (Figura 7).

Ainda do ponto de vista qualitativo, foi variável a população de *Fusarium* em função da inoculação de *P. tinctorius* e da fonte de matéria orgânica utilizada (Figura 8). Quando se utilizou bagacilho de cana, nos tratamentos não

inoculados com *P. tinctorius* aumentou a população de *Fusarium* e *Aspergillus* e *Penicillium*, enquanto nos tratamentos inoculados com *P.tinctorius*, aumentou *Trichoderma* e reduziu *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Figuras 5 e 6).

A utilização de composto de casca de pinus, teve um estímulo menor que as demais fontes de matéria orgânica na população microbiana (Figura 4). Este composto seguiu as mesmas tendências dos resultados obtidos com bagacilho de cana, mas quantitativamente resultou em menor número de propágulos por grama de substrato. Entre as possíveis hipóteses para explicar este fato, talvez as mais prováveis devam ser a presença de resíduos de açúcares devido a uma compostagem incompleta, ou uma microbiota potencialmente maior desde o início do preparo do substrato, uma vez que nenhuma das fontes de matéria orgânica utilizadas passaram por esterilização ou fumigação antes do transplante das mudas para o viveiro. Apenas o substrato completo utilizado no viveiro foi fumigado antes do transplante das mudas nesta fase, mas com este não foi possível fazer a contagem da população fúngica.

A maior quantidade de colônias de *Trichoderma* nos substratos contendo mudas inoculadas com *P.tinctorius*, pode ter sido favorecida por uma presença de maior número de propágulos dessa espécie nesses substratos em resposta a um antagonismo direto com o fungo micorrízico, elevando o número de propágulos de *Trichoderma*; ou ainda a efeitos indiretos da inoculação, como o estímulo de outros fungos presentes no substrato e do antagonismo desses com as espécies de *Trichoderma*.

Trabalhando com várias espécies fúngicas inoculadas em coníferas, Bowen (1979) concluiu que é possível estabelecer relações simbióticas rápidas e eficientes mesmo na presença de microbionts que ocorrem naturalmente no solo, afirmando que em muitos casos os resultados obtidos em solos não fumigados são melhores, em função de um estímulo no crescimento de fungos micorrízicos pela presença de exsudatos de outros microrganismos. A matéria orgânica por sua vez, têm efeitos benéficos sobre a planta, conforme discutido por Allison (1973), efeitos estes que se estendem além da planta e influenciam toda população microbiana presente no solo. No presente trabalho, foi observado que a presença de matéria orgânica, independente da fonte utilizada, aumentou a população fúngica total no substrato, mas a inoculação de *P.tinctorius*, teve um efeito seletivo sobre esta população. Estes efeitos, originados em função de haver ou não antagonismo entre o fungo micorrízico e os fungos presentes no substrato, são discutidos no item seguinte.

Dos fungos que apareceram com maior frequência nos isolamentos feitos a partir dos substratos testados, foram selecionados um isolado de *Trichoderma*, um de *Fusarium*, e um de *Penicillium*, para testar a existência de antagonismo *in vitro* contra *P. tinctorius*, discutidos no próximo item.

Figura 4 - População fúngica total/g de substrato em três fontes de matéria orgânica utilizadas para produção de mudas de *Eucalyptus citriodora*, inoculadas e não inoculadas com *Pisolithus tinctorius*, após 90 dias em condições de viveiro.

Figura 5 - Número de colônias de *Trichoderma sp*/g de substrato em três fontes de matéria orgânica utilizadas para produção de mudas de *Eucalyptus citriodora*, inoculadas e não inoculadas com *Pisolithus tinctorius*, após 90 dias sob condições de viveiro.

Figura 6 - Número de colônias de *Aspergillus sp* e *Penicillium sp*/g de substrato em três fontes de matéria orgânica utilizadas para produção de mudas de *Eucalyptus citriodora*, inoculadas e não inoculadas com *Pisolithus tinctorius*, após 90 dias sob condições de viveiro.

Figura 7 - Número de colônias de *Fusarium sp*/g de substrato em três fontes de matéria orgânica utilizadas para produção de mudas de *Eucalyptus citriodora*, inoculadas e não inoculadas com *Pisolithus tinctorius*, após 90 dias sob condições de viveiro.

Figura 8 - Vista geral dos fungos isolados de substrato para produção de mudas de *Eucalyptus citriodora* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* e não inoculadas, composto por perlita e casca de eucalipto em três concentrações, após 90 dias sob condições de viveiro. 1- *Fusarium* sp; 2- *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp; 3- *Trichoderma* spp.

4.5 - Antagonismo entre *P. tinctorius* e alguns fungos isolados do substrato de casca de eucalipto

4.5.1- Efeito de *P. tinctorius* sobre fungos isolados do substrato.

Nos testes de pareamento *in vitro* de *P. tinctorius* com algumas espécies mais frequentes isoladas do substrato, foi observado a formação de um halo de inibição para uma espécie de *Penicillium*, uma redução no crescimento de *Trichoderma* na presença de *P. tinctorius* com intensa esporulação do *Trichoderma* na região de contato entre as colônias, e uma redução no crescimento de *Fusarium* quando pareado com *P. tinctorius*, não tão acentuada como o efeito de *P. tinctorius* sobre *Trichoderma*. (Tabela 13, Figura 9-A).

Tabela 13 - Diâmetro médio (cm) das colônias de alguns fungos isolados do substrato constituído de casca de eucalipto, pareados ou não com *Pisolithus tinctorius* no meio MMN.

	com pareamento	sem pareamento
<i>Trichoderma</i>	3,63 b*	6,26 a
<i>Penicillium</i>	1,70 b	2,50 a
<i>Fusarium</i>	1,60 b	2,66 a
C.V. = 9,6%		

* Média de 5 repetições por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey).

Houve efeito antagônico de *P. tinctorius* sobre os fungos isolados do substrato, e destes sobre o *Pisolithus*, caracterizando um antagonismo mútuo para *Penicillium* e *Fusarium*, e não antagônico a *Trichoderma*. Entretanto, este antagonismo teve diferentes características para cada microrganismo testado. Em todos os casos o *Pisolithus* reduziu o diâmetro das colônias dos fungos confrontados, em diferentes intensidades, sendo este efeito mais característico no pareamento de *Pisolithus* contra *Fusarium* (Tabela 13, Figura 9-A).

O efeito de *P. tinctorius* sobre o *Penicillium*, além de ter reduzido significativamente o tamanho das colônias (Tabela 13), parece ter reduzido a esporulação do *Penicillium* no meio de cultura, em relação a testemunha crescendo sem o confronto com o *P. tinctorius*. (Figura 9-A).

Estes resultados explicam, pelo menos em parte, porque nos substratos contendo mudas inoculadas com *P. tinctorius* houve uma redução no número de colônias isoladas de *Penicillium* e de *Fusarium*, e um aumento nas de *Trichoderma* (Figuras 5; 6; e 7). Isto sugere que o efeito de *P. tinctorius* sobre os microrganismos presentes na rizosfera pode ir além da inibição no crescimento vegetativo, tendo efeito também na fase reprodutiva, através da inibição da produção de esporos, ou da lise destes durante a germinação. Kope & Fortin (1989) encontraram metabólitos com efeito antifúngico produzidos em meio líquido por *P. tinctorius* sobre *Fusarium solani*, *Cochliobolus sativus* e outros fitopatógenos. Entre os compostos purificados obtidos em filtrados de *P. tinctorius*, identificados através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), Ogilvie et al.(1989) encontraram dois compostos conhecidos pela

sua ação fungitóxica: o ácido poli-hidroximandélico e o ácido poli-hidroxibenzofórmico, aos quais foram atribuídas a inibição do crescimento de hifas e a lise em conídios e hifas de vários fitopatógenos testados *in vitro*.

Este tipo de pareamento, conforme discutido por Kope & Fortin (1989), favorece o fungo micorrízico, que estando a mais tempo no meio se adaptou e difundiu no meio seus metabólitos. Mesmo assim, houveram evidências de que o mecanismo de inibição no presente trabalho foi mais de ação química, através da difusão de substâncias no meio de cultivo, que através de micoparasitismo de uma espécie sobre a outra. Observações feitas durante a condução do experimento, como o escurecimento do meio próximo ao bordo das colônias de *P. tinctorius*, e a observação da região de contato entre as hifas em microscópio ótico, sugerem um mecanismo de inibição mais de natureza química que parasitária.

Figura 9 - A) Efeito do pareamento em meio MMN de *Pisolithus tinctorius* contra espécies de *Fusarium*, *Trichoderma* e *Penicillium*, isoladas do substrato de casca de eucalipto: 1.inibição no crescimento radial de *Fusarium*; 2.inibição no crescimento radial e esporulação na região de contato com *Trichoderma*; 3. halo de inibição sobre *Penicillium*. B) Efeito de filtrados de *Fusarium*, *Trichoderma* e *Penicillium*, incorporados ao meio MMN sólido a 50% V/V, sobre o crescimento micelial de *P.tinctorius*.

4.5.2 - Efeitos de filtrados dos fungos isolados do substrato sobre *P. tinctorius*

Houve efeito de dois filtrados obtidos dos fungos isolados do substrato de casca de eucalipto incorporadas ao meio de cultivo, sobre o *P. tinctorius*. Este efeito inibitório foi mais acentuado para o extrato de *Penicillium* nas duas concentrações testadas e para o extrato de *Fusarium* na maior concentração (Tabela 14).

Trabalhos realizados por diversos pesquisadores (Kope & Fortin, 1990; Tzantrizos *et al.*, 1991), mostram que substâncias extraídas por filtração de *P. tinctorius* lisam a parede de conídios e de micélio de espécies de *Fusarium* e outros fitopatógenos. Bueno (1994), trabalhando com substâncias extraídas por autoclavagem de *Trichoderma sp* isolada de substrato usado em viveiro, demonstrou efeito inibidor destas substâncias produzidas pelo *Trichoderma* sobre o crescimento micelial de *P. tinctorius*. No presente trabalho este efeito entre *P. tinctorius* e o isolado de *Trichoderma* confrontado não foi observado. É de se esperar que o número de espécies de *Trichoderma* e outros fungos saprofíticos e patogênicos presentes em um substrato orgânico seja bastante variável, a existência de isolados de *Trichoderma* compatíveis com *P. tinctorius* não deve ser encarada como resultado contraditório com os encontrados na literatura. Talvez este tipo de teste *in vitro*, como discutido por Kope & Fortin (1989), embora considere fatores como velocidade de crescimento diferentes no meio de cultura, corre o risco ainda de não avaliar o efeito de reações antibióticas, uma vez que são alterados o pH do meio e seu ambiente fisiológico, como por exemplo sua concentração osmótica. Verificando o efeito de *Trichoderma* e outros fungos de solo na formação de micorriza por *Laccaria bicolor in vitro*, Summerbell (1987) observou que

o fungo micorrízico inibiu o crescimento e esporulação de uma espécie de *Penicillium*, além das duas espécies de *Trichoderma* testadas terem sido fortes inibidoras do fungo micorrízico *in vitro*. Neste mesmo trabalho, posteriormente em condições de viveiro, foi observado que nos solos não fumigados, os isolados de *Trichoderma* tinham um efeito inibidor menor sobre a micorrização que nos solos fumigados.

Tabela 14 – Diâmetro médio (cm) das colônias de *Pisolithus tinctorius* crescendo em meio MMN sólido preparado com diferentes concentrações de extrato autoclavado de culturas de *Fusarium*, *Trichoderma* e *Penicillium*.

Diâmetro das colônias (cm)	
MMN completo	4,1 a
MMN + 50% H ₂ O	3,7 a
25% extrato <i>Fusarium</i>	3,6 a
50% extrato <i>Fusarium</i>	3,0 b
25% extrato <i>Trichoderma</i>	3,9 a
50% extrato <i>Trichoderma</i>	3,6 a
25% extrato <i>Penicillium</i>	2,5 b
50% extrato <i>Penicillium</i>	1,5 c
C.V. = 14,3%	

* Média de 5 repetições por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey).

4.6 - Desenvolvimento de ectomicorrizas por *P. tinctorius* inoculado *in vitro* em *E. citriodora*, após 7 meses em condições de campo.

A quantificação do desenvolvimento micorrízico em condições de campo feita a partir da análise do ergosterol presentes nas raízes, mostrou-se como uma técnica mais sensível que a observação visual da presença de manto fúngico externamente.

Os resultados obtidos com o método de extração de ergosterol a partir de amostras de raízes coletados após 7 meses em condições naturais no campo, mostram que nos tratamentos inoculados com *P. tinctorius* houve uma quantidade maior de ergosterol em relação aos tratamentos não inoculados (Tabela 16), independente da quantidade de matéria orgânica incorporada ao substrato na fase de viveiro. Embora na avaliação visual feita no ato da coleta das amostras de raízes, houvessem poucas raízes com formação de manto fúngico característico de *P. tinctorius* (Tabela 15), a detecção de uma quantidade de ergosterol bem maior nos tratamentos inoculados com *P. tinctorius*, indicam a presença de micélio intramatricial nas raízes nestes tratamentos, mostrando que os resultados da inoculação *in vitro*, embora não tenham sido detectados visualmente em algumas amostras na avaliação feita aos 7 meses no campo, permitiu a sobrevivência do fungo micorrízico internamente nas raízes. Este resultado pôde ser avaliado, pela alta sensibilidade do método de análise de ergosterol para detectar a presença fungos nas raízes. Vários autores, (Seitz *et al.*, 1979; Salmanowicz & Nylund, 1988; Johnson & McGill, 1990; Nylund & Wallander, 1990, Martin *Et al.*, 1990)

salientam em seus trabalhos a sensibilidade dessa técnica na detecção de pequenas infecções fúngicas em tecidos vegetais, alguns desses autores utilizando essa técnica inclusive para quantificar a biomassa fúngica.

Tabela 15 - Desenvolvimento micorrízico em plantas de *Eucalyptus citriodora* inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius* após 7 meses no campo, avaliado através da presença ou ausência de manto fúngico nas raízes amostradas*.

Árvores	% M.O.					
	0%	25%	50%	0%	25%	50%
	Plantas com inoculação			Plantas sem inoculação		
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	-
6	+	-	+	-	-	-
7	-	+	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
Total (%)	40	20	20	0	0	0

* (-) sem presença de manto. (+) com presença de manto

Comparando-se os resultados obtidos sobre os efeitos da matéria orgânica no desenvolvimento micorrízico, durante a fase de viveiro e após 7 meses no campo, pode-se concluir que na fase de viveiro, o substrato completo utilizado na produção de mudas inibiu a formação de manto fúngico, com isso, limitando a sua visualização e reduzindo a quantidade de manto e cordões miceliais observados de aproximadamente 80% no substrato mineral sem matéria orgânica, para aproximadamente 55% na maior dose de matéria orgânica nesta fase (Tabela 9), mas a quantidade de ergosterol obtida neste mesmo experimento aumentou praticamente na mesma proporção em todos os tratamentos inoculados, independente da quantidade de matéria orgânica, inicialmente presente no substrato (Tabela 10). Segundo Paulitz & Linderman (1991), a inoculação de fungos ectomicorrízicos induzem a mudanças drásticas nas raízes devida a produção de fitohormônios nos tecidos colonizados, e estes tecidos por sua vez, aumentam a exsudação de metabólitos influenciando o crescimento do fungo micorrízico e dos microrganismos da micorrizosfera. Nos demais experimentos conduzidos em viveiro, estes resultados foram semelhantes quando se utilizou composto de bagacilho de cana e de casca de eucalipto separadamente como fonte de matéria orgânica (Tabelas 9 e 10). O substrato orgânico que apresentou maior efeito inibitório no desenvolvimento micorrízico foi o composto de casca de pinus, reduzindo mais acentuadamente a quantidade visualmente observada de micorrizas (Tabela 9) e a quantidade de ergosterol presente no substrato (Tabela 10). Este aumento do ergosterol em função da adição de matéria orgânica no substrato, pode

ser explicado pelo aumento da população fúngica no substrato quando se incorpora matéria orgânica na sua formulação.

Os resultados obtidos após 7 meses no campo (Tabela 16) mostram que, embora menos que a inoculação de *P.tinctorius*, a matéria orgânica que também influenciou a quantidade de ergosterol durante a fase de viveiro, após algum tempo em condições de campo, entretanto, não teve efeito sobre o ergosterol presente nas raízes. Uma explicação provável para isto, é o fato deste efeito ser diluído em condições de campo. O volume de solo explorado pelas raízes no campo após alguns meses, em relação ao volume inicial do tubete, é muitas vezes maior, minimizando os efeitos desta matéria orgânica no aumento da população fúngica do solo. Além disso, em solos formados por areia quartzosa, é de se esperar uma pequena população fúngica nativa, levando a crer que o aumento acentuado do ergosterol nos tratamentos inoculados seja em função do fungo micorrízico inoculado, e não de fungos presentes na rizosfera e/ou de micorrizas nativas. Estes resultados indicam que o aumento do ergosterol nas raízes em condições adversas no campo, não variou em função da adição de matéria orgânica no substrato de viveiro. Nas mudas sob condições de campo, transplantadas em região de areia quartzosa com relativa acidêz e nutricionalmente pobre (Tabela 2), o fungo micorrízico inoculado *in vitro* deve ter-se mantido pelo menos internamente nas raízes, sendo detectados através da análise de ergosterol nas amostras de raízes (Tabela 15¹⁶) em quantidades até 9 vezes maior que nos tratamentos sem inoculação. Linderman (1988) e Paulitz & Linderman (1991), consideram efeitos diretos e indiretos nas

interações entre micorrizas e microrganismos do solo. Com uma quantidade tão baixa de matéria orgânica em condições de campo (Tabela 1) é de se esperar que o ergosterol encontrado nas raízes seja efeito direto da inoculação ou indireto desta sobre os fungos presentes na micorrizosfera.

Tabela 16 - Quantidade de ergosterol* ($\mu\text{g} / \text{g}$ de raízes) obtidas em mudas de *Eucalyptus citriodora* inoculadas in vitro com *Pisolithus tinctorius* e não inoculadas, cultivadas em viveiro durante 90 dias em um substrato composto por casca de eucalipto, bagacilho de cana e casca de pinus compostados em 3 níveis, 7 meses após o transplante em condições de campo.

Quantidade de mat. orgânica	inoculado com <i>P.tinctorius</i>	não inoculado com <i>P.tinctorius</i>
0 %	823,3 b*	118,1 c
25 %	1008,5 a	135,3 c
50 %	1049,4 a	155,4 c
Média	960,4	136,3
C.V.=10,4%		

* Média de três repetições por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si a 5% (Tukey).

Os valores encontrados para ergosterol nas amostras de raízes no campo nos tratamentos inoculados, embora não quantifiquem diretamente biomassa fúngica, estão dentro dos níveis obtidos por Johnson & McGill (1990) e por Nylund & Wallander (1992), Trabalhando com *P. tinctorius* e *Laccaria laccata* respectivamente.

A medição do crescimento em altura das árvores no campo, foi bastante prejudicada em razão de um ataque severo de saúvas no segundo mês após o transplante. Alguns tratamentos sofreram este dano com maior severidade, fato este, que comprometeu a validade dos dados referentes a altura. Entretanto, nenhuma árvore foi perdida em função desta praga e as árvores rebrotaram. O problema com as saúvas foi controlado em tempo hábil, mas causaram um relativo atraso no crescimento em altura devido ao corte de folhas, atraso este que até o momento da avaliação, aos 7 meses, havia deixado visíveis sinais de desuniformidade entre as plantas, comprometendo as conclusões sobre estes resultados. Os resultados do crescimento das árvores, sujeito as considerações acima descritas, são apresentados na Tabela 17. Resultados futuros deste experimento permitirão tirar conclusões mais consistentes sobre os ganhos em crescimento, com a inoculação de *P. tinctorius* em *E. citriodora*.

Tabela 17 - Altura das plantas* (metros) após 7 meses em condições de campo em mudas de *E. citriodora* produzidas com e sem inoculação de *P. tinctorius*.

Sem <i>P. tinctorius</i>	Com <i>P. tinctorius</i>	
1,51 a	1,78 b	c.v. = 42,3 %

* Média de 30 repetições por tratamento

** Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% (Tukey).

4.7 - Discussão geral

De um modo geral, as matérias orgânicas utilizadas no presente trabalho reduziram significativamente o crescimento de *P. tinctorius in vitro* e tiveram um efeito menos acentuado na redução da associação no viveiro e no campo. Por outro lado, a adição de matéria orgânica no substrato para produção de mudas melhorou o crescimento destas e aumentou a população fúngica presente no mesmo. A inoculação de *P. tinctorius*, por sua vez, teve um efeito seletivo sobre esta população fúngica e sobre o desenvolvimento das mudas.

A explicação para a inibição do crescimento do fungo *in vitro* para as fontes de matérias orgânicas testadas neste trabalho, não está baseada em fatores nutricionais, como desbalanços ou a presença de elementos inorgânicos em níveis

tóxicos, mas principalmente na liberação de produtos do metabolismo, como fenóis, taninos e outros compostos com ação antifúngica. Marais & Kotze (1976), investigando a efetividade de ectomicorrizas na proteção de *Pinus patula* a *Phytophthora cinnamomi* não encontraram antagonismo *in vitro* entre os fungos micorrízicos testados e *P. cinnamomi*, mas significativa proteção foi obtida em condições de viveiro. O mecanismo envolvido neste caso foi atribuído a produção de substâncias antibióticas pela planta e pelo fungo, conjuntamente a uma barreira física pelo fungo micorrízico, efeito este não considerado nos testes com filtrados *in vitro*. Embora os testes feitos *in vitro* avaliam apenas o antagonismo direto que possa existir entre os microrganismos em um substrato orgânico, no presente trabalho, os testes de antagonismo *in vitro*, feitos entre alguns fungos isolados do substrato de casca de eucalipto e um isolado de *P. tinctorius*, confirmaram que as interações entre fungos fitopatogênicos, saprofíticos e simbiontes são comuns. Em condições de viveiro, a matéria orgânica não interage apenas com o fungo micorrízico, mas com toda a microbiota e a planta hospedeira.

Em condições naturais de viveiro e campo, é possível estudar outras interações entre a planta e o fungo micorrízico. Segundo Linderman (1988), ocorrem na micorrizosfera interações metabólicas entre o fungo micorrízico e estruturas vegetativas e esporos de outros fungos presentes no solo. Gilbert & Linderman (1971) mostraram, trabalhando com patógenos de raízes, que alguns microrganismos da rizosfera eram favorecidos por exsudatos do patógeno, enquanto outros não eram. Segundo Linderman (1988), a microflora existente na micorrizosfera pode afetar

profundamente as funções do fungo micorrízico como absorção de nutrientes e água. Além destes efeitos diretos, efeitos indiretos como a alteração dos exsudatos produzidos pela planta micorrizada e outras reações de antagonismo entre fungos no solo podem ocorrer. Estas interações talvez expliquem porque os efeitos da matéria orgânica sobre a associação em condições de viveiro e campo foram pouco inibitórios.

Os testes de antagonismo *in vitro* feitos entre alguns fungos isolados do substrato de casca de eucalipto e um isolado de *P.tinctorius*, evidenciaram que as interações entre fungos patogênicos, saprofíticos e simbioses são comuns. Vários autores (Perrin *et al.*, 1983; Chakravarty & Unestam, 1987; Malajczuk, 1988; Schild *et al.*, 1988; Duchesne & Peterson, 1989; Chakravarty & Hwang, 1991; Rasanayagam & Jeffries, 1992) têm demonstrado a existência destas interações entre patógeno-simbionte, entretanto, devemos considerar o fato de termos trabalhado com um isolado apenas de cada gênero, representando uma condição particular em um substrato, não podendo tais resultados serem extrapolados para quaisquer substratos orgânicos.

Em condições de viveiro, a matéria orgânica não interage apenas com o fungo micorrízico, mas com toda a microbiota e a planta hospedeira. Linderman (1988) ressalta que ocorrem na micorrizosfera interações metabólicas entre o fungo micorrízico e as estruturas vegetativas, e os esporos de outros fungos presentes no solo. Gilbert & Linderman (1971) mostraram, trabalhando com patógenos de raízes, que alguns microrganismos da rizosfera foram favorecidos e outros não por exsudatos do patógeno. Segundo Linderman (1988), a microbiota existente na micorrizosfera

pode afetar profundamente as funções do fungo micorrízico como absorção de nutrientes e água. Além destes efeitos diretos, efeitos indiretos como a alteração dos exsudatos produzidos pela planta micorizada e outras reações de antagonismo entre fungos no solo podem ocorrer. Estas interações talvez expliquem porque os efeitos da matéria orgânica sobre a associação em condições de viveiro e de campo foram pouco inibidoras. Embora alguns trabalhos mostrem efeito inibitório da matéria orgânica sobre a associação micorrízica (Bettiol, 1984; Galli, 1991), este efeito poderá variar em função das condições ambientes e do tempo de compostagem, que determinam o grau de humificação de um substrato orgânico (Flaig, 1972; Schnitzer, 1982), não podendo portanto serem generalizadas e tomados como regra alguns resultados obtidos em condições particulares. O baixo efeito inibitório das matérias orgânicas testadas nos experimentos, pode ter ocorrido devido ao fato destes materiais terem atingido um grau de compostagem em que as populações fúngicas atingiram um equilíbrio biológico, diferentemente do que ocorre com substratos autoclavados rapidamente recolonizados por determinados fungos, ou por fatores do hospedeiro ou do simbiote que não foram considerados.

Ficou claro no presente trabalho, que o número de propágulos de *Trichoderma*, *Penicillium* e *Fusarium* aumentam com a adição de matéria orgânica, mas por outro lado o fungo micorrízico também teve um efeito sobre esta população, aumentando *Trichoderma* e diminuindo *Penicillium* e *Fusarium*. Alguns destes mecanismos que determinam a maior quantidade de um ou de outro fungo no substrato, podem ter ocorrido nos testes de antagonismo *in vitro*, através de

substâncias inibidoras difundidas no meio de cultivo pelo *P. tinctorius*, ou do efeito de substâncias extraídas por autoclavagem dos fungos isolados do substrato sobre *P. tinctorius*.

5 - CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível concluir que:

- A combinação fungo-hospedeiro com maior infecção micorrízica *in vitro* e no viveiro foi a espécie *E. citriodora* com o isolado 1604 de *P. tinctorius*.
- A matéria orgânica inibiu o crescimento micelial de *P. tinctorius in vitro* e no desenvolvimento micorrízico nas mudas na fase de viveiro. Houveram evidências que as substâncias que causaram a inibição são termoestáveis e pouco solúveis em água, concentrando-se nas frações ácidos fúlvicos e ácidos húmicos.
- A adição de matéria orgânica aumentou a população fúngica total no substrato. A inoculação com *P. tinctorius* por outro lado, influenciou de maneira seletiva esta população, aumentando a quantidade de *Trichoderma* e diminuindo *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* no substrato.

- A adição de matéria orgânica, independente do seu efeito sobre a inoculação, melhorou o desenvolvimento das mudas aumentando a altura e o peso de matéria seca da parte aérea.
- A inoculação de plântulas de eucalipto com *P. tinctorius*, *in vitro*, pode proporcionar adequado desenvolvimento micorrízico em condições de viveiro e no campo, mesmo com a utilização de matéria orgânica para formação das mudas, desde que haja um isolado fúngico capaz de manter uma alta infecção na fase inicial *in vitro*.
- Houve antagonismo mútuo entre o *P. tinctorius* e *Penicillium* e entre *P. tinctorius* e *Fusarium* isolados do substrato, mas não houve este efeito entre *P. tinctorius* e o isolado de *Trichoderma* testado. O mecanismo envolvido neste antagonismo parece ter sido de natureza química, uma vez que não se observou parasitismo entre as hifas.

6 - BIBLIOGRAFIA

ALLISON, F. E. **Soil organic matter and its role in crop production.**
London; Elservier, 1973 cap.2, 637p.

AUER, C. G. & BETTIOL, W. Efeito da serrapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura. **IPEF - Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, 32 (17) : 49 - 52 , 1985.

BACCHI, L.M.A. & KRUGNER, T.L. Desenvolvimento ectomicorrízico em mudas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* em um viveiro comercial. **IPEF - Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais** . 40: 21-25, 1988.

BETTIOL, W. Influência de algumas fontes de matéria orgânica na formação de ectomicorizas em mudas de *Pinus caribea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari pelos fungos *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch e *Telephora terrestris* Ehr.ex Fr. Piracicaba, 1984. 79 p. ESALQ - Tese Mestrado.

BETTIOL, W. & KRUGNER, T. L. Influência de fontes de matéria orgânica na formação de ectomicorizas em mudas de *Pinus* por *Pisolithus tinctorius* e *Telephora terrestris*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 21:6, 619 - 624. 1986.

BOWEN, G.D. & THEODOROU, C. Growth of ectomycorrhizal fungi around seeds and roots. *In*: G.C.MARKS & T.T. KOZLOWSKI ,eds. **Ectomycorrhizae**, Academic Press, London, 1973. p.107-150.

- BOWEN, G.D. & THEODOROU, C. Interactions between bacteria and mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**. 11, p.119-126, 1979.
- BUENO, J.T. Efeito inibidor de microrganismos do solo no desenvolvimento de ectomicorrizas em mudas de *Eucalyptus urophylla* inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius*. Piracicaba, 1994. 74p. ESALQ-USP. Tese Doutorado.
- BURGESS, T.; MALAJCZUK, N. & GROVE, T.S. The ability of 16 ectomicorrhizal fungi to increase the growth and phosphorus uptake of *Eucalyptus globulus* and *E. diversicolor*. **Plant and Soil**. 153: 155-164, 1993.
- BURGESS, T.; DELL, B. & MALAJCZUK, N. Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden. **New Phytologist** 127 : 731 - 739, 1994.
- CHAKRAVARTY, P. & UNESTAM, T. Differential influence of ectomycorrhizae on plant growth and disease resistance in *Pinus sylvestris* seedlings. **Journal of Phytopathology**. 120:2, 104-20, 1987.
- CHAKRAVARTY, P.; PETERSON, R. L. & ELLIS, B.E. Integrated control of *Fusarium* damping-off in red pine seedlings with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and fungicides. **Canadian Journal of Forest Research**. 20(9):1283-88, 1990.
- CHAKRAVARTY, P & HWANG, S. F. - Effect of an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*, on *Fusarium* damping-off in *Pinus banksiana* seedlings. **European Journal of Forest Pathology**. 21(2): 97-106, 1991.
- CHAN, W.K. & GRIFFITS, D.A. - The induction of mycorrhiza in *Eucalyptus myrocorys* and *E. torelliana* grown in Hong Kong. **Forest Ecology and Management** 43: 15-24, 1991.

- CUDLIN, P.; MEJSTRIK, V. & SKOUPY, J. Effect of pesticides on ectomycorrhizae of *Pinus sylvestris* seedlings. **Plant and Soil**. 71 (1/3): 353-361, 1983.
- DAVID, A. ; FAYE, M. & RANCILLAC, M. Influence of auxin and mycorrhizal fungi on the *in vitro* formation and growth of *Pinus pinaster* roots. **Plant and Soil**, 71 : 501-505, 1983.
- DUCHESNE, L. C. & PETERSON, R. L. The future of ectomycorrhizal fungi as biological control agents. **Phytoprotection**. 70(1): 51-57. Ontario, Canada, 1989.
- FLAIG, W. An introductory review on Humic substances : aspects of research on their genesis, their physical and chemical properties, and their effect on organisms. In: **Humic Substances** - Their structure and function in the biosphere - Proceedings of an international meeting held at Nieuwersluis, Netherlands, p.19-43, May, 1972.
- GALLI, M. A. Efeito da matéria orgânica e do Fósforo no desenvolvimento de ectomicorizas em "plantlets" de *Eucalyptus sp.* inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius*. Piracicaba 1991. 72p. ESALQ - USP. Tese Mestrado.
- GARBAYE, J.; DELWAULLE, J.C. & DIANGANA, D. Growth response of eucalypts in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. **Forest Ecology and Management**. 24: 151-157, 1988.
- GILBERT, R.G. & LINDERMAN, R. G. Increased activity of soil microorganisms near sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. **Canadian Journal of Microbiology**. 17: 557-562, 1971.
- GRENVILLE, D.J. ; PETERSON, R.L.; & ASHFORD, A.E. - Syntesis in growth pouches of mycorrhizae between *Eucalyptus pilularis* and several strains of *Pisolithus tinctorius*. **Australian Journal of Botany**, 34 : 95 - 102, 1986.

- HEIRINCH, P.A.; MULLIGAN, D.R. & PATRICK, J.W. The effect of ectomycorrhizae on the Phosphorus and dry weight acquisition on *Eucalyptus* seedlings. **Plant and Soil**, 109: 147-149, 1988.
- JOHNSON, L. F. & CURL, E. A. **Methods for research on the ecology of soil borne plant pathogens**. Minneapolis: Burgess, 1972. 247p.
- JOHNSON, B. N & MCGILL, W. B. Comparison of ergosterol and chitin as quantitative estimates of mycorrhizal infection and *Pinus contorta* seedling response to inoculation. **Canadian Journal Forest Research**, 20 : 1125 - 1131, 1990.
- KOPE, H.H. & FORTIN, J.A. - Inhibition of phytopathogenic fungi *in vitro* by cell free culture media of ectomycorrhizal fungi. **The New Phytologist**. 113: 57-63, 1989.
- KOPE, H. H. & FORTIN, J. A. Antifungal activity in filtrates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Botany**. 68 (6): 1254-259, 1990.
- LEI, J.; LAPEYRIE, F.; MALAJCZUK, N. & DEXHEIMER, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. **New Phytologist**. 116 : 115 -122, 1990.
- LINDERMAN, R. G. Mycorrhizal interactions with the Rhizosphere Microflora: The Mycorrhizosphere effect. **Phytopathology**. 78 (3) 366 - 371, 1988.
- MARAIS, L. J. & KOTZE, J. M. Ectomycorrhizae of *Pinus patula* as biological deterrents to *Phytophthora cinnamomi*. **South African Forestry Journal**. Dep. Microbiol. Pl.Path., Univ. Pretoria, S.Africa. 99 : 35-39, 1976.

- McAFEE, B. J. & FORTIN, J. A. Comparative effects of the microflora on ectomycorrhizal inoculation of conifer seedlings. **New Phytologist**, Cambridge, 108:443-49, 1988.
- MALAJCZUK, N.; McCOMB, A. J. & LONERGAN, J. F. Phosphorus up take and growth of mycorrhizal and uninfected seedlings of *Eucalyptus calophylla*. **Australian Journal of Botany**, 23: 231- 238, 1975.
- MALAJCZUK, N. & McCOMB, A. J. The microflora of unsuberized roots of *Eucalyptus calophylla* and *E. marginata* seedlings grow in soil suppressive and conducive to *Phytophthora cinnamomi*. I- Rhizosphere bacteria, actinomycetes and fungi. **Australian Journal of Botany**, 27: 3235-254, 1979.
- MALAJCZUK, N. Interaction between *Phytophthora cinnamomi* zoospores and micro-organisms on non-mycorrhizal and ectomycorrhizal roots of *Eucalyptus marginata*. **Transactions of the British Mycological Society**, 90:3, 375-382, 1988
- MALAJCZUK, N. ; LAPEYRIE, F.; & GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on the roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. **New Phytologist** 114 : 627 : 631. 1990.
- MARTIN, F.; C. DELARUELLE; & J-L. HILBERT. An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. **Mycological Research** 94(8):1059-1064, 1990.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections: I- Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria . **Phytopathology** 59, 153-163, 1969.

- MARX, D.H. & BYRAN, W.C. Pure culture synthesis of ectomycorrhizae by *Telephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on different conifer hosts. **Canadian Journal of botany**, 48: 639-643, 1970.
- MARX, D. H. & BYRAN, W. C. The significance of ectomycorrhizae trees. **Australian Journal of Botany**, 22: 107-117, 1974.
- MATHUR, S.P. & PAUL, E.A. A microbiological approach to the problem of soil humic acid structure. **Nature**. London, 212: 646-647, 1966.
- MELO, W.J. **Matéria orgânica do solo**. Apostila do Curso de Pós-graduação Depto. de Tecnologia . UNESP-Jaboticabal/SP. 65p, 1994.
- NASCIMENTO, V.M.; NEPTUNE, A. M. L.; & FERNANDES, F. M. Efeitos da calagem de algumas características de fertilidade de um latossolo sob vegetação de cerrado. **Científica**. 11. 177 - 181. 1983.
- NEELAKATAN, S.; MISHRA, M.M.; TEWARI, H.R., & UYAS, S.R. Characterization and microbial utilization of humic acid in hissar soil. **Agrochimica**. Hissar, 14: 341-344. 1970.
- NYLUND, J-E. & WALLANDER, H. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. **Methods in microbiology**. 24 : 77 - 88 . 1992.
- OLGIVIE, K.K.; TSANTRIZOS, Y.S.; KOPE, H.H. & FORTIN, J.A. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. **In: Abstracts: 72nd Canadian Chemical Conference and exhibition**, Victoria, B.C. June 4 - 8. 1989. p.161.

- OLIVEIRA, V. L. Interactions entre les micro-organismes du sol et l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne chez le hêtre (*Fagus silvatica*) avec *hebeloma crustuliniforme* et *Paxillus involutus*. L'université de Nancy I, France, 1988. Tese de Doutoramento.
- PAULITZ, T.C. & LINDERMAN, R. G. Mycorrhizal interactions with soil organisms. *In*: ARORA, D.K.; RAI, B.; MUKERJI, K.G.; & KNUDSEN, G.R. eds. **Handbook of applied mycology**. New York, Narcel Dekker Inc., 1991. v.1, p.77-129.
- PERRIN, R.; GARBAYE, J. & ATKINSON, D. Influence of ectomycorrhizae on infectivity of *Pythium* infested soils and substrates. **Plant and Soil**, 71, 345-351, 1983.
- POISSONNIER, M. - Mycorrhization 'in vitro' de clones d'eucalyptus - note de laboratoire. **Annales de Recherches Sylvicoles - AFOCEL** - Association Forêt-Cellulose. Paris. 9 : 81 - 93. 1986.
- POISSONNIER, M. Étude expérimentale de la mycorrhization 'in vitro' de clones d'eucalyptus. **Annales de Reserches Sylvicoles - AFOCEL** - Association Forêt-Cellulose. Paris. 13 : 59 - 89, 1990.
- RASANAYAGAM, S. & JEFFRIES, P. Production of acid is responsible for antibiosis by some ectomycorrhizal fungi. **Mycological Research**. 96:11, 971-976, 1992.
- SALMANOWICZ, B. & NYLUND, E. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhiza infection in scots pine. **European Journal Forest Pathology**, 18 : 291 - 298, 1988.
- SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**. 3: 231-233 . 1975

- SCHILD, D. E.; KENNEDY, A. & STUART, M. R. Isolation of symbiont and associated fungi from ectomycorrhizas of *Sitka spruce*. **European Journal of Forest Pathology**, 18: 1, 51-61, 1988.
- SCHNITZER, M. Organic matter characterization. *In: Methods of soil analysis*. Madison, Wisconsin. American Society of Agronomy. Part II, 1982, 581 - 594.
- SEITZ, L.M.; H.E. MOHR; R. BURROUGHS; & D.B. SAUER. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chemistry**, 54(6): 1207 - 1217, 1977.
- SEITZ, L.M.; D.B. SAUER; R. BURROUGHS; H. E. MOHR; & J. D. HUBBARD. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, 69: 1202 - 1203, 1979.
- SLANKIS, V. Soil factors influencing formation of mycorrhizae. **Annual Review of Phytopathology**, 12 : 437-457, 1974
- SUH, H.W.; CRAWFORD, D.L.; KORUS, R.A. & SHETTY, K. Production of metabolites by the ectomycorrhizal fungal *Pisolithus tinctorius* strain SMF. **Journal of industrial microbiology**, 8:1, 29-36, 1991.
- SUMMERBEL, 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: 437-48, 1987.
- TAN, K.H. & NOPAMORNBODI, V. Fulvic acid and the growth of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Soil Biochemistry**, 11: 651 - 653, 1979.
- TAN, K. H. High and low molecular weight fractions of humic and fulvic acids. **Plant and Soil**, 48 : 89-101, 1977.

TONKIN, C.M.; MALAJCZUK, N. & McCOMB, J.A. - Ectomycorrhizal formation by micropropagated clones of *Eucalyptus marginata* inoculated with isolates of *Pisolithus tinctorius*. **New Phytologist**, 111: 2, 209 - 214, 1989.

TSANTRIZOS, Y.S.; KOPE, H.H.; FORTIN, J.A. & Ogilvie, K.K. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. **Phytochemistry**, 30:4, 1113-1118, 1991.

VARADACHARI, C. & GHOSH, K. On humus formation. **Plant and Soil**, 77: 305 - 313, 1984

VIDA, J.B. - Obtenção de ectomicorrizas em mudas de *Eucalyptus* a partir de "plantlets" e plântulas inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius*. Piracicaba 1989. ESALQ - USP. Tese Doutorado 140p.

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

VIEIRA, R.F. & PERES, J.R.R. Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para *Eucalyptus grandis*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 12: 3, 231 -235, 1988.

VOLKOFF, B. & ANDRADE, M.J. - Caracterização da matéria orgânica de alguns solos ferralíticos do Estado da Bahia: aplicação de um método de fracionamento das substâncias húmicas. **In: Anais XV Congresso de Ciência do solo**, Campinas. p.119-26, 1975.

YOKOMIZO, N. K. S. & KRUGNER, T.L. - Avaliação comparativa e efeito de isolados de *Pisolithus tinctorius* em mudas de espécies de *Pinus* e *Eucalyptus*. **Silvicultura em São Paulo**, 22:17-23, 1985.

Apêndice 1 - Composição do meio MMN (Modified Melin-Norkran)

	g / l
Extrato de malte	3,0
Dextrose	10,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25
KH ₂ PO ₄	0,50
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,15
CaCl ₂	0,05
FeEDTA	0,27
NaCl	0,025
Tiamina	0,0001

Apêndice 2 - Composição da solução de Sarruge (1975).

	mg / l
KH ₂ PO ₄	136,0
KNO ₃	505,5
Ca(NO ₃) . 4 H ₂ O.....	1181,0
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	493,0
Fe EDTA	24,0
H ₃ BO ₃	2,8
Mn Cl ₂ . 4H ₂ O	1,8
ZnCl ₂	0,1
CuCl ₂ . 2 H ₂ O	0,04
H ₂ MoO ₄ . H ₂ O	0,02