**INTERAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES,
AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO E *Phytophthora*
parasítica EM LIMOEIRO CRAVO (*Citrus limonia*)**

DEISE RENATA GONZALEZ AGNANI

Biólogo

Orientadora: Prof^ª Dra. **ADRIANA PARADA DIAS DA SILVEIRA**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia, Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola.

Piracicaba
Estado de São Paulo- Brasil
Fevereiro - 2002

ERRATA

AGNANI, DEISE RENATA GONZALEZ. Interação de fungos micorrízicos arbusculares, agentes de controle biológico e *Phytophthora parasitica* em limoeiro cravo (*Citrus limonia*).

p.	ítem	linha	onde se lê	leia-se
vii	resumo	vigésima nona	...1°Tri/GE, 1°GI/Tri, GI+Tri e 1°GI/Bac...	...inoculação anterior de <i>Trichoderma</i> seguida de <i>G. etunicatum</i> , inoculação anterior de <i>G. intraradices</i> seguida de <i>Trichoderma</i> , inoculação concomitante de <i>G. intraradices</i> e <i>Trichoderma</i> , inoculação anterior de <i>G. intraradices</i> seguida de <i>Bacillus</i> ...
19	3.1.1	décima primeira	Discos de meio de cultura...	O fungo patógeno foi obtido do meio de cultura de cenoura com 7 dias de crescimento a 28°C no escuro. Discos deste meio de cultura...
20	3.1.2	quinta e décima terceira	...placa velha...	...cultura...
22	3.2.1	décima sexta	nota visual da severidade da doença...	nota visual da severidade da doença- 0: sem podridão radicular; 1: até 5%; 2: 5-10%; 3: 10-25%; 4: 25-50% e 5: 50% de podridão radicular...
24	3.2.2	nona	...temperatura constantes.	... temperatura de 28°C no escuro.
34	4.2	quarta e sexta	...45A e I4... ...60B e 73...	... 60B e 73... ...45A e I4...
36	4.2	quarta, quinta e sexta	Os isolados bacterianos 46, 47B, 47D, 80, 44A, 65A, A3 e A6...	Somente o isolado bacteriano A6 não é eficiente no controle de <i>P. parasitica</i> .
60	5	terceira e quarta	Os isolados bacterianos 52B, I5 e 73...	Todos os isolados bacterianos foram antagonicos no teste <i>in vivo</i> , exceto o isolado A6.
60	5	décima segunda	...1°Tri/GE, 1°GI/Tri, GI+Tri e 1° GI/Bac...	...inoculação anterior de <i>Trichoderma</i> seguida de <i>G. etunicatum</i> , inoculação anterior de <i>G. intraradices</i> seguida de <i>Trichoderma</i> , inoculação concomitante de <i>G. intraradices</i> e <i>Trichoderma</i> e inoculação anterior de <i>G. intraradices</i> seguida de <i>Bacillus</i> ...

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Agnani, Deise Renata Gonzalez

Interação de fungos micorrízicos arbusculares, agentes de controle biológico e *Phytophthora parasitica* em limoeiro cravo (*Citrus limonia*) / Piracicaba, 2002.
71 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Controle biológico (Fitossanidade) 2. Fungos micorrízicos 3. Limão 4. Porta-
enxertos 5. Rizosfera I. Título

CDD 634.334

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

AGRADECIMENTOS

À Dra. Adriana Parada Dias da Silveira pela orientação, confiança, incentivo e oportunidade.

Ao Centro de Solos e Recursos Agroambientais do Instituto Agronômico (IAC), pelo espaço cedido para a realização dos trabalhos.

À pesquisadora Sueli dos Santos Freitas da Seção de Microbiologia do Solo do IAC pelo incentivo e grande colaboração.

À pesquisadora Maria Luiza Colognesi de Oliveira Lombardi, às técnicas Rosana Gierts Gonçalves e Maria Tereza Bueno Mangussi e à funcionária Maria Leonilde Machado de Souza pela colaboração e ajuda prestada.

Às amigas da Seção de Microbiologia do Solo do IAC, Maria Inês Bernardi da Cunha, Mirela Francabandiera, Márcia Cristina de Andrade, Valéria Marino Rodrigues, Vanessa Polon Donzeli, Carolina Pioto, Soraia França, Adriana Nanô Sotero, Sara Adrian, Karina Cenciani, pela ajuda e ótimos momentos.

Ao pesquisador Carlos Ivan Aguilar Vildodo, do Centro de Citricultura do Instituto Agronômico pelas muitas ajudas prestadas.

Ao Dr. Itamar Soares de Melo da Embrapa, Meio Ambiente pelo auxílio no trabalho realizado.

À minha mãe, Ana M. B. Gonzalez pelo apoio e paciência. À minha irmã Daniele, ao meu pai Jesus e ao meu namorado Luciano pelo apoio e amizade.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

À ESALQ pela oportunidade da realização do Curso de Microbiologia Agrícola.

À Deus e à todos que colaboraram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 <i>P. parasitica</i> como agente causal de doença em plantas cítricas.....	5
2.2 Controle biológico de <i>Phytophthora</i>	8
2.3 Interação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e microrganismos do solo.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Testes de antagonismo de isolados de <i>Pseudomonas</i> sp a <i>Phytophthora parasitica</i>	19
3.1.1 Testes em meios de cultura.....	19
3.1.2 Teste com sementes de trigo.....	20
3.1.3 Teste de antagonismo <i>in vivo</i>	21
3.2 Experimentos em casa de vegetação.....	22
3.2.1 Experimento I- Interação de FMAs e agentes de controle biológico, em substrato inerte e seu efeito no controle de <i>Phytophthora parasitica</i>	22
3.2.2 Experimento II- Interação de FMAs e agentes de controle biológico e seu efeito no controle de <i>P. parasitica</i>	23
3.2.3 Experimento III- Efeito do substrato na interação de FMA e <i>Trichoderma</i> no controle de <i>P. parasitica</i>	25
3.3 Análise estatística.....	26

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Seleção <i>in vitro</i> de bactérias antagônicas a <i>Phytophthora parasitica</i>	27
4.2 Seleção <i>in vivo</i> de bactérias antagônicas a <i>P. parasitica</i>	32
4.3 Interação de FMA e agentes de controle biológico, em substrato inerte e seu efeito no controle de <i>P. parasitica</i>	37
4.4 Interação de FMAs e agentes de controle biológico e seu efeito no controle de <i>P. parasitica</i>	44
4.5 Efeito do substrato na interação de <i>Glomus intraradices</i> e <i>Trichoderma</i> e no controle de <i>P. parasitica</i>	53
5 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

INTERAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES, AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO E *Phytophthora parasitica* EM LIMOEIRO CRAVO (*Citrus limonia*).

Autora: Deise Renata Gonzalez Agnani

Orientadora: Dra. Adriana Parada Dias da Silveira

RESUMO

Estudos das interações de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e outros microrganismos da rizosfera têm documentado o efeito do FMA nas populações destes microrganismos e vice-versa. Espécies do gênero *Trichoderma* são usadas no controle biológico de patógenos de raiz. Este fungo produz uma série de enzimas extracelulares que degradam a parede de células fúngicas, sendo este um importante fator de biocontrole. Bactérias promotoras do crescimento de plantas, como algumas *Pseudomonas* do grupo fluorescente, também podem atuar no biocontrole de patógenos de raiz, produzindo substâncias antagônicas ou sideróforos. Além disso, é conhecida a importância da matéria orgânica como fator de melhoramento do solo, suprimindo patógenos do solo e da rizosfera. Uma das principais doenças de citros é a podridão de raiz causada por *Phytophthora parasitica*, que ocorre na sementeira. Assim, os objetivos foram estudar as interações que ocorrem na rizosfera e na planta hospedeira quando da presença concomitante de *P. parasitica*, FMAs e agentes de controle biológico, e, avaliar o efeito de diferentes substratos em tais interações microbianas, utilizando-se o porta-enxerto limoeiro Cravo (*Citrus limonia*). Com o objetivo de selecionar

bactérias eficientes no controle do fungo causador de doença de raiz de citros, *P. parasitica*, foram realizados 3 experimentos *in vitro* (meio B de King, meio cenoura e sementes de trigo) e um *in vivo*, nos quais foram utilizados 69 isolados de *Pseudomonas* spp. e um isolado de *P. parasitica*. Outro experimento teve finalidade de observar a interação na planta em substrato inerte, sendo os tratamentos: com e sem FMA (*Glomus intraradices* com pré-colonização- GI pré ou *G. intraradices* sem a pré-colonização- GI), com e sem os agentes de controle biológico (*T. harzianum* e *B. subtilis*) e com e sem o patógeno (*P. parasitica*). Um segundo experimento de interação em esquema fatorial 3 x 3 x 2 constou de 2 agentes de controle biológico (*T. harzianum* e *B. subtilis*) e um controle (sem agente) X 2 FMAs (*G. intraradices* e *G. etunicatum*) e uma testemunha (sem FMA) X com e sem *P. parasitica* com inoculação anterior, posterior e concomitante do FMA e dos agentes de controle biológico. Um último experimento foi montado como fatorial 2 x 2 x 2 x 3: com e sem *T. harzianum* X com e sem *G. intraradices* X com e sem *P. parasitica* X 3 substratos (adição de 2 tipos de matéria orgânica- esterco e plantmax e sem adição de matéria orgânica). Para o experimento *in vitro*, os isolados bacterianos A5, 52B, I5, I6, I7 E 73 foram antagônicos ao patógeno nos três experimentos realizados. A maioria dos isolados bacterianos, 78%, mostrou um certo controle do patógeno *in vivo*, já que a massa da matéria fresca das raízes não foi afetada pela presença de *P. parasitica*. No experimento empregando substrato inerte (areia) houve tendência de controle da *Phytophthora* por todos os tratamentos realizados. A colonização radicular nas plantas sem patógeno foi significativamente maior quando realizada a inoculação prévia do FMA (GI pré). *Trichoderma* diminuiu significativamente a colonização do FMA, quando inoculado previamente. No segundo experimento de interação, o crescimento da planta foi favorecido pela inoculação do FMA e pelos agentes de controle biológico inoculados anterior ou concomitante ao FMA, observando-se que estes antagonistas não afetaram a colonização radicular. Houve tendência de controle da doença nos tratamentos 1º Tri/GE, 1º GI/Tri, GI+Tri, 1º GI/Bac e somente *Trichoderma* e *Bacillus*. No último experimento realizado o crescimento das plantas colonizadas por *G. intraradices* e GI+ Tri, tanto na ausência como na

presença de *Phytophthora*, foi significativamente maior, nos três substratos empregados. As plantas micorrizadas, tanto na presença quanto na ausência de *Trichoderma*, controlaram *P. parasítica*.

INTERACTIONS OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI, BIOLOGICAL CONTROL AND *Phytophthora parasitica* IN *Citrus limonia*

Author: Deise Renata Gonzalez Agnani

Adviser: Dra. Adriana Parada Dias da Silveira

SUMMARY

Studies on interactions of arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) and other rhizospheric microorganisms have shown the effect of AMF on these microorganisms and vice versa. Species of the genus *Trichoderma* have been used to control root pathogens. This fungus produces some extracellular enzymes that degrade fungal cell wall, what is considered an important factor of biocontrol. Plant growth-promoting rhizobacteria, such as some *Pseudomonas* of the fluorescent group, can act in root pathogens biocontrol, producing antagonist substances or siderophores. Besides, it is known the importance of organic matter as a factor of soil improvement, decreasing soil and rhizosphere pathogens. One of the major citrus diseases is the root rot caused by *Phytophthora parasitica*. Our purposes were to study the interactions that may occur in rhizosphere and host plant in the presence of *P. parasitica*, AMFs and biological control agents; to evaluate the effect of different substrates in this microbe interaction and to select rhizospheric bacteria to control *P. parasitica in vitro* (B King media, carrot media and wheat seeds) and *in vivo*, using *Citrus limonia*. The first experiment had the purpose of evaluating the microbe interactions in plants, using an inert substrate, testing the effect of AMF (*Glomus intraradices* inoculated at seed nursery- GI

before transplanting, or, *G. intraradices* inoculated at transplanting- GI), biological control agent (*Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis*) and the pathogen (*P. parasitica*). A second experiment had a factorial 3x3x2 completely randomized design, where the factors were: biological control agents (*T. harzianum*, *B. subtilis* and no agent), AMFs (*G. intraradices*, *G. etunicatum* and no AMF), *P. parasitica* (with and without), with previous, afterwards and concurrent inoculation of AMF and biological control agent. A last experiment had a factorial 2x2x2x3 completely randomized design, where the factors were: *T. harzianum* (with or without), *G. intraradices* (with or without), *P. parasitica* (with or without), substrates (soil with addition of 2 kinds of organic matter- dairy manure and plantmax- and no addition). The plant growth was enhanced by AMF and biological control agents inoculated previously or concurrently with AMF, observing that these antagonists did not affect the radicular colonization. There was disease control in treatments 1° Tri/GE, 1° GI/Tri, exclusively with *Trichoderma* and *Bacillus* inoculation. *In vitro* assays showed that *Pseudomonas* sp isolates 80S, A5 and I6 were antagonists to the pathogen. Most of the bacteria isolates, 78%, showed pathogen control *in vivo* and root weight was not affected by the presence of *P. parasitica*. When using inert substrate (sand) all treatments controlled *P. parasitica*. The radicular colonization with no pathogen inoculation was significantly higher with previous AMF inoculation. *Trichoderma* decreased significantly the AMF colonization when it was inoculated previously. Colonized plants by *G. intraradices* and GI+Tri, inoculated or not with *P. parasitica*, showed a significantly higher growth in the 3 substrates tested. The mycorrhizal plants, in the presence or absence of *Trichoderma*, controlled *P. parasitica*.

1INTRODUÇÃO

As plantas cítricas, originárias da China, são propagadas em todas as partes do mundo que oferecem possibilidades para o seu cultivo com sucesso. Introduzida no Continente Americano, a citricultura constitui importante segmento na estrutura socioeconômica do Brasil, sendo o principal produtor o Estado de São Paulo, que possui condições ideais de solo, clima e tecnologia para o seu cultivo, transformando o nosso país no maior produtor de citros e exportador de suco cítrico concentrado e congelado do mundo. A área compreendida pela região citrícola é da ordem de 40.000 km². A laranja é a principal atividade econômica de 330 municípios paulistas, gera 400 mil empregos diretos e 1,6 milhão de indiretos; o setor movimenta US\$ 5 bilhões/ano; e a exportação de citros nesta temporada deverá trazer US\$ 1,5 bilhão em divisas para o país. Nos últimos anos, a produção brasileira de citros tem sido em torno de 350 milhões de caixas. Desse total, cerca de 245 milhões de caixas são destinadas à industrialização, 103,5 milhões ao consumo interno e 2,1 milhões à exportação. No país, a fruta é consumida *in natura*, ou na forma de suco pasteurizado ou fresco.

A qualidade da muda cítrica é um dos fatores mais importantes no estabelecimento de um pomar comercial, principalmente devido ao caráter perene da cultura.

Há muito já se conhece o alto grau de dependência das plantas cítricas à associação micorrízica arbuscular. Um dos fatores decisivos para essa dependência é, sem dúvida, o sistema radicular reduzido de tais plantas, extremamente deficiente em pêlos absorventes. Neste caso, o emprego de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) na produção de mudas de porta- enxertos seria especialmente benéfico, devido maior economia de água, proteção de plantas a pragas, doenças e nematóides, aumento na eficiência do uso de nutrientes e racionalização no uso de adubos, na redução de efeitos tóxicos de metais comuns em solos ácidos e na compensação da capacidade diferenciada dos porta-enxertos na absorção de nutrientes do solo, proporcionados pela micorrização.

O aspecto de proteção das plantas a pragas e doenças ocasionada pela micorriza evidencia que o próprio FMA pode ser encarado como um agente de controle biológico. Neste caso, o controle do patógeno parece ocorrer por um efeito indireto da micorrização, a qual garantindo melhor desenvolvimento e estado nutricional da planta, permite que esta apresente maior tolerância ao patógeno. Um dos mecanismos de controle biológico revela que microrganismos não patogênicos, inclusive fungos micorrízicos podem ser capazes de desencadear processos de ativação de genes induzíveis de defesa das plantas, o que é denominado de Resistência Sistêmica Induzida. Uma das defesas de caráter bioquímico induzidas nas plantas, pode ser o aumento da atividade de proteínas relacionadas com a patogênese, como por exemplo, as proteínas β -1,3 glucanases e quitinases.

O principal objetivo do controle biológico é o de manter, pelo uso de certas práticas e da introdução de uma biomassa de antagonistas, todos os componentes do agroecossistema em equilíbrio, constituído pelo hospedeiro cultivado junto com os patógenos e os organismos úteis. O gênero *Trichoderma* tem sido um modelo excepcionalmente bom para estudar o biocontrole de doenças de plantas porque é ubíquo, fácil de isolar e cultivar, cresce rapidamente sobre muitos substratos, afeta muitos patógenos de plantas, é raramente patogênico às plantas superiores, atua como um micoparasita, etc. Produzem uma série de enzimas extracelulares que

degradam paredes de células fúngicas, sendo um fator importante de biocontrole. Entretanto, isto também pode ocorrer com as hifas e esporos de FMA.

Evidências indicam que o efeito no crescimento das plantas provocado pelas bactérias resulta da inibição ou alteração da microbiota normal da rizosfera, através da produção de sideróforos ou de substâncias com efeito antagônico que desempenham possível papel no biocontrole de patógenos de plantas.

O melhoramento do solo com matéria orgânica também pode promover o controle biológico de patógenos do solo. A matéria orgânica pode afetar o vigor da planta, melhorando a estrutura e umidade do solo e a capacidade de absorção de nutrientes, mas seu principal efeito está em suprimir o patógeno do solo e da rizosfera pelo suprimento de uma complexa e antagônica microbiota e fauna do solo.

Onze espécies de *Phytophthora* já foram descritas como capazes de induzir doença em plantas cítricas, a chamada gomose. Em viveiros, pode provocar podridão das raízes e radículas, lesões em brotações novas e exsudação de goma na haste, levando a morte da muda. Alguns agentes de controle biológico, como *Trichoderma* e *Pseudomonas* do grupo das fluorescentes têm sido apontados como promissores no controle de *Phytophthora*. Além disso, plantas cítricas micorrizadas têm mostrado certa tolerância a esse patógeno, demonstrando uma interação positiva.

Assim, os objetivos foram estudar as interações que ocorrem na rizosfera e na planta hospedeira quando da presença concomitante de *Phytophthora parasitica*, FMAs e agentes de controle biológico, e, avaliar o efeito de diferentes substratos em tais interações microbianas, utilizando-se o porta-enxerto limoeiro Cravo (*Citrus limonia*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

O termo micorriza se refere à associação entre fungos e raízes de carácter mutualístico, devido à alta interdependência e benefícios comuns estabelecidos entre os parceiros, no qual a planta hospedeira recebe nutrientes minerais via micélio do fungo (micotrofismo) e o fungo heterotrófico (quimiorganotrófico) obtém fotoasssimilados da planta hospedeira (Harley & Smith, 1983; Aczón- Aguilar & Bago, 1994). O fungo micorrízico é considerado extensão das raízes e proporciona à planta um maior desenvolvimento, principalmente devido à exploração de um maior volume de solo, o que permite a melhor e maior absorção de nutrientes, principalmente os de baixa mobilidade no solo, como P, principalmente, Zn e Cu (Cardoso, 1986).

O limoeiro Cravo (*Citrus limonia* (L.) Osbeck) é o porta-enxerto mais utilizado pelos citricultores brasileiros, devido as suas qualidades de precocidade, produção elevada e constante, apesar de sua suscetibilidade à viroses (Pompeu Junior, 1991).

O micotrofismo de uma determinada espécie vegetal constitui um fator importante na resposta à inoculação e está relacionada com a morfologia de seu sistema radicular. Plantas com raízes grossas, pouco ramificadas e com poucos pêlos radiculares apresentam elevada dependência micorrízica para atingir um

desenvolvimento satisfatório, como é o caso das plantas cítricas (Hatting & Gerdemann, 1975).

As plantas cítricas são propagadas, principalmente, a partir de mudas enxertadas e é da qualidade destas, que depende a produtividade dos pomares. Estudos visando a redução do período necessário para a produção de muda cítrica com alta qualidade têm sido relacionados com a inoculação de FMA. O benefício de tal inoculação tornou-se ainda mais evidente, pela observação de que as mudas de plantas cítricas colonizadas, em solo esterilizado, tiveram a época de enxertia reduzida para cerca de oito meses após a semeadura (Cardoso et al., 1986).

Apesar de não haver especificidade entre FMAs e o hospedeiro, há certa diferença de afinidade entre porta-enxertos de citros e as espécies de FMA, o que tem sido observado em diversas condições de solo (Oliveira & Jesus, 1987). Os microrganismos do solo influenciam a colonização das raízes pelos endófitos micorrízicos, sendo que, geralmente, a inoculação de FMAs só traz benefícios às plantas se estes forem mais eficientes que os endófitos nativos e se conseguirem superar a ação de organismos hiperparasitas e saprófitas do solo (Abbot & Robson, 1981). Entretanto, existem espécies de FMAs que mesmo introduzidas no solo não esterilizado apresentam elevada eficiência (Manjunath et al., 1983).

2.1 *Phytophthora parasitica* como agente causal de doença em plantas cítricas

Segundo Feichtenberger (1989), onze espécies de *Phytophthora* já foram descritas como capazes de induzir doença em plantas cítricas: *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian, *P. nicotinae* var. *parasitica* (Dastur) Waterhouse, *P. cactorum* (Lebert & Cohn) Schroter, *P. palmivora* (Butler), e *P. cinnamoni* Rands. No Brasil, *P. citrophthora* e *P. nicotinae* var. *parasitica* são as mais encontradas nas principais regiões produtoras da América do Sul.

A podridão de *Phytophthora* é conhecida também por podridão do pé e podridão de raízes, podridão do colo, podridão marrom, mal de goma e gomose e atinge grande variedade de plantas cultivadas. Os fungos agentes causais da gomose vivem saprofiticamente no solo, principalmente em solos argilosos. A penetração e desenvolvimento do fungo são favorecidos pela alta umidade no colo da planta, temperaturas entre 25,5 e 31,5° C, chuvas bem distribuídas, com 1300 a 1500 mm de água por ano, ferimentos no tronco, acúmulo de matéria orgânica, e pela suscetibilidade da combinação enxerto-porta-enxerto ou combinação de clones (Kimati & Galli, 1980).

As principais espécies que ocorrem na cultura dos citros são basicamente diferenciadas pela curva de temperatura, sendo que *P. parasitica* cresce a temperaturas superiores a 35° C tendo como ótimo 30 - 32° C, enquanto *P. citrophthora* não cresce a 35° C e seu ótimo está em torno de 25 - 28° C (Ribeiro, 1978). Com relação a condições favoráveis para o desenvolvimento de epidemias, foram relatados que temperaturas superiores a 25° C e alta umidade favorecem a infecção, no entanto, extremos de temperatura limitam o desenvolvimento da doença por efeitos diretos no patógeno ou por redução da infecção (Benson, 1982 & Field et al., 1991). Baixas quantidades de oxigênio próximo das raízes aumenta a podridão e a planta não consegue mais crescer ou regenerar suas raízes (Stolzy et al., 1991).

O controle das doenças ocasionadas por fungos do gênero *Phytophthora* varia de acordo com a idade da planta e compreende o uso de produtos químicos (fungicidas), medidas culturais, escolha do porta-enxerto ou esterilização de solos para produção de mudas. Assim, as práticas recomendadas em viveiros são diferentes das medidas preconizadas para o controle da gomose em pomares jovens e adultos. Em viveiros, podem provocar podridão das raízes e radículas, lesões em brotações novas e exsudação de goma na haste. Quando o ataque se dá nas raízes poderá ocorrer a destruição total, levando a morte da muda ou redução drástica da área total das raízes e radículas da planta. Nas brotações novas, as lesões são escuras e úmidas e provocam a morte dos brotos do seu ápice a base (Feichtenberger, 1989). Geralmente, o que se usa é um conjunto de

medidas, variando conforme o caso. No Estado de São Paulo, o índice de contaminação em viveiros é alto e vem se agravando diante da substituição de porta-enxertos após o aparecimento da Tristeza e do Declínio. Limoeiro Cravo e tangerina Cleópatra são moderadamente suscetíveis à *Phytophthora* e laranja Caipira e tangerina Sunki são altamente suscetíveis, principalmente à *P. parasitica* (Feichtenberger et al., 1992).

A produção de mudas com alta qualidade fitossanitária é fundamental para evitar perdas ocasionadas por fungos do gênero *Phytophthora* no pomar. Recentemente vem sendo preconizada a produção de mudas em tubetes preenchidos com substratos comerciais, como por exemplo o Plantmax, composto por vermiculita expandida, matéria orgânica, macronutrientes e micronutrientes (Eucatex Mineral, 1994). O controle do fungo sob tais circunstâncias vem sendo feito principalmente através da fumigação com brometo de metila. Segundo Tucker & Anderson (1972), o uso deste produto tem provocado enfezamento das mudas em vários viveiros da Flórida, o que pode estar relacionado à ausência de propágulos de FMA e portanto à não colonização da planta (Kleinschmidt & Gerdemann, 1972).

Fungos do gênero *Phytophthora* podem sobreviver em solos e materiais vegetais em decomposição às custas de estruturas vegetativas e reprodutivas, como muitos microrganismos do solo influem na sua sobrevivência no solo, pois, podem provocar a lise de hifas e o abortamento de esporângios, e com isso reduzir sua população, ou competirem diretamente por nutrientes (Feichtenberger, 1989). Portanto, a sobrevivência de *Phytophthora* no solo, e conseqüentemente o seu potencial para a manifestação de doenças em citros, depende não só do número mas também da composição da microbiota do solo. Aqueles que apresentam uma microbiota rica e diversificada e/ou todas as medidas que visam enriquecer a microbiota antagônica contribuem para a diminuição da severidade de doenças por esses patógenos em citros.

O uso de um agente biológico para controle de *P. parasitica* em citros tem mostrado resultados bastante positivos. Entretanto, há certas limitações para que este controle se torne viável e acessível: falta de adaptabilidade dos agentes ao

processo industrial, baixa eficiência de preparo comparado com o custo, falta de conhecimento sobre os riscos à saúde e ao ambiente e relutância dos agricultores em utilizar novas tecnologias (Levis & Papavizas, 1991).

2.2 Controle biológico de *Phytophthora*

Baker & Cook (1974) definem controle biológico como sendo “a redução da densidade do inóculo ou atividade produtora de doença de um patógeno ou parasita no seu estado ativo ou dormente por um ou mais organismos, ocorrendo naturalmente, por manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonistas, ou ainda por introdução massal de um ou mais antagonistas”.

O principal objetivo do controle biológico é o de manter, pelo uso de certas práticas e da introdução de uma biomassa de antagonistas, todos os componentes do agroecossistema em equilíbrio, constituído pelo hospedeiro cultivado junto com os patógenos e os organismos úteis. Tais níveis de equilíbrio podem ser alcançados pela elaboração de um sistema integrado de produção, com destaque ao controle biológico, sem perda significativa da produtividade agrícola, e com a vantagem de se obter maior economicidade e menores riscos de impactos no ambiente. Portanto, o controle biológico, através do uso de fungos benéficos ou bactéria, é uma alternativa para o uso de fumigantes ou fungicidas (Cook e Baker, 1983).

O sucesso do uso de microrganismos no controle biológico, no entanto, depende da forma de aplicação do antagônico e da especificidade deste com relação ao patógeno. Adams (1990) descreveu que espécies de *Trichoderma* são micoparasitas pouco agressivas e pouco eficientes, e que só atuam quando aplicados em nichos ecológicos especiais, como solo ou substratos recém-vaporizados ou fumigados; nestes ambientes alterados e não competitivos proliferam e evitam a recolonização do patógeno. As vantagens do fungo *Trichoderma* ser um bom controlador biológico são: rápido crescimento, poucos requisitos nutricionais, produz esporos e clamidosporos, produz enzimas líticas que digerem a parede celular de fitopatógenos, produz antibióticos voláteis e não-

voláteis, produz um fator que regula o crescimento de plantas, adquire resistência aos fungicidas com facilidade, apresenta ciclo parassexual conhecido em algumas espécies, facilitando os estudos de genética clássica, é facilmente mutável através de radiações ionizantes e não-ionizantes e mutagênicos químicos, apresenta conídios uninucleados em muita espécies, o que facilita a obtenção de mutantes estáveis, além de afetar muitos patógenos de planta e ser raramente patogênico às plantas superiores (Baker & Cook, 1974; Levis & Papavizas, 1984; Mello, 1991).

Trichoderma é um fungo natural do solo e aumenta a densidade de inóculo com a utilização de práticas agrícolas, ou simplesmente pela introdução massal direta no solo (Melo, 1991). Produzem uma série de enzimas extracelulares que degradam paredes de células fúngicas (biocontrole), sendo que um dos importantes fatores que afetam o hiperparasitismo é a nutrição. Fatores ecológicos diversos afetam a distribuição de *Trichoderma* em seu habitat natural, interferindo na sobrevivência e na proliferação desse micoparasita no solo e na rizosfera (Melo, 1996).

Deve-se ter muito cuidado quando se pretende utilizar um microrganismo para controle biológico, pois são várias as condições bióticas e abióticas que interferem tanto do lado do antagonista quanto do lado do patógeno. Além disso, um determinado isolado de agente de controle biológico pode ser ótimo controlador para um isolado do patógeno, mas não ter efeito em outros isolados da mesma espécie (Bell et al., 1982).

Várias espécies de *Trichoderma* já foram relatadas como antagonicas a *Phytophthora*, inclusive *P. parasitica*. Em estudos *in vitro*, metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. reduziram o crescimento de *Phytophthora*, seguida da vacuolação do conteúdo celular e lises das hifas (Brassier, 1975). Uma das formas de se manipular o antagonismo a *Phytophthora* spp. é pela introdução de antagonistas ao substrato de plantio (Malajczuk, 1983).

Penicillium funiculosum foi avaliado em casa de vegetação por sua capacidade de suprimir podridão de raízes causada por *Phytophthora citrophthora* em *Citrus sinensis* e por aumentar crescimento raízes e de brotos (Fang & Tsao,

1995). O controle químico, como Metalaxyl e Fosetyl Al., tem sido realizado com sucesso mas não é sempre desejável pelo alto custo de aplicação e por apresentar toxicidade para as culturas (May, 1994). Portanto o controle mais propício seria o biológico. A integração de *Trichoderma* e *Gliocladium* com corrente controle químico pode controlar *Phytophthora cactorum* em maçã (Smith et al., 1990). Segundo Sawant et al., (1995), com o controle biológico a podridão de raiz não apareceu na presença de *T. harzianum* que atuou como um eficiente antagonista de *Phytophthora* em plantas de café. Estes autores também concordam com a integração do controle químico e biológico, pois pode ser um método sinérgico para o controle da podridão de raiz.

Segundo Amorim (1997), o controle mais eficiente de *P. parasitica* e *P. citrophthora* foi induzido pelos isolados *T. harzianum* (T9 e T13) e *T. koningii* (T3), cultivados em farinha de arroz e inoculados em substratos pré-infestado com o patógeno (10g de inóculo/500mL de substrato). May (1994) também obteve o controle de *P. parasitica* utilizando a mesma dosagem de uma mistura de 5 isolados de *Trichoderma* cultivados em farinha de arroz. *Trichoderma harzianum* foi o mais eficiente controle para *Fusarium* (causador de doenças de raízes) e *Bacillus subtilis* provou melhor eficácia para o controle de *Phytophthora* (Nemec et al., 1996).

Sementes ou raízes de plântulas podem ser tratadas com o objetivo de induzir aumento no crescimento das plantas, o que é denominado de bacterização (Brown, 1974).

Segundo Schroth & Hancock (1981), o aumento no crescimento de plantas promovidos por isolados do grupo *P. fluorescens* Mig. e *P. putida* (Trev.) Mig. foi freqüentemente acompanhado por reduções na população de fungos e bactérias da rizosfera, sendo que esses isolados benéficos foram também eficientes agentes de biocontrole de alguns patógenos do solo.

Em virtude da larga população no solo, as bactérias constituem um significativo componente microbiano influenciando os propágulos de *Phytophthora* spp. nesse ambiente (Baker & Cook, 1974). Muitas pesquisas têm observado bactérias colonizando intensivamente hifas desse patógeno. Por microscopia de

luz e eletrônica da interface solo-hifa de *P. cinnamomi*, mostrou-se a relação da bactéria sobre as hifas em solo não esterilizado, observando-se a formação de microcolônias de 5 a 40 células bacterianas junto às hifas do fungo (Malajczuk, 1983), ou seja, na hifosfera.

A atração das bactérias pelas hifas parece ser uma resposta quimiostática, promovida pela exsudação de substâncias das hifas do patógeno, que estimulam a população desses antagonistas na rizosfera (Nesbitt et al., 1981). Estes mesmos autores já demonstraram a translocação de exsudatos de fenilalanina e glucose por hifas de *P. cinnamomi* que podem servir como atraente quimiostático e/ou substrato metabólico para as bactérias.

A produção de antibióticos *in vitro* por bactérias (*Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Flavobacterium* sp. e *Pseudomonas* spp.) antagonicas a espécies de *Phytophthora* é reconhecida e está envolvida na iniciação de lise das hifas desse patógeno (Sarbin & Kommedahl, 1977).

Evidências indicam que o efeito no crescimento das plantas provocado pelas bactérias resulta da inibição ou alteração da microbiota normal da rizosfera. O fator mais estreitamente relacionado com a ação das bactérias benéficas é a produção de um sideróforo difusível que forma quelatos com o ferro e funciona como um composto biostático, reduzindo a forma disponível deste nutriente para microbiota da raiz (Kloepper et al., 1980; Leong, 1986).

A combinação de isolados biocontroladores tem sido sugerida como uma tentativa para aumentar o nível e a consistência de controle de alguns patógenos do solo (Lemanceau & Alabouvette, 1991, Paulitz et al., 1991, Pierson & Weller, 1994). A atividade combinada dos metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. com compostos antifúngicos produzidos pelos agentes bacterianos pode expandir o espectrum de patógenos que podem ser controlados. A atividade de biocontrole pode ser aumentada pela combinação de *T. koningii* e *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Dully et al., 1996).

É sabido que *Pseudomonas* spp. produz sideróforos que poderiam afetar a nutrição em ferro das plantas, pelo aumento na sua disponibilidade (Freitas et al., 1994). Além disso, a produção de hormônios pode provocar a elongação dos

tecidos radiculares, resultando no estímulo à absorção de nutrientes (Freitas & Germida, 1992), já tendo sido observado aumento no número de raízes laterais (Tien et al., 1979), o que pode alterar a formação de micorriza.

Populações bacterianas podem reagir diferentemente com plantas micorrizadas dependendo da planta e do fungo. Segundo Silveira et al. (1995) houve interações das bactérias fluorescentes com os fungos micorrízicos, resultando em aumentos no crescimento de raízes, nodulação, absorção e eficiência de utilização de N e P pelo feijoeiro, quando da inoculação conjunta com *G. etunicatum*. Staley et al. (1992) também constataram que a rizobactéria promotora do crescimento da planta, *Pseudomonas putida*, e a inoculação com fungo micorrízico, *Glomus intraradices*, aumentou a nodulação em alfafa.

A comunidade micorrizosférica de *Pseudomonas* fluorescentes, estabelecida em plantas de milho e trevo subterrâneo, colonizadas por *Glomus fasciculatum*, diminuiu, quando comparada à comunidade rizosférica de plantas não micorrizadas (Meyer & Linderman, 1986). Christensen & Jakobsen (1993) também observaram, em pepino, que a presença de micorriza arbuscular (*Glomus fasciculatum*) decresceu a biomassa bacteriana de *Pseudomonas* spp. Isto pode ser devido a possibilidade do fungo micorrízico aumentar a habilidade competitiva das plantas contra a microbiota da rizosfera saprofítica por nutrientes comuns como o N e P. Marschner et al. (1997) constataram que a população de *P. fluorescens* diminuiu em raízes colonizadas por *Glomus deserticola* em pimentão (*Capsicum annum* L.). A colonização micorrízica pode diminuir a exsudação de raízes e alterar a composição da solução do solo na rizosfera, reduzindo a população de certos grupos de bactérias na rizosfera. Paulitz & Linderman (1989) fizeram inoculações conjuntas de isolados de *Pseudomonas putida* e *P. fluorescens*, e, *Glomus intraradices* e *G. etunicatum* em abóbora. No início do crescimento das plantas, quase todos os isolados de *Pseudomonas* tiveram sua população diminuída na presença de *G. intraradices*, mas não de *G. etunicatum*. Dois isolados bacterianos, por sua vez, já conhecidos como produtores de antibióticos, atrasaram a germinação de esporos de *G. etunicatum*. Como *G. intraradices* colonizou as raízes mais rapidamente que *G. etunicatum*, atribuiu-se o

efeito negativo do primeiro fungo sobre a população de *Pseudomonas* à competição entre ambos por produtos fotossintetizados em um período em que a planta os produz em pequena quantidade. Como *G. etunicatum* foi um colonizador mais lento, essa competição não existiria e, portanto, não haveria influência sobre a população de *Pseudomonas*. Trabalhando também com milho, Vejsadová et al. (1993) constataram que um isolado de *P. putida* não exerceu nenhum benefício em plantas colonizadas por fungos micorrízicos nativos.

Essa diminuição da formação de micorriza também já foi observada em soja colonizada por *G. mosseae* e *Streptomyces griseoviridis*, um agente de controle biológico (Wyss et al., 1992).

O uso de agentes de controle biológico como *Pseudomonas* fluorescentes e *Trichoderma* requerem atenção particular pois há possibilidade de que estes antagonistas de fungo interagem não somente com fungo patógeno mas também com o fungo micorrízico (Vázquez et al., 2000).

A redução da severidade de certas doenças de raízes por práticas culturais, tais como a adubação orgânica e adubação verde, tem sido atribuída a mudanças na natureza e atividade da microbiota do solo. De acordo com Baker & Cook (1974), o melhoramento do solo com matéria orgânica para promover o controle biológico de patógenos do solo tem ganho importância, devido a alguns resultados surpreendentes obtidos por pesquisas experimentais em casa de vegetação e no campo. A matéria orgânica pode afetar o vigor da planta, melhorando a estrutura e umidade do solo e a capacidade de absorção de nutrientes, mas seu principal efeito está em suprimir o patógeno do solo e da rizosfera, pelo suprimento de uma complexa e antagônica microbiota e fauna do solo (Broadbent & Baker, 1975). Esterco curtido, compostos fermentados de restos de cultura, lixo ou esgoto devidamente processados, casca e serragem de árvores garantem o estímulo da atividade microbiana, limitando a atividade de fitopatógenos por competição, favorecendo os antagonistas (Lumsdem et al., 1983).

A estimulação da atividade microbiana pela competição, antibiose e lise dos propágulos e a liberação de metabólitos tóxicos dos resíduos pode explicar a ação da matéria orgânica sobre os fitopatógenos do solo (Valdebenito-Sanhueza,

1991). Os materiais orgânicos incorporados no solo aceleram a morte dos propágulos em função do estímulo à germinação desses pela liberação de nutrientes e em função dos estímulos dos antagonistas específicos, como fungos e bactérias, que podem utilizar rapidamente o carbono, o nitrogênio e o oxigênio disponíveis, matando o propágulo germinado por inanição.

O uso da adubação orgânica como método de controle de *Phytophthora* spp., tem, provavelmente, maior aplicação em sementeiras. Entretanto, no campo, tanto pode inibir como estimular a germinação dos propágulos. O emprego de restos culturais em estágios iniciais de decomposição e com reduzido teor de oxigênio, além de permitir a presença de propágulos de fitopatógenos, aumenta o número de propágulos viáveis e pode trazer sérios problemas de toxicidade, tornando o solo condutivo.

Já foi observado controle de *Phytophthora* pelo uso de adubações orgânicas em algodoeiro (Malajczuk, 1983) e abacateiro (Broadbent & Baker, 1975). Em citros, Amorim (1997) constatou que a adubação do solo com cama de frango (12 t/ha) foi altamente eficiente, erradicando *P. parasitica* do substrato de plantio, enquanto a adubação com torta de mamona (100 t/ha) controlou *P. citrophthora*. O controle de *P. parasitica* e *P. citrophthora* também foi proporcionado pela mistura de isolados antagonistas, (MBT-bacterianos misturados com *Trichoderma*) com cama de frango (12 t/ha) e pela mistura de torta de mamona (100 t/ha) com os isolados antagonistas, MB-isolados bacterianos ou MBT, respectivamente.

2.3 Interação FMA e microrganismos do solo

O fungo micorrízico é considerado extensão das raízes e proporciona à planta um maior desenvolvimento, principalmente devido à exploração de um maior volume de solo, o que permite a melhor e maior absorção de nutrientes, principalmente os de baixa mobilidade no solo, como P, principalmente, Zn e Cu (Cardoso, 1986).

Um dos aspectos da utilização prática das micorrizas arbusculares diz respeito à produção de inóculo e o método de incubação (Oliveira et al., 1992). Como o fungo não cresce em meio de cultura artificial, o inóculo deve ser produzido em plantas multiplicadoras e aplicado na forma de suspensão de esporos ou alíquotas de solo contendo esporos e fragmentos de raiz colonizada (Hayman et al., 1981), o que no caso de produção de mudas de plantas cítricas, que é feito em viveiro, é perfeitamente viável.

As interações dos fungos micorrízicos com outros organismos do solo podem ser inibitórias ou estimulatórias; algumas são claramente competitivas e outras podem ser mutualísticas (Fitter & Garbaye, 1994).

Os FMAs podem reduzir o efeito de alguns fungos fitopatogênicos habitantes do solo, sobre a planta hospedeira. Todavia, para que esse efeito seja mais pronunciado, torna-se imprescindível que o FMA se estabeleça nos tecidos das raízes antes dos fungos ou nematóides fitopatogênicos, que atacam o sistema radicular (Zambolim, 1991).

Possíveis mecanismos de controle de patógenos pelo fungo micorrízico são propostos: aumento da nutrição da planta, mudanças bioquímicas no tecido da planta, mudanças anatômicas, diminuição do estresse que predispõe plantas a doenças, mudanças microbianas na rizosfera, mudanças induzidas devido a morfologia do sistema da raiz e competição direta entre FMA e patógeno pelo espaço físico e recursos (Norman et al., 2000).

Existem mecanismos de ação indiretos que incluem interações com as plantas ou com outros microrganismos (Handelsman & Stabb, 1996). Um dos mecanismos de controle biológico revela que microrganismos não patogênicos, inclusive fungos micorrízicos, são capazes de desencadear processos de ativação de genes induzíveis de defesa das plantas, o que é denominado de Resistência Sistêmica Induzida (RSI). Este tem um grande potencial de uso, já que se expressa até em variedades consideradas susceptíveis (Leeman et al., 1995) e a proteção resultante não é tão específica como a da genética convencional. *Glomus mosseae* induziu não só resistência local, mas também sistêmica a *P. parasitica* nas raízes de tomate (Cordier et al., 1998). Davis e Menge (1981)

encontraram que, em certas combinações de espécies de fungos micorrízicos e plantas cítricas, a resistência a *P. parasitica* nas plantas não foi devido à nutrição e levantaram a hipótese de que a colonização dos fungos micorrízicos elicitaram mecanismos de resistência no hospedeiro.

Entre os mecanismos bioquímicos, pode haver o aumento da atividade de várias proteínas no interior do hospedeiro, conhecidas como proteínas relacionadas com a patogênese- proteínas PR (Loon, 1985), tais como PR-1, as β -1, 3 glucanases e as quitinases inclusive em plantas micorrizadas (Cordier et al., 1996; Cordier et al., 1998). Em raízes de tomate micorrizadas foram encontradas várias formas ácidas de quitinases constitutivas e uma isoforma ácida adicional. As raízes de tomate após a infecção por *P. parasitica* expressaram outra quitinase ácida diferente daquela induzida pelo fungo micorrízico (Pozo et al., 1996).

Apesar do aumento da nutrição da planta, a compensação por danos do patógeno e competição por fotossintatos ou sítios de colonização/infecção, têm sido proposto desempenhar um papel de proteção na simbiose micorrízica arbuscular. Há evidências de que o aumento na capacidade para a aquisição de nutrientes, que resultam na associação micorrízica, podem resultar em plantas mais fortes para resistir ao estresse. Entretanto, a simbiose micorrízica arbuscular pode também melhorar o desenvolvimento da planta através de um aumento mais específico na proteção (aumentando a resistência e/ou tolerância contra fatores bióticos e abióticos limitantes) (Azcón-Aguilar & Barea, 1996).

A formação da micorriza, alterando a pressão seletiva na população de microrganismos do solo, pode levar a seleção de microrganismos antagônicos na micorrizosfera: este é um dos mecanismos propostos para explicar o papel do fungo micorrízico no controle biológico de doença de plantas (Citernesi et al., 1996).

O FMA reduziu a necrose de raiz causada por *Phytophthora fragariae* (Norman et al., 1996) e causou certa proteção contra *Pythium ultimum* em plantas micorrizadas que apresentavam alta produção de fitomassa e foliar (Calvet et al., 1993). Trotta et al. (1996), também constataram que *Phytophthora* em plantas de tomate resultou em uma visível redução na massa da matéria seca e

aparecimento de necrose na raiz em plantas não micorrizadas, a qual diminuiu em plantas micorrizadas. A tolerância à podridão de raiz causada por *Phytophthora parasitica* em citrus colonizado por *Glomus fasciculatum* é causada pela maior capacidade das raízes micorrizadas em absorver fósforo e possivelmente outros minerais do que as raízes não micorrizadas (Davis & Menge, 1980). Entretanto, Davis et al. (1978) observaram que o estímulo no crescimento de citros causado por FMAs foi diminuído ou eliminado quando da presença de *Phytophthora*.

Segundo McAllister et al. (1994), o decréscimo na produção de matéria seca de plantas causado pelo fungo saprofítico parece ter sido uma consequência direta da ação destes fungos sobre as raízes colonizadas por FMA, o que somente aconteceu quando o fungo saprofítico foi inoculado antes ou ao mesmo tempo que *Glomus mosseae*. Substâncias solúveis e voláteis produzidas por fungos saprofíticos estão envolvidas na inibição da germinação de esporos. Também constataram que *Trichoderma koningii* foi consideravelmente reduzido quando *G. mosseae* foi inoculado antecipadamente. Em milho, observou-se que a inoculação simultânea de *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* e esporos de *G. mosseae* decresceu significativamente a porcentagem do comprimento de raízes colonizadas pelo FMA não havendo efeito na colonização micorrízica quando *Glomus mosseae* foi introduzido antes de *A. alternata* e *F. equiseti*. Na presença dos agentes de controle biológico, a formação de micorriza com *Glomus mosseae* foi significativamente deprimida, particularmente com *Streptomyces griseoviridis* e *Trichoderma harzianum* (Wyss et al., 1992). *Alternaria alternata* e *Fusarium equiseti* (fungos saprofíticos) reduziram a germinação de esporos de *Glomus mosseae*, independentemente do pH do solo (McAllister et al., 1996).

Alguns *Trichoderma* spp. têm mostrado um potencial antagonista contra fungo patogênico e um efeito benéfico em plantas superiores. A inoculação de *Trichoderma aureoviride* não afetou o desenvolvimento da colonização radicular micorrízica por *Glomus intraradices* em citros (Camprubí et al., 1995).

McAllister et al. (1994), constataram que *Fusarium solani* não teve efeito na colonização micorrízica, enquanto que *Glomus mosseae* foi inibido por *Trichoderma koningii*. *In vitro*, esporos germinados de *Glomus mosseae* não

afetaram o crescimento de fungos saprofíticos em ágar-água. *Trichoderma koningii* inibiu a germinação, mas não o desenvolvimento de micélio de *Glomus mosseae*; independentemente do pH, a colonização de raízes por FMA pode diminuir ou permanecer sem ser afetada, dependendo do tempo de inoculação dos demais microrganismos envolvidos na interação.

Em um experimento de campo, realizado para avaliar a inoculação de 2 fungos benéficos, *Trichoderma harzianum* e *Glomus intraradices* no controle de *Fusarium*, causador de podridão em tomates, observou-se comparando-se com a testemunha, decréscimos significativos na severidade da doença nos tratamentos com *T. harzianum*, *Glomus intraradices* e *T. harzianum* + *Glomus intraradices* (Datnoff et al., 1995).

A interação de fungo saprofítico *Trichoderma harzianum* e FMA *Glomus intraradices* foi estudada por microscópio eletrônico de transmissão para observar a relação estabilizada entre ambos. Constatou-se que hifas de *T. harzianum* proliferaram abundantemente na superfície do esporo do FMA (Rousseau et al., 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos em casa de vegetação foram realizados no Núcleo Experimental do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e os ensaios e análises de laboratório no Centro de Solos e Recursos Agroambientais do IAC.

3.1 Testes de Antagonismo de isolados de *Pseudomonas* sp a *Phytophthora parasitica*

3.1.1 Testes em meios de cultura

Para a verificação de possível antagonismo entre as bactérias usadas e o fitopatógeno *Phytophthora parasitica* foram realizados testes de confrontação de microrganismos dois a dois em placas de Petri. Foram testados 69 isolados bacterianos, obtidos na rizosfera de alface, tomate e cenoura, pertencentes ao gênero *Pseudomonas* do grupo fluorescente (Centro de Solos e Recursos Agroambientais), contra um isolado de *Phytophthora parasitica* obtido no Núcleo de Citricultura do IAC, em Cordeirópolis, SP. Foram empregados os meios B de King, que relaciona antagonismo com produção de sideróforo, e o meio de cenoura, no qual o antagonismo ocorrerá devido à produção de substâncias fungicidas e/ou fungistáticas.

Discos de meio de cultura de quatro mm de diâmetro contendo parte de colônia fúngica foram transferidos para o centro da placa de Petri com o meio B

(King et al., 1954) e meio de cenoura. Após o crescimento inicial do fungo, à cerca de 2 cm do centro desses discos, em quatro pontos eqüidistantes, inoculou-se o isolado bacteriano em teste. Foram preparadas 2 placas de cada combinação, que foram mantidas a 28° C por tempos variáveis, de acordo com a velocidade de crescimento do fungo. A avaliação foi feita quando a borda da colônia fúngica, pelo menos nas zonas distantes das influências bacterianas, ultrapassou a colônia da bactéria.

3.1.2 Teste com sementes de trigo

Este teste, empregando sementes de trigo, teve como objetivo observar o antagonismo pela produção de substâncias que degradam ou alteram a hifa fúngica. As sementes de trigo foram autoclavadas 3 vezes a 121°C por 30 minutos, dando um intervalo de 24 horas entre cada esterilização.

Foi utilizada uma placa velha de *Phytophthora parasitica* em meio cenoura (de 20 a 30 dias no mínimo), para que pudesse haver melhor indução na produção de esporos móveis por *Phytophthora* (zoósporos). Foi adicionada assepticamente água autoclavada suficiente para cobrir a superfície da colônia (10 mL de água para uma placa de aproximadamente 9 cm de diâmetro). A placa foi colocada na geladeira (8-10° C) por duas horas. Isto é necessário para que ocorra indução de produção de zoósporos (esporos flagelados) pelos esporângios. Os esporângios são produzidos em meio de cultura a medida que há uma depleção de nutrientes no meio, por isso devem ser usadas placas velhas.

A placa foi retirada da geladeira e deixada à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos para que a divisão nuclear e produção dos zoósporos ocorressem. Depois desse tempo os zoósporos perdem o flagelo e a mobilidade e não ficam facilmente em suspensão.

Foi preparado um meio líquido (200 g de cenoura/ litro de meio de cultura) e autoclavado por 20 minutos a 121° C. Adicionou-se 1 mL da suspensão de esporos no meio líquido após 30 minutos da retirada das placas da geladeira. Incubou-se a 25° C por quatro dias e observou-se o crescimento micelial. Aos

frascos de sementes foi adicionado o conteúdo do frasco (Erlenmeyer) com micélio de *Phytophthora* até o meio e o micélio atingirem metade do volume das sementes. Incubou-se à temperatura de 30°C por 12 dias. As sementes ficaram recobertas pelo micélio de *Phytophthora*.

As bactérias, os mesmos 69 isolados de *Pseudomonas* sp, foram crescidas no meio B de King e após 24 horas (fase logarítmica) foram utilizadas.

As sementes com micélio de *Phytophthora* foram desagregadas e selecionadas. Foram colocadas 20 sementes por frasco de bactéria (Erlenmeyer) e deixadas por 20 minutos imersas na suspensão bacteriana. Isto é necessário para que ocorra uma embebição das sementes com as bactérias. As sementes foram então retiradas e acondicionadas em placas de Petri previamente autoclavadas e com papel de filtro. Para manter a umidade, foram deixados dois papéis de filtro no fundo de cada placa. Acondicionaram-se 20 sementes previamente tratadas com as bactérias em cada placa de Petri com o papel de filtro no fundo das mesmas. Após 7 dias foi avaliada a alteração do micélio nas testemunhas e nos tratamentos (estirpes bacterianas) sob microscópio óptico.

3.1.3 Teste de antagonismo *in vivo*

Realizaram-se dois experimentos inteiramente casualizados, com 3 repetições, em casa de vegetação, que visavam a confirmação de antagonismo a *Phytophthora parasitica* pelas bactérias empregadas nos testes *in vitro*. O primeiro experimento constou de 67 isolados de *Pseudomonas* e um de *Bacillus* e o segundo experimento, de 54 isolados de *Pseudomonas* e um de *Bacillus*. As sementes de limoeiro foram pré-germinadas em placas de Petri e após germinadas foram transferidas para vasos com areia esterilizada.

Para o primeiro experimento foram realizadas várias tentativas de estabelecimento do patógeno na raiz das plantas, empregando-se diferentes formas de inóculo: suspensão de zoósporos e/ou clamidosporos, palitos com crescimento micelial e presença de clamidosporos e discos de meio de cultura

com micélio, zoósporos e clamidosporos. Aos 45 dias foi avaliada somente a massa da matéria fresca da raiz.

Para o segundo experimento a inoculação do patógeno foi realizada com suspensão de zoósporos e/ou clamidosporos e discos de meio de cultura com micélio, zoósporos e clamidósporos. Foram avaliadas a massa da matéria fresca da raiz, a massa da matéria seca da parte aérea e a nota da severidade da doença, após 60 dias da inoculação de *P. parasitica*.

3.2 Experimentos em casa de vegetação

3.2.1 Experimento I- Interação de FMAs e agentes de controle biológico, em substrato inerte e seu efeito no controle de *P. parasitica*

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso e esquema fatorial 3x2x2: com ou sem FMA (*Glomus intraradices* com pré-colonização- GI pré ou *G. intraradices* sem a pré-colonização- GI), com ou sem os agentes de controle biológico (*Trichoderma harzianum*- TSS9 ou *Bacillus subtilis*) e com ou sem o patógeno (*Phytophthora parasitica*). As sementes de limoeiro cravo foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 0,5% por 10 minutos. A inoculação do FMA (*Glomus intraradices*- GI) foi feita na vermiculita esterilizada por ocasião da semeadura, obtendo-se as plântulas já colonizadas (pré-colonização). Após 4 meses estas plantas foram transferidas para vasos com areia autoclavada por 1 hora a 120° C. Neste momento também foi colocada uma suspensão dos agentes de controle biológico (*Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*), GI sem pré-colonização e ainda *Phytophthora parasitica*. Para o estabelecimento do patógeno na raiz das plantas, empregaram-se 2 diferentes formas de inóculo: suspensão de zoósporos e/ou clamidosporos e discos de meio de cultura com micélio, zoósporos e clamidosporos. Após 60 dias foram avaliados: nota visual da severidade da doença (0-5), colonização micorrízica, massa da matéria fresca e seca da parte aérea e massa da matéria fresca da raiz, como descrito posteriormente.

3.2.2 Experimento II- Interação de FMAs e agentes de controle biológico e seu efeito no controle de *P. parasitica*.

Instalou-se um experimento em delineamento experimental inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 3 x 3 x 2, com os seguintes fatores: 2 agentes de controle biológico (*Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*) e um controle (sem agente) X 2 FMAs (*Glomus intraradices* e *Glomus etunicatum*) e uma testemunha (sem FMA) X com e sem *Phytophthora parasitica*. Além desses tratamentos do fatorial variou-se a fase de inoculação dos microrganismos envolvidos, da seguinte forma: FMA + agente de controle biológico ao mesmo tempo; 1º FMA, depois agente de controle biológico; 1º agente de controle biológico depois FMA. Foram realizadas 7 repetições.

As sementes de limoeiro cravo foram pré-germinadas em bandejas contendo areia esterilizada e após germinadas foram transferidas para vasos com substrato esterilizado. O substrato utilizado foi 75% e solo (Latosolo roxo) e 25% de areia fumigados com Brometo de Metila por 3 dias consecutivos, cujas análises de fertilidade constam da Tabela 1.

Tabela 1. Características do substrato solo (75%) e areia (25%).

Determinações	SOLO
Mat. orgânica g/dm ³	18
Solução CaCl ₂ (pH)	6,7
Fósforo resina mg/dm ³	93
Potássio mmol _c /dm ³	5,8
Cálcio mmol _c /dm ³	68
Magnésio mmol _c /dm ³	25
Ac. Potencial (H+Al) mmol _c /dm ³	13
Soma Bases mmol _c /dm ³	98,8
CTC mmol _c /dm ³	112,1
Sat. bases (V) %	88

O *Trichoderma* no meio de cultura com aveia foi incubado a 28° C durante sete dias. O fungo foi obtido a partir de uma suspensão dos esporos. Após esse período, 50 mL da suspensão de *Trichoderma* foram colocados na porção mediana do vaso, onde ficaria a maior concentração de radículas de plântulas.

Para obtenção do isolado bacteriano, esse foi cultivado em meio líquido B de King e incubado por 48 horas. Foram retirados 3 mL do meio com a bactéria e colocados próximo à raiz da planta.

Para a obtenção de *P. parasitica* as placas com o fungo foram deixadas por 7 dias com luz e temperatura constantes. Foi adicionada água nas placas e estas foram colocadas por 3 horas na geladeira e 30 minutos na temperatura ambiente, para que ocorresse indução e liberação de zoósporos após o choque térmico. Esta suspensão foi retirada e foram colocados 10mL por vaso próximos às raízes das plantas. Como não ocorreu o estabelecimento da doença após 5 tentativas, o patógeno foi inoculado de outras maneiras: suspensão de zoósporos e/ou clamidosporos, palitos com micélio e clamidosporos e discos de meio com micélio e clamidosporos.

Os inóculos dos FMAs empregados foram: *Glomus etunicatum* (4800 esporos por planta) e *Glomus intraradices* (1750 esporos por planta + raiz).

Os FMAs e os agentes de controle biológico foram inoculados no substrato ao mesmo tempo ou agentes de controle biológico foram colocados antes do FMA ou ainda FMA antes dos agentes de controle biológico, por ocasião do transplante da plântula, enquanto o fitopatógeno foi inoculado posteriormente.

Após 10 meses da inoculação do FMA, finalizou-se o experimento analisando-se as seguintes variáveis: altura da planta, massa da matéria fresca da raiz, estabelecimento da doença, colonização micorrízica, massa da matéria fresca e seca da parte aérea e teor de P na parte aérea. A parte aérea da planta foi cortada no colo e seca em estufa até massa constante para determinação da massa da matéria seca. Posteriormente foi moída para determinação do teor de P (Bataglia). O sistema radicular foi lavado, pesado e avaliado quanto à podridão causada por *Phytophthora* dando-se notas crescentes de 0 a 5 em função do grau de severidade da doença. O sistema radicular foi acondicionado em álcool 50%

para posterior coloração e determinação da porcentagem de colonização radicular pelo método da lâmina contendo dez segmentos de raiz (Giovanetti & Mosse, 1980) coloridas com trypan blue (Phillips & Hayman, 1970).

3.2.3 Experimento III- Efeito do substrato na interação de FMA e *Trichoderma* e no controle de *P. parasítica*

Instalou-se um experimento com delineamento inteiramente ao acaso e esquema fatorial 2 x 2 x 2 x 3 com os seguintes fatores: com e sem *Trichoderma harzianum* X com e sem *Glomus intraradices* X com e sem *Phytophthora parasítica* X 3 substratos (adição de 2 tipos de matéria orgânica e sem adição de matéria orgânica). Os substratos utilizados foram: solo e areia esterilizados (9:1), 15% Plantmax e 85% de solo e areia, 15% esterco e 85% de solo e areia, cujas análises de fertilidade constam da Tabela 2.

Tabela 2. Características do substrato solo e areia (9:1) e dos substratos com 15% de plantmax e 15% de esterco.

Determinações	SOLO	PLANTMAX	ESTERCO
Mat. orgânica g/dm ³	21	34	25
Solução CaCl ₂ (pH)	6,8	6,5	6,9
Fósforo resina mg/dm ³	67	81	117
Potássio mmol _c /dm ³	2,2	3,2	13,1
Cálcio mmol _c /dm ³	65	78	71
Magnésio mmol _c /dm ³	8	15	13
Ac. Potencial (H+Al) mmol _c /dm ³	12	16	11
Soma Bases mmol _c /dm ³	75,2	96,2	97,1
CTC mmol _c /dm ³	87,2	112,6	107,9
Sat. bases (V) %	86	85	90

O FMA foi previamente multiplicado em *Brachiaria bizantha* e o inóculo constava de hifas, raízes com 65% de colonização e esporos. A técnica utilizada

para quantificação de esporos foi a do peneiramento úmido (Gerdeemann & Nicolson, 1963). Para a estimativa da colonização radicular pelo *Glomus intraradices* foi empregado o método da lâmina com pedaços de raiz (Giovanetti & Mosse, 1980) após coloração das raízes com trypan-blue (Phillips & Hayman, 1970).

As sementes de limoeiro cravo foram tratadas com hipoclorito de sódio 0,5% por 10 minutos e semeadas em bandejas de isopor com vermiculita esterilizada, com a inoculação concomitante do FMA. Após 140 dias, as plantas foram transferidas para vasos de 2Kg, contendo os diferentes substratos. Após 40 dias, inoculou-se uma suspensão de esporos de *Trichoderma* ($2,4 \times 10^7$ /mL- foram colocados 20mL/vaso) e após 20 dias houve a inoculação de *Phytophthora parasitica* (suspensão de zoósporos e/ou clamidosporos e discos de meio com micélio e clamidosporos).

Aos 110 dias após transplântio da plântula, avaliou-se o experimento, analisando as variáveis: altura da planta, massa da matéria fresca e seca da parte aérea, massa da matéria fresca da raiz, estabelecimento da doença, colonização micorrízica, teor de P na parte aérea e atividade enzimática na raiz. Para isso foi feita a separação da parte aérea, no colo da planta, a qual foi seca em estufa até peso constante para determinação da massa da matéria seca. O sistema radicular foi acondicionado em álcool 50% para posterior coloração e determinação da porcentagem de colonização radicular (Vierheilig et al., 1998). A nota da severidade da doença foi realizada através da avaliação visual.

3.3 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa SANEST, através da análise da variância e teste de Tukey para as médias. As notas de severidade da doença foram transformadas em $\sqrt{x}+0,5$ e a colonização micorrízica em arco seno da raiz de $x/100$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção *in vitro* de bactérias antagonicas a *Phytophthora parasitica*.

Uma das principais doenças de plantas cítricas é a podridão de raiz causada por *Phytophthora parasitica*, que pode ocorrer desde a fase da sementeira até na planta adulta. O gênero *Pseudomonas* está sendo apontado como antagonista eficiente para este patógeno. Evidências indicam que o efeito no crescimento das plantas provocado pelas bactérias resulta da inibição ou alteração da microbiota normal da rizosfera, através da produção de sideróforos ou de substâncias com efeito antagônico, que desempenham possível papel no biocontrole de patógenos de plantas (Schroth & Hancock, 1981).

O teste de antagonismo realizado empregando-se o meio B de King para observação do efeito devido à produção de sideróforos e/ou compostos fungicidas e/ou fungistáticos mostrou que 69% dos isolados de *Pseudomonas* sp. foram antagonicos a *Phytophthora parasitica* (Tabela 3, Figura 1).

O fator mais estreitamente relacionado com a ação das bactérias benéficas é a produção de um sideróforo difusível que forma quelatos com o ferro e funciona como um composto biostático, reduzindo a forma disponível deste nutriente para a microbiota da raiz (Kloepper et al., 1980; Leong, 1986). É sabido que *Pseudomonas* spp. produz sideróforos que poderiam, inclusive, afetar a nutrição em ferro das plantas, pelo aumento na sua disponibilidade (Freitas et al., 1994).

Outro teste de antagonismo realizado, empregando o meio de cenoura, propício para o crescimento do patógeno, mostrou que 21% dos isolados bacterianos foram antagônicos, devido à produção de compostos fungicidas e/ou fungistáticos (Tabela 3, Figura 1), já que nesse meio não há produção de sideróforo, devido à presença de Fe disponível. Todos os isolados que foram antagônicos no meio de cenoura também o foram no meio B de King, demonstrando que estes isolados 47A, 47B, 52B, 53A, S2-1, NS3, 80, 73, I1, I5, I6, I7, A4, A5 e A6 atuaram pela produção de sideróforo e liberação de compostos com caráter fungicida e/ou fungistático.

Figura 1- Antagonismo de um isolado de *Pseudomonas* sp a *P. parasitica* em meio de King e cenoura. **A**: testemunha; **B**: isolado bacteriano 53A

No teste realizado, empregando-se semente de trigo, para observar a degradação e/ou alteração nas hifas do patógeno, constatou-se que 26% dos isolados bacterianos foram antagônicos a *Phytophthora parasitica* (Tabela 3), conforme ilustrado na Figura 2, que ilustra as alterações ocorridas na hifa do patógeno, tais como vacuolização e desintegração da hifa de *Phytophthora*, em decorrência do antagonismo exercido por alguns isolados bacterianos. Os isolados

bacterianos 52B, I5, I6, I7, 73 e A5 mostraram antagonismo ao patógeno nos três testes realizados. Isto significa que esses isolados agem por produção de sideróforo e de alguma substância de efeito antagônico (fungicida e/ou fungistático) que causa alteração na parede das hifas do fungo patogênico. A produção de antibióticos *in vitro* por bactérias (*Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Flavobacterium* sp. e *Pseudomonas* spp.) antagônicas a espécies de *Phytophthora* é reconhecida e está envolvida na iniciação de lise das hifas desse patógeno (Sarbin & Kommedahl, 1977).

Tabela 3. Teste de antagonismo de 69 isolados bacterianos de *Pseudomonas* spp do grupo fluorescente a *Phytophthora parasitica*, em meio B de King, meio cenoura (2 repetições) e utilizando sementes de trigo.

Isolados bacterianos	Meio B de King	Meio Cenoura	Semente de trigo	Isolados bacterianos	Meio B de King	Meio Cenoura	Semente de trigo
45A	+ / +	- / -	-	80S	+ / +	- / -	+
45B	- / +	- / -	-	W4F164	- / -	- / -	-
45C	+ / +	- / -	-	W4P144	+ / +	- / -	-
46	+ / +	- / -	+	W4F111	- / +	- / -	-
47A	+ / +	+ / +	-	W4P5	+ / +	- / -	-
47B	+ / +	+ / +	-	W4F58	- / +	- / -	-
47C	+ / +	- / -	-	S1-1	- / -	- / -	+
47D	+ / +	- / -	-	S1-2	- / -	- / -	-
51A	+ / +	- / -	-	S1-3	- / -	- / -	-
51B	+ / +	- / -	-	S2-1	+ / +	+ / +	-
52A	+ / +	- / -	-	S2-2	- / +	- / -	-
52B	+ / +	+ / +	+	S2-3	+ / +	- / -	-
53A	+ / +	+ / +	-	S2-4	- / +	- / -	-
53C	+ / +	- / -	-	S2-5	+ / +	+ / -	+
54B	+ / +	- / -	-	NS1	+ / +	- / -	+
54C	+ / +	- / -	+	NS2	+ / +	- / -	-
34C	+ / +	- / -	-	NS3	+ / +	+ / +	-
80	+ / +	+ / +	-	I1	+ / +	+ / +	-
85	- / -	- / -	-	I2	+ / +	- / -	+
44A	+ / +	- / -	-	I3	+ / +	+ / -	-
60A	+ / +	- / -	-	I4	- / -	- / -	-
60B	- / -	- / -	-	I5	+ / +	+ / +	+
62	- / +	- / -	-	I6	+ / +	+ / +	+
63	+ / +	- / -	-	I7	+ / +	+ / +	+
65A	+ / +	- / -	+	I8	- / -	- / -	+
66B	+ / +	- / -	+	I9	+ / +	+ / -	-
70	+ / +	- / -	-	A1	+ / +	- / -	-
71	- / +	- / -	-	A2	- / -	- / -	-
72	- / -	- / -	-	A3	+ / -	- / -	-
73	+ / +	+ / +	+	A4	+ / +	+ / +	-
74	- / +	- / -	+	A5	+ / +	+ / +	+
76	+ / +	- / -	+	A6	+ / +	+ / +	-
77	+ / +	- / -	-	A7	+ / +	- / -	-
91	- / -	- / -	-	136RM	- / -	- / -	-
92	+ / +	- / -	-				

Meio B de King e cenoura: + presença de inibição; - ausência de inibição.

Sementes de trigo: + presença de alteração na hifa; - ausência de alteração na hifa.

Figura 2- Teste com sementes de trigo. Observação sob microscópio óptico (40x).
A: testemunha; **B:** isolado A5

Em virtude da expressiva comunidade no solo, as bactérias constituem um significativo componente microbiano influenciando os propágulos de *Phytophthora* spp. nesse ambiente (Baker & Cook, 1974). Muitas pesquisas têm observado bactérias colonizando intensivamente a hifa desse patógeno. Por microscopia de luz e eletrônica da interface solo-hifa de *P. cinnamomi*, Malajczuk (1983), visualizou o estabelecimento de bactérias sobre as hifas em solo não esterilizado, observando-se a formação de microcolônias de 5 a 40 células bacterianas junto às hifas do fungo, ou seja, na hifosfera.

A atração das bactérias pelas hifas parece ser uma resposta quimiostática, promovida pela exsudação de substâncias das hifas do patógeno, que estimulam as populações desses antagonistas na rizosfera (Nesbitt et al., 1981). Estes mesmos autores já demonstraram a translocação de exsudatos de fenilalanina e glucose por hifas de *P. cinnamomi* que podem servir como atraente quimiostático e/ou substrato metabólico para as bactérias.

4.2 Seleção *in vivo* de bactérias antagonicas a *P. parasitica*

A Tabela 4 mostra a massa da matéria fresca da raiz das plantas na presença de diferentes isolados de *Pseudomonas* sp e um isolado de *Bacillus subtilis* para avaliação de antagonismo à *P. parasitica in vivo*. A testemunha apresentou menor massa da matéria fresca de raiz quando o patógeno foi inoculado, indicando que sua virulência estava adequada. A maioria dos isolados bacterianos, 78%, mostrou um certo controle do patógeno, já que a massa de suas raízes não foi afetado na presença de *P. parasitica*. Apesar de não ter sido avaliado o controle da doença, através de notas ou de outra forma, a massa da raiz pode ser um bom indicativo do controle oferecido pela rizobactéria, pois o patógeno causa a podridão de raiz, o que, geralmente, é acompanhada de diminuição no sistema radicular (Cordier et al., 1996). Para Azcón-Aguilar et al. (1996) o efeito das rizobactérias promotoras do crescimento de planta (RPCP) pode ser deletério ou pode ser benéfico, promovendo o crescimento da planta por vários mecanismos. A significância ecológica de RPCP têm sido intensivamente estudada devido seu papel no controle biológico de patógenos de planta. Esses efeitos são principalmente devido à capacidade dessas bactérias de colonizar o solo rizosférico e diminuir as populações de organismos deletérios. Um dos melhores exemplos de tais bactérias são as *Pseudomonas*, altamente eficientes no controle biológico de patógenos do solo (Hoitink & Boehm, 1999).

Tabela 4. Massa da matéria fresca da raiz (g) das plantas de limoeiro Cravo, inoculados 67 isolados de *Pseudomonas* sp e um isolado de *Bacillus subtilis* inoculado ou não com *Phytophthora parasitica* (Phy). (Médias de 3 repetições).

Isolados bacterianos	Com Phy	Sem Phy	Isolados bacterianos	Com Phy	Sem Phy
Test.	1,49b	2,85a	66B	0,70a	1,14a
45A	0,96b	2,29a	70	0,86a	1,44a
47A	1,15b	2,11a	72	1,38a	1,28a
54C	1,73b	2,85a	73	1,04a	0,95a
58	1,01b	2,31a	74	1,90a	2,22a
85	1,53b	2,95a	76	1,37a	1,12a
60A	0,84b	2,23a	77	0,96a	1,61a
71	1,03b	2,20a	91	1,13a	1,49a
S1-2	1,11b	2,13a	92	1,12a	1,05a
S2-4	1,03b	2,23a	80S	1,10a	1,39a
NS1	1,17b	2,33a	W4P144	1,80a	1,81a
I3	0,88b	2,22a	W4P111	1,46a	0,62a
I4	0,77b	2,60a	S1-1	0,95a	1,05a
I6	1,05b	2,95a	S1-3	1,31a	2,17a
W4P5	0,51b	1,44a	S2-1	1,06a	1,44a
W4F164	0,60b	1,66a	S2-3	1,41a	1,38a
45B	1,33a	1,82a	S2-5	1,45a	0,98a
45C	0,64a	1,37a	NS2	1,40a	2,09a
46	1,24a	1,18a	NS3	1,23a	1,34a
47B	1,04a	1,36a	I1	1,51a	1,81a
47C	0,76a	1,64a	I2	0,94a	1,38a
47D	2,16a	1,57a	I5	1,42a	2,07a
51A	1,51a	2,16a	I8	1,49a	2,21a
51B	1,72a	2,11a	I9	0,85a	1,58a
52A	1,33a	1,32a	A1	1,53a	2,36a
52B	0,97a	1,05a	A2	1,04a	1,16a
53A	0,85a	1,32a	A3	1,12a	1,87a
53C	1,28a	1,29a	A4	1,56a	1,33a
54B	1,15a	1,34a	A6	1,24a	2,05a
34C	1,19a	1,45a	A7	1,38a	1,50a
80	1,46a	1,90a	136RM	0,76a	1,29a
44A	1,59a	1,15a	44B	0,69a	1,14a
62	1,34a	1,76a	41B	0,64a	0,86a
63	0,71a	1,00a	0G(<i>Bacillus</i>)	1,40a	1,47a
65A	1,53a	2,20a			

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%, na comparação na linha (com e sem *Phytophthora parasitica*).

O Tabela 5 mostra a massa da matéria fresca da raiz das plantas do segundo experimento na presença de 54 isolados de *Pseudomonas* sp e um isolado de *Bacillus subtilis* para avaliação de antagonismo à *P. parasitica* *in vivo*.

Os isolados bacterianos 45A e I4 apresentaram maior massa da matéria fresca da raiz quando o patógeno foi inoculado, ou seja, não houve influência do patógeno. Já para os isolados bacterianos 60B e 73 houve influência negativa de *P. parasitica*, pois a massa da matéria fresca da raiz foi diminuída quando o patógeno foi inoculado.

Tabela 5. Massa da matéria fresca da raiz das plantas de limoeiro, inoculados 54 isolados de *Pseudomonas* sp e um isolado de *Bacillus subtilis* na presença ou ausência de *Phytophthora parasitica* (Phy). (Médias de 3 repetições).

Isolados bacterianos	Com Phy	Sem Phy	Isolados bacterianos	Com Phy	Sem Phy
-----g-----					
Test.	2,47a	2,43a	62	2,40a	2,90a
45A	1,20b	2,83a	63	2,23a	2,57a
47A	2,73a	3,40a	65A	2,33a	2,70a
54C	2,57a	1,70a	66B	2,63a	2,03a
W4F58	2,33a	3,07a	70	2,17a	2,50a
85	2,63a	2,13a	72	2,17a	1,90a
60A	2,17a	3,10a	73	2,40a	1,33b
71	2,40a	2,87a	74	2,07a	2,47a
60B	3,97a	2,70b	76	2,57a	2,47a
NS1	2,33a	2,67a	77	1,83a	2,37a
I3	2,33a	2,87a	91	2,70a	2,60a
I4	1,60b	2,87a	92	2,77a	3,23a
W4P5	2,17a	2,23a	W4P144	1,40a	2,43a
W4F164	2,20a	2,00a	W4P111	2,23a	2,77a
45B	2,33a	2,87a	S2-1	2,43a	3,40a
45C	2,43a	2,63a	NS2	2,10a	2,80a
46	1,90a	2,93a	NS3	2,30a	2,23a
47B	2,43a	2,90a	I1	2,40a	2,43a
47C	2,70a	1,93a	I5	1,57a	2,37a
47D	2,57a	2,83a	I8	2,00a	2,70a
51A	2,60a	2,27a	I9	2,10a	3,13a
51B	1,53a	2,17a	A1	2,13a	2,27a
53A	2,43a	2,50a	A2	2,67a	2,30a
53C	2,87a	2,27a	A3	2,03a	2,53a
54B	1,77a	2,57a	A6	2,33a	2,30a
34C	2,10a	1,37a	A7	2,77a	2,90a
80	2,50a	1,70a	136RM	2,10a	2,30a
44A	2,33a	2,80a	0G(<i>Bacillus</i>)	2,30a	2,57a

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%, na comparação na linha (com e sem *Phytophthora parasitica*).

Quando foram inoculados os isolados bacterianos W4P144 e W4F111 e *P. parasitica* (Tabela 6), a massa da matéria seca da parte aérea das plantas do limoeiro foi diminuída. O isolado 51A apresentou maior massa da matéria seca da parte aérea, demonstrando que não houve influência negativa do patógeno quando este foi inoculado, e ao contrário, houve um estímulo no crescimento da planta.

Tabela 6. Massa da matéria seca da parte aérea das plantas de limoeiro, inoculados 54 isolados de *Pseudomonas* sp e um isolado de *Bacillus subtilis* na presença ou ausência de *Phytophthora parasitica* (Phy). (Médias de 3 repetições).

Isolados bacterianos	Com Phy	Sem Phy	Isolados bacterianos	Com Phy	Sem Phy
-----g-----					
Test.	0,93a	0,87a	62	1,30a	1,47a
45A	0,57a	0,97a	63	1,30a	1,17a
47A	1,33a	1,63a	65A	1,27a	1,17a
54C	0,80a	0,77a	66B	1,57a	1,13a
W4F58	1,07a	1,63a	70	1,23a	1,10a
85	1,13a	1,13a	72	1,37a	1,13a
60A	1,67a	1,63a	73	1,20a	0,67a
71	1,40a	1,37a	74	1,20a	1,17a
60B	1,17a	1,23a	76	1,37a	0,83a
NS1	1,47a	1,17a	77	1,23a	0,90a
I3	1,20a	1,53a	91	1,57a	1,00a
I4	1,10a	1,20a	92	1,40a	1,53
W4P5	1,20a	0,87a	W4P144	0,63b	1,40a
W4F164	1,30a	1,33a	W4P111	0,93b	1,67a
45B	1,33a	1,20a	S2-1	1,30a	1,50a
45C	1,40a	1,20a	NS2	1,20a	1,30a
46	1,07a	1,40a	NS3	1,30a	0,90a
47B	1,23a	1,03a	I1	1,40a	1,13a
47C	1,13a	0,70a	I5	1,30a	1,17a
47D	1,60a	1,33a	I8	1,17a	1,27a
51A	1,50a	0,70b	I9	1,43a	1,43a
51B	0,93a	0,70a	A1	1,10a	1,07a
53A	1,57a	1,03a	A2	1,50a	1,27a
53C	1,33a	1,00a	A3	1,50a	1,37a
54B	0,97a	0,80a	A6	1,27a	1,17a
34C	0,67a	1,23a	A7	1,63a	1,47a
80	1,30a	0,77a	136RM	1,43a	1,00a
44A	1,30a	1,47a	0G(<i>Bacillus</i>)	1,30a	0,87a

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%, na comparação na linha (com e sem *Phytophthora parasitica*).

A testemunha apresentou maior nota de severidade de podridão radicular (Tabela 7) quando o patógeno foi inoculado, indicando que sua virulência estava adequada. A maioria dos isolados bacterianos, 86%, mostrou controle do patógeno. Os isolados bacterianos 46, 47B, 47D, 80, 44A, 65A, A3 e A6 mostraram que não são eficientes no controle de *Phytophthora parasitica* já que a nota da severidade da doença foi maior quando o patógeno foi inoculado.

Tabela 7. Notas (0-5) da severidade de podridão radicular causada por *P. parasitica* à raiz de limoeiro, quando inoculados 54 isolados de *Pseudomonas* sp e um isolado de *Bacillus subtilis*, na presença ou ausência de *Phytophthora parasitica* (Phy). (Médias de 3 repetições).

Isolados bacterianos	Com Phy	Sem Phy	Isolados bacterianos	Com Phy	Sem Phy
-----0-5-----					
Test.	2,9a	0b	62	0,2a	0a
45A	0a	0a	63	0,2a	0a
47A	0,2a	0a	65A	0,5a	0b
54C	0a	0a	66B	0a	0a
W4F58	0a	0a	70	0,2a	0a
85	0,2a	0a	72	0,2a	0,5a
60A	1,2a	0a	73	0a	0a
71	0,2a	0a	74	0,3a	0a
60B	0,3a	0a	76	0,2a	0a
NS1	0a	0a	77	0,2a	0a
I3	0,2a	0a	91	0a	0a
I4	0,5a	0,2a	92	0,2a	0a
W4P5	0,2a	0a	W4P144	0,2a	0a
W4F164	0a	0a	W4P111	0a	0a
45B	0a	0a	S2-1	0,2a	0a
45C	0,2a	0a	NS2	0a	0a
46	0,5a	0b	NS3	0a	0a
47B	0,5a	0b	I1	0a	0a
47C	0a	0a	I5	0,2a	0a
47D	0,5a	0b	I8	0a	0a
51A	0,3a	0a	I9	0a	0a
51B	0a	0,2a	A1	0,2a	0a
53A	0a	0a	A2	0a	0a
53C	0,3a	0a	A3	1,3a	0b
54B	0a	0a	A6	2,3a	0,3b
34C	0a	0a	A7	0,3a	0a
80	0,7a	0b	136RM	0a	0a
44A	1,2a	0b	0G(<i>Bacillus</i>)	0,2a	0a

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%, na comparação na linha (com e sem *Phytophthora parasitica*).

4.3 Interação de FMA e agentes de controle biológico, em substrato inerte e seu efeito no controle de *P. parasitica*.

O aumento da nutrição da planta tem conferido maior resistência a fatores bióticos e abióticos. Em algumas situações, uma melhor disponibilidade de nutrientes para as plantas micorrizadas pode compensar o ataque de patógenos nas raízes (Filion et al., 1999). A Tabela 8 mostra os resultados obtidos no experimento realizado em areia, em substrato inerte, em relação à severidade da doença. Os tratamentos não diferiram entre si com exceção da testemunha, mostrando que houve um certo controle da *Phytophthora* em todos os tratamentos realizados. Resultados semelhantes foram observados por Cordier et al. (1996) em plantas de tomate colonizadas por *Glomus mosseae*, nas quais houve decréscimo de podridão de raiz pelo patógeno *P. nicotinae* var. *parasitica*. A tolerância à doença, em plantas colonizadas por FMA, pode ser devido ao aumento da absorção de nutrientes, produção de antibióticos, exsudatos de raízes alterados e mudanças nas populações microbianas na rizosfera (Ahmed et al., 1999).

Tabela 8. Nota visual (0-5) da severidade de *P. parasitica* nas plantas de limoeiro Cravo, com colonização prévia (GI pré) ou no transplântio por *G. intraradices* (GI), sem ou com inoculação concomitante dos agentes de controle biológico *T. harzianum* e *B. subtilis* e testemunha, *Trichoderma* e *Bacillus*, empregando substrato inerte. (Médias de 3 repetições).

Tratamentos	Nota	
	Com Phy	Sem Phy
Testemunha	3,0a	0,0b
GI+Bac	0,16a	0,0a
Bac	0,16a	0,0a
GI	0,16a	0,0a
GIpré+Tri	0,16a	0,16a
GIpré+Bac	0,16a	0,0a
Gipré	0,16a	0,16a
Tri	0,0a	0,0a
GI+Tri	0,0a	0,0a

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Comparação dos tratamentos com e sem *Phytophthora* (linha).

A presença de *T. harzianum* também reduziu significativamente a podridão de raiz causada por *Phytophthora capsici* em plantas de pimentão. Tal redução parece estar relatada à diminuição na densidade da população de *P. capsici* no substrato ou, talvez, às alterações causadas por *T. harzianum* nas hifas de *P. capsici*, como observadas *in vitro*: rápida colonização no meio por *Trichoderma* que cresceu sobre o micélio de *Phytophthora*; inibição do crescimento de *Phytophthora*; hifa de *Trichoderma* ao redor de *Phytophthora*; vacuolização e desintegração da hifa de *Phytophthora* e produção de esporângio por *Phytophthora*. A estimulação da produção de esporângio por *P. capsici* na presença de *T. harzianum* observado no meio de cultura é associado com a inibição do crescimento vegetativo de *P. capsici* (Ahmed et al., 1999). Alterações na morfologia da hifa de *P. parasitica* causada pelo efeito antagônico de *T.*

harzianum também foram observadas no presente estudo, em testes *in vitro* (Figura 3). Para Calvet et al. (1993) os mecanismos de ação podem ser baseados na antibiose e micoparasitismo. Também houve interação do fungo *Phytophthora* com a bactéria *Bacillus*, sendo que a bactéria destruiu a parede das hifas do fungo (Figura 4).

Figura 3- Interação *Trichoderma* x *Phytophthora parasitica*, mostrando alteração na morfologia da hifa do patógeno. Aumento de 250x. **A:** testemunha; **B:** alteração.

Figura 4- Interação *Bacillus* x *Phytophthora*. Alteração na parede da hifa fúngica pela bactéria, observada sob microscópio óptico (aumento 400x). **A:** testemunha; **B:** alteração.

Com relação à colonização micorrízica (Tabela 9), observou-se que as plantas com o fungo micorrízico *G. intraradices* pré colonizado apresentaram maior colonização, mas não houve diferença das plantas de limoeiro cravo com ou sem a inoculação de *Phytophthora*. Já na plantas com *G. intraradices* sem a pré inoculação houve influência do patógeno, diminuindo a porcentagem da colonização micorrízica. Cordier et al. (1996) mostraram que o desenvolvimento de *Phytophthora* foi reduzido no tratamento com fungo micorrízico arbuscular e que o patógeno não penetra nas células contendo arbúsculos. Isto quer dizer que ocorre competição localizada e mesmo na ausência da resistência sistêmica, a resistência pode ser ainda induzida a alguma distância do tecido colonizado pelo fungo micorrízico arbuscular.

No tratamento GI pré+ Tri houve maior colonização radicular com o patógeno. A colonização radicular nas plantas sem patógeno foi significativamente maior quando realizada a inoculação prévia do FMA (GI pré), superando significativamente a inoculação do fungo no transplantio (GI). O *Trichoderma* diminuiu significativamente a colonização do FMA, quando este foi inoculado no transplantio, demonstrando que houve um efeito direto do *Trichoderma* sobre os propágulos do FMA já que foram inoculados ao mesmo tempo no substrato. A literatura mostra diferentes possibilidades de interação entre esses dois fungos. Para Calvet et al. (1993), a inoculação prévia de *T. aureoviride* e *G. mosseae* aumentou a porcentagem de colonização radicular. Já Fracchia et al. (1998) constataram que a interação entre FMA e fungo saprofítico pode diferir entre espécies do mesmo gênero. *Trichoderma pseudokoningii* aumentou a porcentagem de colonização do FMA em plantas de soja, enquanto que *T. harzianum* não afetou o FMA. Entretanto, *Glomus mosseae* aumentou a população de *T. pseudokoningii* mas diminuiu a população de *T. harzianum*. Para Wyss et al. (1992) os dois agentes de controle biológico, *T. harzianum* e *S. griseoviridis*, reduziram o grau de micorrização significativamente. Godeas et al. (1999) observaram que o fungo saprofítico aumentou a colonização micorrízica arbuscular em plantas de soja.

Nas plantas com inoculação do patógeno houve significativa redução na colonização quando o FMA foi inoculado no transplântio da plântula, em relação à inoculação prévia do fungo micorrízico. A inoculação dos agentes de controle biológico preveniu uma redução ainda maior, como a ocorrida no tratamento somente com GI (Tabela 9). Esse resultado ressalta a importância da precocidade da colonização radicular pelo FMA, como forma de aumentar a resistência da planta ao patógeno. Além disso, também sugere que possa haver algum efeito direto de *P. parasitica* sobre os propágulos do FMA.

Tabela 9. Colonização micorrízica das plantas de limoeiro Cravo, com colonização prévia (GI pré) ou após o transplântio por *Glomus intraradices* (GI), sem ou com inoculação concomitante dos agentes de controle biológico *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*, com ou sem *Phytophthora* (Phy), empregando substrato inerte (Médias de 3 repetições).

Tratamentos	Colonização micorrízica (%)	
	Com Phy	Sem Phy
GI	3,8bD	58,4aB
GI+Tri	60,7aBC	67,1aAB
GI+Bac	56,0aC	62,0aB
GIpré	88,5aA	82,8aA
GIpré+Tri	87,3aA	65,4bB
GIpré+Bac	75,7aAB	68,9aAB

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letra minúscula- comparação dentro de cada tratamento comparando com e sem patógeno (linha). Letra maiúscula- comparação entre tratamentos na coluna.

As plantas colonizadas por *G. intraradices* e onde foi inoculado *Bacillus* apresentaram maior massa da matéria seca da parte aérea (Tabela 10), quando na presença do patógeno. Assim, *Bacillus*, além de diminuir a severidade da doença (Tabela 8), também causou certo estímulo no crescimento da planta. Os

diferentes tratamentos não diferiram entre si nas plantas sem o patógeno. Entretanto, naquelas onde foi inoculado o patógeno, a produção de matéria seca foi significativamente reduzida nos tratamentos Tri, Gl+Bac e na testemunha, em relação ao tratamento onde houve inoculação de *Bacillus*. Segundo Calvet et al. (1993) a inoculação combinada de *T. aureoviride* e *G. mosseae* teve um efeito sinérgico no desenvolvimento do trevo, o que, entretanto, não ocorreu no presente experimento.

O patógeno não reduziu a produção de matéria seca da parte aérea tanto nas plantas micorrizadas como nas não micorrizadas. Esse resultado discorda de Trotta et al. (1996), no qual o tratamento com *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* resultou em uma visível redução na massa da matéria seca das plantas e necrose das raízes em plantas sem micorriza. Para Cordier et al. (1996) o patógeno não teve efeito no desenvolvimento das plantas de tomate pré colonizadas por *G. mosseae*.

A redução da podridão da raiz pode não estar relacionada ao estímulo no crescimento da planta, como observado no presente experimento. Nas condições experimentais não houve efeito do FMA e nem do *Trichoderma*, somente do *Bacillus*. Ahmed et al. (1999) observaram que as plantas com *P. capsici* e *T. harzianum* obtiveram menor crescimento do que as plantas não inoculadas. Isto sugere que *T. harzianum*, enquanto reduziu a podridão de raiz de *P. capsici*, poderia não promover o crescimento da planta.

As plantas dos tratamentos com Gl pré, Gl pré + Tri e Gl pré + Bac apresentaram maior massa da matéria fresca da raiz (Tabela 9) do que as plantas com o fungo micorrízico inoculado concomitantemente com os agentes de controle biológico. Houve diferença estatística entre as plantas com a presença ou não do patógeno nos tratamentos Gl pré e Tri. Para o primeiro, as plantas sem *Phytophthora* apresentaram maior massa da raiz do que as plantas com o patógeno, ou seja, a colonização precoce do FMA estimulou o crescimento do sistema radicular, o qual, entretanto, foi reduzido pelo patógeno, apesar da severidade da doença ter sido pequena (Tabela 8). Já para as plantas onde houve

inoculação de *Trichoderma* na presença de *Phytophthora* a massa da matéria fresca da raiz foi maior.

Tabela 10. Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e massa da matéria fresca da raiz (MMFR) das plantas de limoeiro Cravo, com colonização prévia (GI pré) ou no transplantio por *Glomus intraradices* (GI), sem ou com inoculação concomitante dos agentes de controle biológico *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* e testemunha, *Trichoderma* e *Bacillus*, empregando substrato inerte (Médias de 3 repetições).

Tratamentos	MMSPA		MMFR	
	Com Phy	Sem Phy	Com Phy	Sem Phy
Bac	0,50aA	0,37bA	0,80aA	0,80aA
Gipré	0,27aAB	0,27aA	0,97bA	1,23aA
Glpré+Bac	0,30aAB	0,30aA	1,20aA	1,03aA
Tri	0,20aB	0,13aA	0,87aA	0,47bA
Glpré+Tri	0,23aAB	0,27aA	1,00aA	1,13aA
Testem.	0,13aB	0,13aA	0,63aA	0,60aA
GI+Bac	0,17aB	0,20aA	0,50aA	0,60aA
GI+Tri	0,23aAB	0,27aA	0,43aA	0,67aA
GI	0,30aAB	0,20bA	0,40aA	0,53aA

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letra minúscula- comparação dentro de cada tratamento entre com e sem patógeno (linha). Letra maiúscula- comparação entre tratamentos na coluna.

4.4 Interação de FMAs e agentes de controle biológico e seu efeito no controle de *P. parasitica*.

Em relação ao experimento que avaliou o efeito das interações, observou-se que a altura (Tabela 11) das plantas micorrizadas foi significativamente superior a das não micorrizadas, quando os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) foram inoculados sozinhos, ao mesmo tempo que os agentes de controle biológico ou ainda anteriormente aos agentes. Quando os agentes de controle biológico foram inoculados anteriormente aos FMAs o crescimento da planta foi menor. Segundo McAllister et al. (1994), o decréscimo no crescimento da planta causado pelo fungo saprofítico pode ser uma consequência direta da ação destes fungos sobre as raízes colonizadas por FMA ou sobre os propágulos do fungo micorrízico, o que somente aconteceu quando o fungo saprofítico foi inoculado antes ou ao mesmo tempo que o FMA. Substâncias solúveis e voláteis produzidas por fungos saprofíticos estão envolvidas na inibição da germinação de esporos. Para Vázquez et al. (2000) a colonização por fungo micorrízico arbuscular eliminou o efeito positivo causado por *Trichoderma* no crescimento da planta.

Tabela 11. Altura (cm) das plantas de limoeiro Cravo, aos 175 dias após transplântio sem ou com colonização por *Glomus etunicatum* ou *Glomus intraradices*, sem ou com inoculação concomitante, anterior ou posterior dos agentes de controle biológico *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* (Médias de 10 repetições).

Tratamentos	Altura
<i>G. etunicatum</i> + <i>Bacillus</i>	43,85a
<i>G. etunicatum</i> + <i>Trichoderma</i>	42,20a
<i>G. intraradices</i>	41,65a
<i>G. intraradices</i> + <i>Trichoderma</i>	41,05a
1º <i>G. intraradices</i> / <i>Trichoderma</i>	39,40ab
<i>G. etunicatum</i>	37,15abc
1º <i>G. etunicatum</i> / <i>Trichoderma</i>	36,85abc
<i>G. intraradices</i> + <i>Bacillus</i>	36,05abc
1º <i>G. intraradices</i> / <i>Bacillus</i>	34,25abcd
1º <i>Bacillus</i> / <i>G. intraradices</i>	34,05abcd
1º <i>G. etunicatum</i> / <i>Bacillus</i>	29,70bcd
1º <i>Trichoderma</i> / <i>G. intraradices</i>	26,90cd
1º <i>Trichoderma</i> / <i>G. etunicatum</i>	26,40cd
1º <i>Bacillus</i> / <i>G. etunicatum</i>	23,85d
Testemunha	11,40e
<i>Trichoderma</i>	10,15e
<i>Bacillus</i>	9,05e

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A inoculação de *Bacillus subtilis* não diferiu da testemunha absoluta, apesar de supostamente ser uma rizobactéria promotora de crescimento de planta. A partir dos 65 dias após o transplântio, os tratamentos aplicados começaram a influenciar de forma diferente no crescimento das plantas, mostrando que as plantas colonizadas com ambos os FMA's tiveram maior desenvolvimento, quando inoculados sozinhos ou concomitante com os agentes de controle biológico.

Dez meses após transplântio as plantas foram colhidas e avaliou-se também o aparecimento do patógeno. Com relação a massa da matéria seca da parte aérea (Tabela 12), não houve diferença significativa das épocas de inoculação tanto para *G. intraradices* como *G. etunicatum* e nem na presença ou não de *Phytophthora parasitica*. As plantas não micorrizadas diferiram significativamente das micorrizadas, apresentando-se 10 vezes menores. Quando se inoculou GI anteriormente a *Trichoderma*, este FMA foi mais eficiente do que GE, o mesmo ocorrendo quando foi inoculado *Bacillus* anteriormente, nos tratamentos sem inoculação de *Phytophthora*.

Houve uma melhor resposta da planta quando GI foi inoculado ao mesmo tempo com *Trichoderma* (Tri) e ainda com o fungo patogênico (Tabela 12). Colocando GI anteriormente a *Trichoderma* no tratamento sem *Phytophthora* (Phy) a produção de matéria seca das plantas foi maior. Já para os tratamentos 1º Tri/GI, GI+Tri e GI+Bac o tratamento com *Phytophthora* foi maior, concluindo-se que pode ter havido um controle do patógeno.

Juntamente com o patógeno o melhor tratamento foi *G. etunicatum*. Também houve melhor resposta quando a inoculação do FMA foi conjunta ao agente de controle biológico. Inoculando-se primeiro o GE e depois a bactéria, o tratamento sem patógeno foi significativamente maior, mostrando que há influência do patógeno nesse tratamento (Tabela 12). Já os tratamentos GE, 1ºBac/GE, 1ºGE/Tri, GI+Tri e GI+Bac e com a presença do patógeno foram melhores, ou seja, estes tratamentos não foram influenciados negativamente pelo patógeno.

Quanto à massa da matéria fresca da raiz (Tabela 12) o tratamento com GI foi melhor quando comparado às médias de GE. Com o patógeno, os tratamentos com FMA em conjunto com *Trichoderma* foram melhores, mostrando que pode haver um bom controle de FMA juntamente com *Trichoderma*. Já a testemunha e as plantas com *Bacillus* e *Trichoderma* tiveram suas raízes com massa da matéria fresca significativamente inferiores. As plantas colonizadas por GI não diferiram significativamente quando se comparou ausência e presença de *Phytophthora*. Já para GE, o tratamento 1º GE/Bac mostrou maior massa da matéria fresca da raiz

no tratamento sem o patógeno, ou seja houve influência do patógeno diminuindo a massa da matéria fresca da raiz. GE+Tri, 1º GE/Tri e 1ºBac/GE foram tratamentos que resistiram ao patógeno, já que a massa da matéria fresca das raízes foram significativamente maiores com a *Phytophthora* do que sem o patógeno. Comparando-se com e sem patógeno, a massa da matéria fresca das raízes do tratamento 1ºBac/FMA, foi maior sem Phy, enquanto que 1º FMA/Bac foi o oposto.

Tabela 12. Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e massa da matéria fresca da raiz (MMFR) das plantas de limoeiro cravo colonizadas por *Glomus etunicatum* (GE) ou *Glomus intraradices* (GI) com inoculação concomitante, anterior ou posterior dos agentes de controle biológico *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*, com ou sem *Phytophthora* (Phy). (Médias de 7 repetições).

Tratamentos	MMSPA (g)			
	GI		GE	
	Com Phy	Sem Phy	Com Phy	Sem Phy
FMA	12,69abA	11,53abcA	18,64aA	14,60abB
FMA + <i>Trichoderma</i>	18,90aA	12,83abcB	15,13abA	12,89abA
FMA + <i>Bacillus</i>	17,89aA	13,27abcB	15,27abA	10,79abB
1º FMA/ <i>Trichoderma</i>	14,90abB	19,16aA	18,49aA	11,86abB
1º FMA/ <i>Bacillus</i>	15,20abA	15,61abA	10,30abB	15,07aA
1º <i>Trichoderma</i> / FMA	15,34bA	10,84abcB	13,14abA	13,34abA
1º <i>Bacillus</i> / FMA	17,21aA	18,67abcB	13,13abA	7,57abB
<i>Trichoderma</i>	3,06bA	0,70cA	3,06bA	0,70bA
<i>Bacillus</i>	1,76bA	1,60bcA	1,76bA	1,60abA
Testemunha	1,74bA	1,20cA	1,74bA	1,20abA
	MMFR (g)			
	GI		GE	
	Com Phy	Sem Phy	Com Phy	Sem Phy
FMA	21,19abcdA	20,50abcA	21,74abA	20,66aA
FMA + <i>Trichoderma</i>	25,42abcA	22,93abcA	25,33aA	20,13aB
FMA + <i>Bacillus</i>	27,50aA	21,62abcA	19,97abcA	16,75abA
1º FMA/ <i>Trichoderma</i>	23,31abcdA	24,70abA	27,27aA	18,52abB
1º FMA/ <i>Bacillus</i>	26,25aA	26,61aA	14,16abcB	20,45aA
1º <i>Trichoderma</i> / FMA	24,69abcdA	19,53abcA	21,14abcA	20,06aA
1º <i>Bacillus</i> / FMA	20,92abcdB	29,19aA	21,16abcA	10,72abB
<i>Trichoderma</i>	4,98bcdA	1,56cA	4,98bcA	1,56bA
<i>Bacillus</i>	3,56cdA	2,59bcA	3,56bcA	2,59abA
Testemunha	2,73dA	3,13bcA	2,73cA	3,13abA

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letra minúscula-comparação em cada coluna (dentro do patógeno, para cada fungo). Letra maiúscula- comparação na linha, entre com e sem patógeno, dentro de cada fungo.

Com relação ao teor do fósforo na parte aérea (Tabela 13), as plantas testemunha (controle, *Trichoderma* e *Bacillus*) apresentaram baixo teor de fósforo na parte aérea. Já nas plantas colonizadas com fungo micorrízico o fósforo foi significativamente maior mesmo nas inoculações conjuntas, não havendo diferença nas diferentes épocas de inoculação. Os resultados indicam que não houve relação entre o controle do patógeno e o teor de P na parte aérea. Fillion et al. (1999) também já tinham feito tal constatação, pois segundo esses autores, a melhor nutrição de fósforo para plantas micorrizadas não está envolvida na redução dos sintomas da doença ou população de patógenos em diferentes sistemas planta-patógeno. O fato de a concentração de fósforo na folha ser maior em plantas micorrizadas do que em plantas não micorrizadas já é conhecido (Trotta et al., 1996; Cardoso et al., 1986).

Tabela 13. Teor de fósforo (P) das plantas de limoeiro cravo colonizadas por *Glomus etunicatum* (GE) ou *Glomus intraradices* (GI) com inoculação concomitante, anterior ou posterior dos agentes de controle biológico *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*, com ou sem *Phytophthora* (Phy). (Médias de 7 repetições).

Tratamentos	Teor de Fósforo (g.kg ⁻¹)			
	GI		GE	
	Com Phy	Sem Phy	Com Phy	Sem Phy
FMA	2,08abcA	2,01bA	2,01cdeA	1,98cA
FMA + <i>Trichoderma</i>	2,00abcA	2,03bA	2,05bcdeB	2,16bcA
FMA + <i>Bacillus</i>	1,96bcB	2,05bA	2,28aA	2,03bcB
1º FMA/ <i>Trichoderma</i>	2,08abcA	2,03bA	2,12abcdA	2,06bcA
1º FMA/ <i>Bacillus</i>	2,16aA	2,00bB	2,02cdeA	2,08bcA
1º <i>Trichoderma</i> / FMA	2,04abcA	2,09abA	2,18abcB	2,38aA
1º <i>Bacillus</i> / FMA	2,11abB	2,29aA	2,22abA	2,18bA
<i>Trichoderma</i>	1,98abcA	1,72cB	1,98deA	1,72dB
<i>Bacillus</i>	1,91cA	1,75cB	1,91eA	1,75dB
Testemunha	1,64dA	1,68cA	1,64fA	1,68dA

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letra minúscula-comparação em cada coluna (dentro do patógeno, para cada fungo). Letra maiúscula-comparação na linha, entre com e sem patógeno, dentro de cada fungo

O efeito mais significativo observado foi quanto à colonização micorrízica, a qual promoveu maior crescimento da planta, tanto da parte aérea como radicular. Esse resultado já era esperado, pois sabe-se que as plantas cítricas são bastante dependentes do FMA e, geralmente, o efeito micotrófico é marcante. As interações observadas variaram com o FMA e com o agente de controle biológico.

A colonização micorrízica não foi afetada pela inoculação dos agentes de controle biológico e não houve diferença estatística entre as épocas de inoculação tanto para GI como GE (Tabela 14). A literatura também mostra diferentes efeitos de interação de FMAs e outros fungos saprofíticos sobre a colonização radicular. Assim, Wyss et al. (1992) observaram em milho que a inoculação simultânea de *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* e esporos de *G. mosseae* decresceu significativamente a porcentagem do comprimento de raízes colonizadas pelo FMA não havendo efeito na colonização micorrízica quando *Glomus mosseae* foi introduzido antes de *A. alternata* e *F. equiseti*, analisados separadamente. Já para Camprubi et al. (1995) a inoculação de *Trichoderma aureoviride* não afetou o desenvolvimento da colonização radicular micorrízica por *Glomus intraradices* em citros, enquanto Godeas et al. (1999) observaram que o fungo saprofítico aumentou a colonização micorrízica arbuscular em plantas de soja. Para Vázquez et al. (2000) nenhum dos microrganismos inoculados, mesmo os agentes de controle biológico de fungo, mostrou efeito negativo no estabelecimento da micorriza arbuscular. No entanto, Wyss et al. (1992) constataram que na presença dos agentes de controle biológico, a formação de micorriza com *Glomus mosseae* foi significativamente deprimida, particularmente com *Streptomyces griseoviridis* e *Trichoderma harzianum*. Já foi constatado que hifas de *T. harzianum* podem proliferar abundantemente na superfície do esporo do FMA (Rousseau et al., 1996) e que *Alternaria alternata* e *Fusarium equiseti* (fungos saprofíticos) reduzem a germinação de esporos de *Glomus mosseae*, independentemente do pH do solo (McAllister et al., 1996). McAllister et al., (1994) constataram que *Fusarium solani* não afetou a colonização micorrízica, enquanto que *Glomus mosseae* foi inibido por *Trichoderma koningii*, o qual inibiu a germinação, mas não o desenvolvimento do micélio de *Glomus mosseae*; independentemente do pH do solo. A colonização

de raízes por FMA pode diminuir ou permanecer sem ser afetada, dependendo do tempo de inoculação dos demais microrganismos envolvidos na interação.

A colonização sempre foi alta excluindo-se a testemunha, o *Trichoderma* e *Bacillus*. Em GI+Tri e 1ºBac/GI e GE+Tri houve diferença significativa, sendo que sem *Phytophthora* a colonização micorrízica foi maior que com *Phytophthora*, indicando influência do patógeno na colonização micorrízica. Quando se comparou GE e GI, nos tratamentos FMA+ Tri e 1º Bac/FMA, o fungo GE apresentou a colonização micorrízica significativamente mais alta. Nestes dois tratamentos também houve diferença significativa quando se comparou com e sem *Phytophthora*, sendo que neste último a colonização micorrízica foi maior. Portanto, em pelo menos alguns tratamentos, houve interação negativa com o fungo patogênico, diminuindo a colonização radicular.

Tabela 14. Colonização micorrízica das plantas de limoeiro Cravo colonizadas por *Glomus intraradices* (GI) ou *Glomus etunicatum* (GE), com inoculação concomitante do agente de controle biológico *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*, com ou sem *Phytophthora* (Phy). (Médias de 7 repetições).

Tratamentos	Colonização Micorrízica			
	GI		GE	
	----- %-----			
	Com Phy	Sem Phy	Com Phy	Sem Phy
FMA	73,42a	74,06a	80,45a	79,85a
FMA + <i>Trichoderma</i>	56,65b	69,50a	70,17b	76,83a
FMA + <i>Bacillus</i>	73,04a	72,41a	78,05a	76,37a
1º FMA/ <i>Trichoderma</i>	72,45a	75,06a	75,60a	76,73a
1º FMA/ <i>Bacillus</i>	75,70a	76,83a	71,72a	75,72a
1º <i>Trichoderma</i> / FMA	72,65a	76,66a	78,98a	82,85a
1º <i>Bacillus</i> / FMA	61,62b	75,65a	82,05a	82,05a
<i>Trichoderma</i>	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
<i>Bacillus</i>	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Testemunha	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%, comparando-se na linha, entre patógenos, dentro de cada FMA.

Com relação à severidade de podridão radicular, constatou-se que somente nos tratamentos GI+Tri, 1ºGI/Tri, 1ºGI/Bac e 1ºTri/GE não houve diferença significativa entre as plantas com e sem a presença de *Phytophthora*, indicando que estes tratamentos causaram algum controle da doença (Tabela 15). Em todos os demais tratamentos, as plantas que receberam *Phytophthora* apresentaram significativamente maior severidade da doença, não apresentando nenhum controle. Nos tratamentos testemunha, somente com *Trichoderma* e *Bacillus*, a severidade da doença nas plantas sem a inoculação de *Phytophthora* foi muito alta, o que pode ter mascarado o resultado.

A pré inoculação de *G. intraradices* seguida dos agentes de controle biológico, *Trichoderma* e *Bacillus*, controlou a doença, mostrando uma interação positiva. Este mesmo FMA inoculado ao mesmo tempo que *Trichoderma* e este agente de controle biológico junto com *G. etunicatum* parece causar um efeito no controle de *Phytophthora*. Novamente ressalta-se que o *Trichoderma* é um dos fungos saprofíticos de maior eficiência no controle de patógenos do solo (Sawant et al., 1995; Melo, 1991).

Tabela 15. Notas de severidade de podridão radicular causada por *P. parasitica* na raiz de limoeiro cravo colonizada por *Glomus intraradices* (GI) ou *Glomus etunicatum* (GE) com inoculação concomitante, anterior ou posterior dos agentes de controle biológico *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* e ainda Testemunha, *Trichoderma* e *Bacillus*, com ou sem *Phytophthora* (Phy). (Médias de 7 repetições).

Tratamentos	Notas	
	Com Phy	Sem Phy
	----- 0-5-----	
GI	1,71a	0,43b
GE	1,43a	0,14b
GI + <i>Trichoderma</i>	0,86a	0,43a
GE + <i>Trichoderma</i>	2,29a	0,57b
GI + <i>Bacillus</i>	2,00a	0,43b
GE + <i>Bacillus</i>	1,57a	0,29b
1º GI/ <i>Trichoderma</i>	0,57a	0,43a
1º GE/ <i>Trichoderma</i>	1,86a	0,14b
1º GI/ <i>Bacillus</i>	0,71a	0,29a
1º GE/ <i>Bacillus</i>	1,71a	0,57b
1º <i>Trichoderma</i> / GI	1,43a	0,29b
1º <i>Trichoderma</i> / GE	0,86a	0,43a
1º <i>Bacillus</i> / GI	1,86a	0,43b
1º <i>Bacillus</i> / GE	1,29a	0,14b
<i>Trichoderma</i>	1,43a	1,86a
<i>Bacillus</i>	1,43a	1,43a
Testemunha	2,43a	1,00b

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%, comparando-se na linha (com e sem *P. parasitica*).

4.5 Efeito do substrato na interação de *Glomus intraradices* e *Trichoderma* e no controle de *P. parasitica*.

Segundo Godeas et al. (1999) as interações entre fungo micorrízico arbuscular e fungo saprofítico variam dependendo do solo e populações microbianas onde as plantas são desenvolvidas. A altura das plantas colonizadas por *Glomus intraradices* e Gl+ Tri, tanto na ausência como na presença de *Phytophthora*, foi significativamente maior do que nas plantas não micorrizadas, nos três substratos empregados (Tabelas 16 e 17). Nas plantas colonizadas por *G. intraradices* no solo+ plantmax, a altura foi maior no tratamento sem o patógeno. No tratamento Gl+Tri as plantas apresentaram menor altura com o patógeno no solo. Não houve diferença estatística, na altura das plantas, para todos tratamentos nos diferentes substratos (Tabela 17).

Em solos mais diluídos, as populações de fungo saprofítico foram maiores do que em solos menos diluído. Isto sugere que microrganismos nativos do solo competem com fungos saprofíticos inoculados. Em solos esterilizados ou pobres há uma interação sinérgica entre *G. mosseae* e *T. pseudokoningii* e a combinada aplicação destes microrganismos foi mais eficiente em promover o crescimento da soja (Godeas et al., 1999).

Segundo Hoitink & Boehm (1999), um manejo adequado das plantas pode ser eficiente no controle de doenças causadas por muitos patógenos do solo como *Pythium*, *Phytophthora* e *Fusarium* spp. A supressão de *Phytophthora* também parece ser resultado de interações entre muitos tipos de microrganismos. Os agentes de controle biológico requerem fontes adequadas de matéria orgânica para manutenção de uma atividade saprofítica, garantindo o controle da podridão de raízes por *Phytophthora*.

Tabela 16. Altura (cm) das plantas de limoeiro Cravo, sem ou com colonização por *Glomus intraradices* (GI), sem ou com inoculação concomitante de *Trichoderma harzianum*, com ou sem *Phytophthora* (Phy) em diferentes substratos (Médias de 8 repetições).

	SOLO		PLANTMAX		ESTERCO	
	Com Phy	Sem Phy	Com Phy	Sem Phy	Com Phy	Sem Phy
GI	43,2aA	48,8aA	43,4bA	50,1aA	40,6aA	45,7aA
GI+Tri	40,8bA	50,2aA	46,6aA	46,1aA	42,9aA	44,6aA
Tri	6,5aB	6,2aB	7,6aB	6,4aB	9,7aB	9,6aB
Test	8,4aB	6,0aB	7,4aB	6,5aB	8,2aB	8,5aB

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letra minúscula- comparação na linha (dentro do substrato), entre com e sem *Phytophthora*. Letra maiúscula- comparação na coluna, entre tratamentos.

Tabela 17. Altura (cm) das plantas de limoeiro Cravo, sem ou com colonização por *Glomus intraradices* (GI), sem ou com inoculação concomitante de *Trichoderma harzianum*, com ou sem *Phytophthora* (Phy) em diferentes substratos. (Médias de 8 repetições).

	Testemunha		<i>Trichoderma</i>		<i>G. intraradices</i>		GI + Tri	
	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy
Solo	8,4a	6,0a	6,5a	6,2a	43,2a	48,8a	40,8a	50,2a
Plant.	7,4a	6,5a	7,6a	6,4a	43,4a	50,1a	46,6a	46,1a
Esterco	8,2a	8,5a	9,7a	9,6a	40,6a	45,7a	42,9a	44,6a

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Comparação em cada coluna entre substratos.

Com relação a massa da matéria seca da parte aérea e massa da matéria fresca da raiz (Tabela 18), as plantas de limoeiro cravo colonizadas por *G. intraradices* na ausência de *P. parasitica* foram maiores do que na presença de *P. parasitica* nos três substratos. As plantas colonizadas por GI+*Trichoderma*, na ausência do patógeno, apresentaram maior massa da matéria seca da parte aérea e massa da matéria fresca da raiz no solo e solo+esterco. Já no substrato solo+plantmax, as plantas do tratamento GI+Tri não diferiram estatisticamente entre com e sem patógeno. As plantas colonizadas por GI na presença de *Phytophthora* não diferiram estatisticamente entre si nos diferentes substratos. Já as plantas de limoeiro cravo colonizadas por GI na ausência do patógeno e as plantas do tratamento GI + *Trichoderma* na presença do patógeno obtiveram maior massa da matéria seca da parte aérea no solo e solo+plantmax, diferindo significativamente do solo+esterco. Para GI+ Tri sem o patógeno não houve diferença estatística entre os substratos. Quanto a massa da matéria fresca da raiz, as plantas colonizadas por *G. intraradices* na presença de *P. parasitica* tiveram maior massa radicular no solo e menor no solo+esterco. No substrato solo+ esterco as plantas sempre apresentaram menor massa da matéria fresca da raiz, enquanto que no solo, no tratamento GI e no solo+ plantmax, no tratamento GI+Tri a massa da matéria fresca da raiz sempre foi maior, tanto na presença como na ausência do patógeno. As plantas dos tratamentos testemunha e *Trichoderma* não foram influenciadas pelos substratos e nem tão pouco pela presença do patógeno.

Tabela 18. Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e massa da matéria fresca da raiz (MMFR) das plantas de limoeiro Cravo, sem ou com colonização por *Glomus intraradices* (GI), sem ou com inoculação concomitante do agente de controle biológico *Trichoderma harzianum*, com ou sem *Phytophthora* (Phy) em diferentes substratos. (Médias de 8 repetições).

	Testemunha		<i>Trichoderma</i>		<i>G. intraradices</i>		GI + Tri	
MMSPA (g)								
	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy
Solo	0,2aA	0,1aA	0,1aA	0,1aA	3,6bA	4,3aAB	3,6bAB	4,5aA
Plant.	0,1aA	0,1aA	0,1aA	0,1aA	3,5bA	4,4aA	4,1aA	3,8aA
Esterco	0,2aA	0,2aA	0,3aA	0,3aA	2,8bA	3,6aB	3,1aB	4,2aA
MMFR (g)								
Solo	0,9aA	0,5aA	0,7aA	0,4aA	10,0aA	11,4aA	8,4bAB	12,2aA
Plant.	0,6aA	0,6aA	0,5aA	0,5aA	8,4bAB	10,3aAB	10,4aA	9,5aB
Esterco	0,9aA	1,0aA	1,1aA	1,0aA	6,5bB	8,3aB	6,7bB	8,7aB

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letra minúscula-comparação na linha, em cada substrato, entre com e sem *Phytophthora*; letra maiúscula- comparação na coluna, entre substratos.

Com relação à severidade da doença (Tabela 19), em todos os substratos houve aparecimento do patógeno nas raízes das plantas controle e também das plantas do tratamento com *Trichoderma*. Já para as plantas colonizadas por GI e GI+Tri, houve controle da doença nos 3 diferentes substratos. Isto sugere que plantas em simbiose com fungo micorrízico controlam melhor o patógeno, podendo ser devido à melhor nutrição da planta. Para as plantas do tratamento testemunha, na presença de *P. parasitica*, a severidade da doença foi significativamente maior no solo do que em plantmax e esterco. Provavelmente, os microrganismos existentes na matéria orgânica poderiam ter diminuído a severidade do patógeno.

Tabela 19. Notas (0-5) de severidade de podridão radicular causada por *P. parasitica* a raiz de limoeiro Cravo sem ou com colonização por *Glomus intraradices* (GI), sem ou com inoculação concomitante do agente de controle biológico *Trichoderma harzianum*, com ou sem *Phytophthora* (Phy) em diferentes substratos. (Médias de 8 repetições).

	Testemunha		<i>Trichoderma</i>		<i>G. intraradices</i>		GI + Tri	
	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy
Solo	1,8aA	0,1bA	1,3aA	0bA	0aA	0aA	0aA	0aA
Plant.	1,0aB	0bA	0,7aA	0bA	0aA	0aA	0aA	0aA
Esterco	0,8aB	0bA	0,7aA	0bA	0aA	0aA	0aA	0aA

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letra maiúscula- comparação na coluna, entre substratos; letra minúscula- comparação na linha, dentro do substrato entre com e sem *Phytophthora*.

Com relação ao teor do fósforo (Tabela 20), em todos os substratos, as plantas colonizadas pelo fungo micorrízico apresentaram alto teor de fósforo. Com relação ao teor de fósforo, não houve diferença significativa para todos os tratamentos comparando com e sem a inoculação do patógeno. Somente as plantas colonizadas por *G. intraradices*+ *Trichoderma* sofreram influência do patógeno, sendo que as plantas sem a inoculação de *Phytophthora* obtiveram baixo teor de fósforo. Comparando os sustratos, as plantas de limoeiro cravo desenvolvidas no solo, apresentaram baixo teor de fósforo quando comparadas ao solo+ plantmax e solo+ esterco. As plantas de limoeiro cravo com inoculação de *Trichoderma* na ausência de *Phytophthora*, as plantas colonizadas por *G. intraradices* na presença e ausência de *Phytophthora* e as plantas colonizadas por *G. intraradices*+ *Trichoderma* na presença de *Phytophthora* apresentaram menor teor de fósforo no solo quando comparadas ao substrato solo+ plantmax e solo+ esterco.

Os resultados indicam que não houve relação entre o controle do patógeno e o teor de P na parte aérea. Fillio et al. (1999) também já tinham feito tal

constatação, pois segundo esses autores, a melhor nutrição de fósforo para plantas micorrizadas não está envolvida na redução dos sintomas da doença ou população de patógenos em diferentes sistemas planta-patógeno. O fato de a concentração de fósforo na folha ser maior em plantas micorrizadas do que em plantas não micorrizadas já é conhecido (Trotta et al., 1996; Cardoso et al., 1986).

Tabela 20. Teor de fósforo – g.kg^{-1} (A) na parte aérea das plantas de limoeiro cravo sem ou com colonização por *Glomus intraradices* (GI), sem ou com inoculação concomitante do agente de controle biológico *Trichoderma harzianum*, com ou sem *Phytophthora* (Phy) em diferentes substratos. (Médias de 8 repetições).

(A)	Testemunha		<i>Trichoderma</i>		<i>G. intraradices</i>		GI + Tri	
	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy
Solo	0,85aA	1,02aA	0,70aA	0,67aB	2,06aB	2,08aB	2,05aB	2,11aA
Plant.	0,87aA	0,79aA	1,09aA	0,82aAB	2,57aA	2,38aAB	2,47aAB	2,53aA
Esterco	1,05aA	0,97aA	1,07aA	1,14aA	2,66aA	2,76aA	2,79Aa	2,27bA

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letra maiúscula-comparação na coluna, entre substratos; letra minúscula-comparação na linha, dentro do substrato entre com e sem *Phytophthora*.

A colonização micorrízica não foi afetada pela inoculação do agente de controle biológico (Tabela 21). A colonização sempre foi alta excluindo-se a testemunha e o *Trichoderma*. Não houve diferença estatística entre os substratos. As plantas de limoeiro cravo apresentaram maior colonização micorrízica do que as plantas colonizadas por *G. intraradices*+ *Trichoderma* na ausência de *Phytophthora* no substrato solo+ esterco. As plantas colonizadas por *G. intraradices*+ *Trichoderma* na ausência de *Phytophthora* no substrato solo apresentaram maior colonização micorrízica, indicando que para este tratamento há influência do patógeno.

Para Camprubí et al. (1995) a inoculação de *Trichoderma aureoviride* não afetou o desenvolvimento da colonização radicular micorrízica por *Glomus intraradices* em citros. Para Vázquez et al. (2000) nenhum dos microrganismos inoculados, mesmo os agentes de controle biológico de fungo, mostrou efeito negativo no estabelecimento da micorriza arbuscular.

Tabela 21. Colonização micorrízica (%) das plantas de limoeiro cravo sem ou com colonização por *Glomus intraradices* (GI), sem ou com inoculação concomitante do agente de controle biológico *Trichoderma harzianum*, com ou sem *Phytophthora* (Phy) em diferentes substratos. (Médias de 8 repetições).

	<i>G. intraradices</i>		GI + Tri	
	c/ Phy	s/ Phy	c/ Phy	s/ Phy
Solo	97,4aA	98,7aA	90,8bA	98,4aA
Plant.	94,2aA	95,3aA	95,9aA	96,6aA
Esterco	94,0aA	98,8aA	96,3aA	92,6aA

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letra maiúscula-comparação na coluna, entre substratos; letra minúscula- comparação na linha, dentro do substrato entre com e sem *Phytophthora*.

5 CONCLUSÕES

- Os isolados bacterianos de *Pseudomonas* sp A5, 52B, I5, I6, I7 E 73 foram antagônicos a *Phytophthora parasitica*, *in vitro*, sendo que 78% deles mostrou controle do patógeno *in vivo*. Os isolados bacterianos 52B, I5 e 73 foram antagônicos tanto *in vivo* como *in vitro*.

- No substrato inerte (areia) houve controle da *Phytophthora parasitica* tanto pelo FMA quanto pelos agentes de controle biológico, isoladamente ou em conjunto. O agente de controle biológico, *Trichoderma harzianum*, diminuiu a colonização micorrízica no limoeiro Cravo.

- O crescimento da planta foi favorecido pela inoculação do FMA e pelos agentes de controle biológico inoculados anterior ou concomitante ao FMA e estes antagonistas não afetaram a colonização micorrízica. Houve controle da doença nos tratamentos 1º Tri/GE, 1º GI/Tri, GI+Tri, 1º GI/Bac e *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* isoladamente.

- As plantas micorrizadas, tanto na presença quanto na ausência de *Trichoderma*, controlaram *P. parasitica* e tiveram maior crescimento nos três substratos (solo, solo+ plantmax e solo+ esterco de curral).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOT, L. K.; ROBSON, A. D. Infectivity and effectiveness of five endomycorrhizal fungi: competition with indigenous fungi in field soils. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 32, p. 621-630, 1981.
- ACZÓN-AGUILAR, C.; BAGO, B. P. Physiological characteristics of the host plant promoting an undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H. (Ed.). **Impact of mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1994. p. 47-60,.
- ACZÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Arbuscular mycorrhizas and biological of soil-borne plant pathogens- an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**. v. 6, p. 457-464, 1996.
- ADAMS, P. B. The potencial of mycoparasites for biological control of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 59-72, 1990.
- AHMED, A. S.; PÉREZ-SÁNCHEZ, C.; EGEA, C.; CANDELA, M. E. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. **Plant pathology**, v. 48, p. 58-65, 1999.
- AMORIM, E. P. R. Controle biológico de *Phytophthora parasitica* var. *nicotinae* Dastur e *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian em plântulas de citros. Botucatu, 1997. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita".

- BAKER, K.H.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco, W. H. Freeman, 1974. 433 p.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonist of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- BENSON, D. M. Cold inactivation of *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, v. 72, p. 530-560, 1982.
- BRASSIER, C. M. Stimulation of six organic formation of *Phytophthora* for antagonist species of *Trichoderma*. **New Phytologist**, v. 74, p. 183-198, 1975.
- BROADBENT, P.; BAKER, K. F. Soil suppressive to *Phytophthora* root rot in eastern Australia. In: BREHL, G. W. **Biological and control of soilborne plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1975. p. 152-157.
- BROADBENT, P.; BAKER, K. F.; WATERWORTH, V. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. **Australian Journal of Biological Science**, v. 24, p. 925-944, 1971.
- BROWN, W. E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathological**, v. 12, p. 181-197, 1974.
- BUDI, S. W.; BLAL, B.; GIANINAZZI, S. Surface-sterilization of *Glomus mosseae* sporocarps for studying endomycorrhization *in vitro*. **Mycorrhiza**. v. 9, p. 65-68, 1999.
- CAMPRUBÍ, A.; CALVET, C.; ESTAÚN, V. Growth enhancement of *Citrus reshni* after inoculation with *Glomus intraradices* and *Trichoderma aureoviride* and associated effects on microbial populations and enzyme activity in potting mixes. **Plant and Soil**. v. 173, p. 233-238, 1995.
- CALVET, C.; PERA, J.; BAREA, J. M. Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. **Plant and Soil**. v. 148, p. 1-6, 1993.
- CARDOSO, E. J. B. N. Fungo micorriza traz economia. **Toda Fruta**, v. 1, p. 4-6, 1986.

- CARDOSO, E. J. B. N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A. P. B.; OLIVEIRA, M. H. A. Eficiência de FMVA em porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 10, p. 25-30, 1986.
- CHRISTENSEN, H.; JAKOBSEN, I. Reduction of bacteria in growth by a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 15, p. 253-258, 1993.
- CITERNESI, A. S.; FORTUNA, P.; FILIPPI, C.; BAGNOLI, G.; GIOVANNETTI, M. The occurrence of antagonistic bacteria in *Glomus mosseae* pot cultures. **Agronomie**, v. 16, p. 671-677, 1996.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539 p.
- CORDIER, S.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON. Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. **Plant and Soil**, v. 185, p. 223-232, 1996.
- CORDIER, S.; POZO, M. J.; BAREA, J. M., GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* in tomato by arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 11, p. 1017-1028, 1998.
- DATNOFF, L. E.; NEMEC, S.; PERNEZNY, K. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. **Biological Control**, v. 5, p. 427-431, 1995.
- DAVIS, R. M.; MENGE, J. A. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of citrus. **Phytopathology**, v. 70, p. 447-452, 1980.
- DAVIS, R. M.; MENGE, J. A. *Phytophthora parasitica* inoculation and intensity of vesicular-arbuscular mycorrhizae in citrus. **New Phytologist**, v. 87, p. 705-715, 1981.

- DAVIS, R. M.; MENGE, J. A.; ZENTMYER, G. A. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Phytophthora* root rot of three crop plants. **Phytopathology**, v. 68, p. 1614-1617, 1978.
- DELINE, H. W. Interaction between vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 115-119, 1982.
- DI GIORGI, F.; IDE, B. Y.; DIB, K.; MARCHI, R. J.; TRIBONI, H. R., WAGNER, R. L. Proposta para ampliação do conceito de estimativa de safra quantitativa para qualitativa. **Laranja**, v.15, p. 97-122, 1994.
- DULLY, B. R.; SIMON, A.; WELLER, D. M. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent *Pseudomonas* for controls of take- all on wheat. **Phytopathology**. v. 86, p. 188-94, 1996.
- EUCATEX MINERAL. **Sistemas e insumos Plantmax para a agricultura**. Cordeirópolis. 1994. 5 p.
- FANG, J. G.; TSAO, P. H. Efficacy of *Penicillium funiculosum* as a biological control agent against *Phytophthora* roots rots of Azalea and Citrus. **Phytopathology**. v. 85, p. 871-878, 1995.
- FEICHTENBERGER, E. Doenças induzidas por fungos do gênero *Phytophthora* em citros e seu controle. **Laranja**. v. 10, p. 359-378. 1989.
- FEICHTENBERGER, E.; ROSSETI, V.; POMPEU JR., J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; FIGUEIREDO, J. O. Evaluation of tolerance of citrus in Brazil: a review. **Proceedings of International. Society of Citriculture**. v. 10, p. 359-378. 1992.
- FIELD, S. J.; MENGE, J. A.; STOLZY, L. H. Influence of drip and furrow irrigation on *Phytophthora* root rot of citrus under field and greenhouse conditions. **Plant Disease**, v. 74, p. 21-27, 1991.
- FILION, M.; ST-ARNAUD, M.; FORTIN, J. A. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. **New Phytologist**. v. 141, p. 525-533, 1999.
- FITTER, A. H.; GARBAYE, J. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. **Plant and Soil**. v. 159, p. 123-132, 1994.

- FRACCHIA, S.; MUJICA, M. T.; GARCÍA-ROMERA, I.; GARCÍA-GARRIDO, J. M.; MARTÍN, J.; OCAMPO, J. A. Interactions between *Glomus mosseae* and arbuscular mycorrhizal sporocarp-associated saprophytic fungi. **Plant and Soil**, v. 200, p. 131-137, 1998.
- FREITAS, J. R.; GERMIDA, I. I. Growth promotion of winter wheat by fluorescent *Pseudomonads* under field conditions. **Soil Biochemistry**, v. 24, p. 1137- 1146, 1992.
- FREITAS, S. S.; CARDOSO, E. J. B. N.; MIRANDA, M. A. C. *Pseudomonas* spp. fluorescentes e a nutrição de plantas de soja. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3., Londrina, 1994. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994. p. 89.
- GERDERMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions British Mycological Society**, v. 46, p. 235-246, 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500, 1980.
- GODEAS, A.; FRACCHIA, S.; MUJICA, M. T. Influence of soil impoverishment on the interaction between *Glomus mosseae* and saprobe fungi. **Mycorrhiza**, v. 9, p. 185-189, 1999.
- HANDELSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1855-1869, 1996.
- HARLEY, J. L.; SMITH, S. E. **Mycorrhizal symbiosis**. New York: Academic Press, 1983. 286 p.
- HAYMAN, D. S.; MORRIS, E. J.; PAGE, R. J. Methods for inoculating field crops with mycorrhizal fungi. **Annals of Applied Biology**, v. 99, p. 247-253, 1981.
- HATTING, M. J.; GERDEMANN, J. W. Inoculation of Brazilian sour orange seed with an endomycorrhizal fungus. **Phytopathology**, v. 65, p. 1013-1016, 1975.

- HOITINK, H. A. J.; BOEHM, M. J. Biocontrol within the context of soil microbial communities : A substrate - dependent phenomenon. **Annual Review Phytopathology**, v. 37, p. 427-446, 1999.
- INFORMATIVO CENTRO DE CITRICULTURA. Cordeirópolis, n 4. maio. 1999.
- KIMATI, H.; GALLI, F. Doenças dos citros. In: GALLI, F (Coord). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1980. v. 2.p. 213-235,.
- KING, E. D.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal Laboratorial Clinic Medical**, v. 44, p. 301-307, 1954.
- KLEINSCHMIDT, G. D.; GERDEMANN, J. W. Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soil related to the absence of Endomycorrizae. **Phytopathology**, v. 62, p. 1453-1477, 1972.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N.; MILLER, T. D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology**, v. 70, p. 1078-1082, 1980.
- LEEMAN, M.; PELT, J. A. van; HENDRICKX, M. J.; SCHEFFER, R. J.; BAKKER, P. A. H. M.; SCHIPPERS, B. Biocontrol of fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. **Phytopathology**, v. 85, p. 1301-1305, 1995.
- LEMANCEAU, P.; ALABOUVETTE, C. Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenics *Fusarium*. **Crop Protection**, v. 10, p. 279-286, 1991.
- LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 187-209, 1986.
- LEVIS, S. A.; PAPAIVIZAS, G. L. Biocontrol of plant diseases: The approach for tomorrow. **Crop Protection**, v. 10, p. 95-105, 1991.
- LEWIS, J. A.; PAPAIVIZAS, G. C. Effect of the fumigant methan on *Trichoderma* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 739-745, 1984.

- LUMSDEN, R. D.; LEWIS, J. A.; MILLNER, P. D. Effect of composted sewage sludge on several soil borne pathogens and diseases. **Phytopathology**, v. 73, p. 1543-1548, 1983.
- LOON, L. C. van. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 4, p. 11-116, 1985.
- MAIA, M. L.; AMARO, A. A. **Estrutura do mercado de suco cítrico no Brasil**. São Paulo: IEA, 1994. 12p.
- MALAJZUK, N. Microbial antagonism to *Phytophthora*. In: ERWIN, D. C. ***Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology e pathology**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. p. 197-218.
- MANJUNATH, A.; MOHAN, R.; BAGYARAJ, D. J. Response of Citrus to vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation in unsterile soils. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, p. 2729-2732, 1983.
- MARSCHNER, P.; CROWLEY, D. E.; HIGASHI, R. M. Root exudation and physiological status of a root - colonizing fluorescent pseudomonads in mycorrhizal and non - mycorrhizal pepper (*Capsicum annum* L.). **Plant and Soil**. v. 189, p. 11- 20, 1997.
- McALLISTER, C. B.; GARCIA-ROMERA, I. Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 1363-1367, 1994.
- McALLISTER, C. B.; GARCIA-GARRIDO, J. M.; GARCIA-ROMERA, I. *In vitro* interactions between *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* and *Glomus mosseae*. **Symbiosis**, v. 20, p. 163-174, 1996.
- MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma spp.* no controle biológico de doenças de plantas. **Controle biológico de doenças de plantas**. Campinas. EMBRAPA, p.135-156. 1991.
- MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 4, p. 261-295, 1996.

- MEYER, J. R.; LINDERMAN, R. G. Selective influence on populations of rhizosphere on rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 18, p. 191- 196, 1986.
- NEMEC, S.; DATNOFF, L. E.; STRANDBERG, J. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. **Crop Protection**, v. 15, p. 735-742, 1996.
- NESBITT, H. J.; MALAJCZUK, N.; GLENN, A. R. Bacterial colonization and lysis of *P. cinnamomi*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 77, p. 47-54, 1981.
- NORMAN, J. R.; HOOKER, J. E. Sporulation of *Phytophthora fragariae* shows greater stimulation by exudates of non-mycorrhizal than by mycorrhizal strawberry roots. **Mycological Research**, v. 104, p. 1069-1073, 2000.
- NORMAN, J. R.; ATKINSON, D.; HOOKER, J. E. Arbuscular mycorrhizal fungal induced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen *Phytophthora fragariae*. **Plant and Soil**, v. 185, p. 191-198, 1996.
- OLIVEIRA, A. A. R.; WEBER, O. B.; SILVA, A. C. G. M. Micorrização e crescimento de porta - enxertos de citros em função de inóculos micorrízicos vesículo arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 1049-1056, 1992.
- OLIVEIRA, A. A. R.; JESUS, E. S., Efeito de infecção por FMVA sobre o desenvolvimento de porta- enxertos de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Botucatu, 1987, p. 319-325.
- PAULITZ, T. C.; AHMAD, J. S.; BAKER, R. Integration of *Pythium numm* and *Trichoderma harzianum* isolate T-95 for the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. **Plant and Soil**, v. 121, p. 243-50, 1991.
- PAULITZ, T. C.; LINDERMAN, R.G. Interactions between fluorescent pseudomonads and mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 113, p. 37- 45, 1989.

- PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular micorrhizal fungi for rapid assessment for infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158-163, 1970.
- PIERSON, E. A.; WELLER, D. M. Use of mixture of fluorescent *Pseudomonas* to suppress take-all and improve the growth of wheat. **Phytopathology**, v. 84, p. 940-947, 1994.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS F.; POMPEU JUNIOR, J. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, p. 265-280. 1991.
- RIBEIRO, O. K. **A source book of the Genus *Phytophthora***. Vaduz: J. Cramer, 1978. 417 p.
- ROUSSEAU, A.; BENHAMOU, N. Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 86, p. 434-443, 1996.
- SAWANT, I. S.; SAWANT, S. D.; NANAYA, K. A. Biological control of *Phytophthora* root-rot of coorg mandarin (*Citrus reticulata*) by *Trichoderma* species grown on coffee waste. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 65, p. 842-846, 1995.
- SARBINI, G.; KOMMEDAHL, T. Effect of bacterial seed treatment on stand and yield of soybeans in *Phytophthora*-infested soil. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, v. 4, p. 146-147, 1977.
- SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Selected topics in biological control. **Annual Review of Microbiology**, v. 35, p. 453-76, 1981.
- SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S.; SILVA, L. R. C. LOMBARDI, M. L. C. O.; CARDOSO, E. J. B. N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 19, p. 205-211, 1995.
- SMITH, V. L.; WILCOX, W. F.; HARMAN, G. E. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. **Phytopathology**, v. 80, p. 880-885, 1990.

- STALEY, T. E.; LAWRENCE, E. G.; NANCE, E. L. Influence of a plant growth- promoting pseudomonad and vesicular- arbuscular mycorrhizal fungus on alfafa and birdsfoot trefoil growth and nodulation. **Biology and Fertility of Soils**, v. 14, p. 175- 180, 1992.
- STOLZY, L. H.; LETEY, J.; KLOTZ, L. J.; LABANAUSKAS, C. K. Water and aeration as factors in root decay of *Citrus sinensis*. **Phytopathology**, v. 55, p. 270-275, 1991.
- TIEN, T. M.; GASKINS, M. K.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1016- 1024, 1979.
- TROTTA, A.; VARESE, G. C.; GNAVI, E. Interactions between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomatos plants. **Plant and Soil**, v. 185, p. 199-209, 1996.
- TUCKER, C. P. H.; ANDERSON, C. A. Correction of citrus seedling stunting on fumigated soils by phosphate application. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, v. 85, p. 10-12, 1972.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Práticas agrícolas e sua influência no controle biológico de doenças. In: BETTIOL, W. (Coord.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1991. p. 195-200.
- VÁZQUEZ, M. M.; CÉSAR, S.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 261-272, 2000.
- VEJSADOVÁ, H.; CATSKÁ, V.; HRSELOVÁ, H.; GRYNDLER, M. Influence of bacteria on growth and phosphorus nutrition of mycorrhizal corn. **Journal of Plant Nutrition**, v. 16, p. 1857- 1866, 1993.

- VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A. P.; WYSS U. R. S.; PICHÉ, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 12, n 3, p. 5004-5007, dec.1998.
- WYSS, P.; BOLLER, T. H.; WIEMKEN, A. Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhiza. **Plant and Soil**. v. 147, p. 159-162, 1992.
- ZAMBOLIM, L. **Potencial dos fungos micorrízicos vesículo- arbuscular no controle de fitopatógenos e implicações com a nutrição fosfatada.** Controle biológico de doenças de plantas. Campinas: EMBRAPA, 1991. 87 p.