**EFEITO DO CULTIVO DE MUDAS DE *Eucalyptus citriodora* E DA
TINDALIZAÇÃO SOBRE A COMUNIDADE FÚNGICA DO SUBSTRATO
E AVALIAÇÃO DE HIPERPARASITISMO DE *Trichoderma* spp. SOBRE
*Pisolithus tinctorius***

CÉLIA REGINA TREMACOLDI

Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

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

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1996**

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

Tremacoldi, Célia Regina

Efeito do cultivo de mudas de *Eucalyptus citriodora* e da tinalização sobre a comunidade fúngica do substrato e avaliação de hiperparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *Pisolithus tinctorius* / Célia Regina Tremacoldi. - - Piracicaba, 1996.
43 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.

Bibliografia. ...

1. Eucalipto - Muda - Cultivo 2. Fungo celulolítico 3. Micorriza 4. Parasitismo

I. Título

CDD 634.9734

**EFEITO DO CULTIVO DE MUDAS DE *Eucalyptus citriodora* E DA
TINDALIZAÇÃO SOBRE A COMUNIDADE FÚNGICA DO SUBSTRATO
E AVALIAÇÃO DE HIPERPARASITISMO DE *Trichoderma* spp. SOBRE
*Pisolithus tinctorius***

CÉLIA REGINA TREMACOLDI

Aprovada em 16/01/97

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

ESALQ/USP

Prof. Dr. MÁRCIO RODRIGUES LAMBAIS

ESALQ/USP

Prof. Dra. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

UNESP/Botucatu

Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

Orientador

Dedico

ao meu filho

Pedro

e

aos meus pais

Orlando e Célia

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Tasso Leo Krügnner, pela amizade e valiosa orientação.

Ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), representados por docentes e funcionários, pelos ensinamentos e incentivo recebidos.

Ao Núcleo de Apoio em Microscopia Eletrônica da ESALQ/USP.

Ao Instituto de Pesquisas Florestais - IPEF - pelo fornecimento das sementes de eucalipto.

À professora Dra. Sonia Maria de Stéfano Piedade, do Departamento de Matemática e Estatística da ESALQ/USP, pelo auxílio durante a análise estatística dos dados.

Ao colega de turma Nelson Arno Wulf, pela colaboração no preparo das amostras avaliadas ao microscópio eletrônico de varredura.

Aos funcionários do viveiro de mudas florestais, do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, pelos ensinamentos e apoio recebidos.

À CAPES - Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela concessão de bolsa de estudo.

Aos colegas e amigos pós-graduandos pelo carinho e apoio sempre confortadores.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Espécies arbóreas florestais e fungos ectomicorrízicos	3
2.2. Relações antagônicas entre microrganismos do solo e fungos ectomicorrízicos	5
2.3. O gênero <i>Trichoderma</i>	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Experimento de viveiro.....	12
3.1.1. Quantificação de <i>Trichoderma</i> spp. e de outros fungos em substratos	13
3.1.2. Quantificação de <i>Trichoderma</i> spp. e de outros fungos em raízes	15
3.1.3. Peso da matéria fresca da parte aérea e altura das mudas ao final do experimento	16
3.2. Avaliação do potencial de <i>Trichoderma</i> spp., isoladas durante o experimento de viveiro, em hiperparasitar <i>Pisolithus tinctorius</i> , <i>in vitro</i>	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Experimento de viveiro.....	19
4.1.1. Quantificação de <i>Trichoderma</i> spp. e de outros fungos em substratos	19
4.1.2. Quantificação de <i>Trichoderma</i> spp. e de outros fungos	

em raízes	25
4.1.3. Peso da matéria fresca da parte aérea e altura das mudas ao final do experimento	25
4.2. Avaliação do potencial de <i>Trichoderma</i> spp., isoladas durante o experimento de viveiro, em hiperparasitar <i>Pisolithus tinctorius</i> , <i>in vitro</i>	27
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
APÊNDICE 1	42
APÊNDICE 2	43

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Número de propágulos viáveis de <i>Trichoderma</i> spp. e de fungos totais por grama de Plantmax [®] (PL) e de casca de eucalipto compostada (CE), tinalizados (T) ou não (NT), secos ao ar, em P ₀	20
Tabela 2 - Número de propágulos viáveis de fungos totais por grama de Plantmax [®] e de casca de eucalipto compostada, tinalizados (T) ou não (NT), com mudas de eucalipto (E) ou sem (SE), em cada um dos períodos de amostragem (P ₄ a P ₁₄)	24
Tabela 3 - Número de propágulos viáveis de fungos totais por grama de raízes, em Plantmax [®] (PL) e em casca de eucalipto compostada (CE), tinalizados (T) ou não (NT), nos três últimos períodos de amostragem (P ₁₀ a P ₁₄)	26
Tabela 4 - Altura (cm) e peso da matéria fresca (g) da parte aérea das mudas de <i>Eucalyptus citriodora</i> ao final do experimento, para Plantmax [®] (PL) e casca de eucalipto compostada (CE), tinalizados (T) ou não (NT).....	27

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Precipitação (mm) e temperatura (°C) média diárias, durante o período de instalação do experimento de viveiro, conforme dados do Departamento de Física e Meteorologia, ESALQ/USP ...	23
Figura 2 - Enrolamento de hifas de <i>Pisolithus tinctorius</i> por <i>Trichoderma</i> spp.. a) isolados 1604 (<i>P. tinctorius</i>) e TR ₁ (<i>Trichoderma</i> sp.) x2000; b) isolados 1612 (<i>P. tinctorius</i>) e TR ₃ (<i>Trichoderma</i> sp.) x3000; c) isolados 1612 (<i>P. tinctorius</i>) e TR ₂ (<i>Trichoderma</i> sp.) x2000	29

EFEITO DO CULTIVO DE MUDAS DE *Eucalyptus citriodora* E DA TINDALIZAÇÃO SOBRE A COMUNIDADE FÚNGICA DO SUBSTRATO E AVALIAÇÃO DE HIPERPARASITISMO DE *Trichoderma* spp. SOBRE *Pisolithus tinctorius*

Autora: CÉLIA REGINA TREMACOLDI

Orientador: Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

RESUMO

O número de propágulos viáveis de *Trichoderma* spp. e de fungos em geral foi estimado em dois substratos e em raízes, ao longo do período de formação de mudas de *Eucalyptus citriodora*, em viveiro, de novembro de 1995 a fevereiro de 1996. Os substratos utilizados foram Plantmax[®] e casca de eucalipto compostada, tindalizados ou não e cultivados ou não com mudas de eucalipto. A quantificação de propágulos viáveis de fungos foi realizada pela diluição em série dos substratos e das raízes e posterior contagem do número de colônias formadas em placas de Petri contendo meio de Martin.

Houve incremento no número de propágulos viáveis de fungos nos dois substratos, tindalizados e não tindalizados, em presença de mudas de *E. citriodora*. Raízes de substratos tindalizados apresentaram maior número de propágulos viáveis de fungos em relação àquelas de substratos não tindalizados. O gênero *Trichoderma* foi isolado esporadicamente, enquanto que *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. foram os grupos predominantes, independente do tratamento aplicado.

Dentre todos os isolados obtidos, três de *Trichoderma* spp. foram selecionados e pareados com dois de *Pisolithus tinctorius*, em meio de batata-dextrose-água, para verificação de hiperparasitismo. Houve enrolamento de hifas

dos dois isolados de *Pisolithus tinctorius* pelos três de *Trichoderma* spp., após sete dias de pareamento.

**EFFECT OF CULTIVATION WITH *Eucalyptus citriodora* SEEDLINGS
ON THE FUNGAL COMMUNITY OF THE SUBSTRATE AND
EVALUATION OF HYPERPARASITISM OF *Trichoderma* spp. ON
*Pisolithus tinctorius***

Author: CÉLIA REGINA TREMACOLDI

Adviser: Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

SUMMARY

The number of viable propagules of *Trichoderma* spp. and total fungi in general was estimated in two substrates and roots of *Eucalyptus citriodora* during the period of seedling formation in the nursery, from November 1995 to February 1996. Plantmax® and eucalyptus bark compost, treated or not by tyndallization and cultivated or not with the eucalyptus seedlings were the substrates employed. Quantification of fungal propagules was performed by the serial dilution technique and by counting the number of colonies formed in Petri dishes containing Martin's medium.

There was an increase in the number of fungal propagules in the substrates, treated or not by tyndallization, during seedling development. Roots grown in the substrates treated by tyndallization showed a higher amount of fungal propagules than in the non treated substrates. Species of *Trichoderma* were sporadically isolated, whereas *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. were the predominant taxa isolated, regardless of the treatment applied.

Three isolates of *Trichoderma* spp. were selected and paired with two isolates of *Pisolithus tinctorius* on potato-dextrose-agar for testing the occurrence of hyperparasitism. Hyperparasitism by hyphal coiling was

demonstrated for all isolates of *Trichoderma* spp. against both *P. tinctorius* isolates, after seven days of pairing.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma*, encontrado comumente em diferentes tipos de solos, inclusive florestais, como saprófita e um dos componentes mais numerosos da microbiota (WIDDEN, 1979; BEHERA et al, 1991) é reconhecido como antagônico a diversos outros fungos (GIBBS & SMITH, 1978; HADAR et al, 1979; HARMAN et al, 1981; PAPAVIZAS, 1985; LEWIS & PAPAVIZAS, 1985; BENHAMOU & CHET, 1993). Quando estes fungos do solo são patógenos de plantas, espécies de *Trichoderma* podem tornar-se eficazes agentes de controle biológico agindo, principalmente, por mecanismos de antibiose (DENNIS & WEBSTER, 1971), de hiperparasitismo (OLIVEIRA, 1982; BENHAMOU & CHET, 1993) ou de competição (LAI & BRUEHL, 1968; WIDDEN & SCATTOLIN, 1988).

Viveiros florestais, geralmente, utilizam-se de substratos orgânicos desinfestados para a produção de mudas, o que pode favorecer a recolonização por espécies pioneiras vigorosas, como é o caso de *Trichoderma* spp. (BLISS, 1951; WARCUP, 1957; MUGHOGHO, 1968; SIVASITHAMPARAM et al, 1987).

A associação simbiótica entre *Eucalyptus* spp. e fungos ectomicorrízicos é de interesse para os produtores desta espécie florestal, especialmente em condições climáticas e edáficas desfavoráveis, uma vez que a

micorrização incrementa a absorção de água e de nutrientes da solução do solo pela planta, principalmente o fósforo que é pouco móvel (HARLEY & SMITH, 1983; MARX et al, 1984). O eucalipto é uma espécie exótica utilizada no reflorestamento de extensas áreas tropicais e subtropicais, podendo apresentar tanto ecto como endomicorrizas de forma facultativa sendo que, em habitat natural, é predominantemente ectomicorrízica em plantios adultos (LE TACON et al, 1987).

A quantificação de *Trichoderma* spp. presentes em substratos utilizados para a produção de mudas de eucalipto é interessante pois, assim como quantidades consideráveis de propágulos viáveis deste fungo podem gerar a expectativa de estar ocorrendo controle biológico de certos fitopatógenos de solo, existe também a possibilidade de que estejam sendo antagônicas a fungos benéficos ao desenvolvimento das mudas, como é o caso dos ectomicorrízicos (SUMMERBELL, 1987; PAULITZ & LINDERMAN, 1991; BUENO, 1994).

O primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do cultivo de substratos orgânicos com *Eucalyptus citriodora* e da tinalização, ao longo do período de formação das mudas, em viveiro, sobre a comunidade fúngica dos substratos. O segundo foi avaliar a possível ocorrência de hiperparasitismo de isolados de *Trichoderma* spp. em relação ao fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch, de ocorrência comum em solos florestais (MARX, 1977; KRÜGNER, 1986).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Espécies arbóreas florestais e fungos ectomicorrízicos

Algumas espécies florestais necessitam, obrigatoriamente, de associação micorrízica para estabelecerem-se em condições naturais, como é o caso de *Pinus* spp., que não se desenvolve em áreas novas de plantio se ali não estiverem presentes, também, fungos ectomicorrízicos compatíveis (TRAPPE, 1977; MARX, 1980). Assim sendo, há inoculação em larga escala de plântulas em viveiros de coníferas, nos Estados Unidos da América, com fungos ectomicorrízicos apropriados para melhorar o índice de sobrevivência e o crescimento das mudas após o transplante. A simbiose proporciona melhor absorção de água e nutrientes pelas raízes, especialmente aqueles pouco móveis no solo, como o fósforo (HARLEY & SMITH, 1983; MARX et al, 1984).

A resposta de espécies de eucalipto à inoculação com diferentes espécies de fungos ectomicorrízicos vem sendo recentemente estudada em experimentos em casa-de-vegetação e viveiro. Para cada hospedeiro, que pode ser classificado como ecto ou endomicorrízico (BOUDARGA et al, 1990; BELLEI & CARVALHO, 1992) e que é predominantemente ectomicorrízico em plantios adultos (LE TACON et al, 1987), há diferentes respostas em relação às espécies ou isolados dos fungos utilizados, que variam em fisiologia e

características de crescimento (MARX, 1981; BOUGHER & MALAJCZUK, 1990; GALLI, 1996). Fica ressaltada, então, a idéia de compatibilidade entre o fungo simbiote e a espécie hospedeira utilizados como prioridade para obtenção de sucesso na formação ectomicorrízica (MALAJCZUK et al, 1990).

Pisolithus tinctorius é amplamente distribuído em solos florestais, de ocorrência natural e associa-se a um grande número de espécies arbóreas (MARX, 1977), entre elas o eucalipto. Apresenta crescimento satisfatório em meio de cultura, permitindo a produção de inóculo para formação de mudas para reflorestamento (KRÜGNER, 1986).

Mudas de eucalipto inoculadas, *in vitro* ou em condições de viveiro, geralmente apresentam alta taxa de micorrização, o que não significa que ao serem transplantadas ocorra a permanência da micorriza já existente ou mesmo aumento em relação à taxa inicial. Plântulas e “plantlets” de eucalipto altamente colonizadas por isolados de *P. tinctorius*, quando transplantadas para substrato solo-areia, previamente autoclavado, e mantidas sob condições de viveiro, apresentaram notável diminuição da quantidade de ectomicorrizas inicial chegando, em algumas mudas, ao completo desaparecimento (VIDA, 1989). BACCHI (1988) também observou que *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* inoculados em viveiro com *P. tinctorius* não mostraram formação de ectomicorrizas típicas durante a fase de produção de mudas .

Tais exemplos demonstram que não basta haver apenas compatibilidade entre planta hospedeira e isolado fúngico. Outros fatores podem influenciar o desenvolvimento e o estabelecimento ectomicorrízico, como características do substrato (pH, umidade, teor de matéria orgânica, presença de elementos tóxicos), fatores climáticos e a interação do fungo ectomicorrízico com outros microrganismos presentes na rizosfera (TRAPPE, 1977; BETTIOL & KRÜGNER, 1986; BERINGER et al, 1987; MALAJCZUK et al, 1990; PAULITZ & LINDERMAN, 1991; BELLEI & CARVALHO, 1992).

2.2. Relações antagônicas entre microrganismos do solo e fungos ectomicorrízicos

Viveiros florestais, geralmente, utilizam-se de substratos orgânicos desinfestados para a produção de mudas, o que pode favorecer a recolonização dos mesmos por espécies de bactérias, actinomicetos ou fungos com elevado potencial de competição, os quais poderão interagir com fungos ectomicorrízicos, também recolonizadores ou inoculados artificialmente, influenciando a formação e o desenvolvimento das ectomicorrizas.

No rizoplane de *Pinus radiata*, o efeito de bactérias sobre a colonização deste por fungos ectomicorrízicos variou de redução até o estímulo de desenvolvimento. Uma *Pseudomonas* fluorescente reduziu em 20% a colonização das raízes por todos os fungos ectomicorrízicos testados, em relação ao controle não inoculado pela bactéria. Em contrapartida, um isolado de *Bacillus* sp. da micosfera de *Rhizopogon luteolus* estimulou a colonização em 158% em relação ao controle (BOWEN & THEODOROU, 1979).

A adição de uma suspensão de solo ao substrato vermiculita autoclavado e inoculado com fungos ectomicorrízicos aumentou, significativamente, a formação de micorrizas por *Laccaria bicolor* e *P. tinctorius* em *Pinus banksiana* e o comprimento das plântulas em comparação às mudas micorrizadas sem a suspensão (McAFEE & FORTIN, 1988).

Há evidências de que fungos do solo também podem inibir a formação de ectomicorrizas *in vitro* e *in vivo*. Dentre dez espécies de fungos testadas quanto à habilidade em inibir a micorrização em plântulas de *Picea mariana*, *in vitro*, por *Laccaria bicolor*, seis permitiram que se formassem ectomicorrizas de forma idêntica aos controles, inoculados apenas com *L. bicolor*, entre eles *Fusarium proliferatum* e *Penicillium spinulosum*. Quatro espécies

inibiram o desenvolvimento de micorrizas: *Tolypocladium inflatum*, *Tolypocladium beigellii*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma polysporum*. As duas espécies de *Trichoderma* foram as mais antagônicas à *Laccaria bicolor*, provavelmente por antibiose, pois em meio de cultura não foram encontrados indícios de micoparasitismo (SUMMERBELL, 1987).

BUENO (1994) verificou a existência de antagonismo de três isolados de *Trichoderma* spp., um isolado de *Penicillium* spp. e quatro isolados bacterianos, oriundos de três substratos comumente utilizados em viveiros florestais, em relação a *P. tinctorius*, através de pareamento em meio de cultura com ágar. Os três isolados de *Trichoderma* inibiram o desenvolvimento de *P. tinctorius*, por antibiose, não havendo indícios de parasitismo. Este efeito inibidor persistiu inalterado mesmo após autoclavagem, sendo decorrente de substâncias inibidoras termoestáveis produzidas por *Trichoderma*. Um dos isolados bacterianos também inibiu o desenvolvimento de *P. tinctorius*, enquanto que o isolado de *Penicillium* não apresentou qualquer modificação em relação ao controle. Porém, quando os mesmos grupos de microrganismos foram avaliados quanto à habilidade em inibir o desenvolvimento de ectomicorrizas por *P. tinctorius* em mudas de *Eucalyptus urophylla*, cultivadas em tubos de ensaio contendo vermiculita-esfagno e solução nutritiva, os isolados de *Trichoderma* continuaram apresentando forte efeito inibidor e o isolado de *Penicillium* também inibiu a formação ectomicorrízica, mas em menor intensidade. Dos quatro isolados bacterianos, nenhum influenciou a micorrização em *E. urophylla*. Os substratos utilizados em viveiro podem ser colonizados por espécies de *Trichoderma* e de *Penicillium*, que podem ser potencialmente inibidoras do desenvolvimento de ectomicorrizas em espécies de eucalipto.

2.3. O gênero *Trichoderma*

Espécies de *Trichoderma* são abundantes em solos de florestas de coníferas e de folhosas, sendo um dos componentes mais numerosos da microbiota (WIDDEN, 1979). Formam, em meio de cultura, colônias de aspecto compacto a flocoso, de coloração amarela a verde-escura, de rápido crescimento micelial, com muitos conidióforos, geralmente agregados em tufo, e suas células conidiógenas ou fiáides têm o formato de “garrafas” (BISSET, 1984).

Também são consideradas recolonizadoras vigorosas e pioneiras de solos desinfestados (BLISS, 1951; WARCUP, 1957; MUGHOGHO, 1968; BAKER, 1968; HENIS et al, 1979; MAROIS et al, 1981; SIVASITHAMPARAM et al, 1987). Por sua conhecida capacidade de produzir um grande número de antibióticos (DENNIS & WEBSTER, 1971; WIDDEN, 1984) e de degradar substratos complexos como celulose (MANDELS, 1975), quitina e lignina (BLACK & DIX, 1976) podem exercer importante papel na reciclagem de nutrientes no solo. Recentes estudos elegem o gênero como um dos mais promissores agentes de controle biológico de patógenos de plantas (GIBBS & SMITH, 1978; HADAR et al, 1979; HARMAN et al, 1981; PAPAVIZAS, 1985; LEWIS & PAPAVIZAS, 1985; BENHAMOU & CHET, 1993).

Os principais mecanismos de antagonismo exercidos por *Trichoderma* spp. são a antibiose, pela produção de antibióticos voláteis ou não (DENNIS & WEBSTER, 1971), a degradação de paredes de células fúngicas, através da produção de vários tipos de enzimas extracelulares (MANDELS, 1975; BLACK & DIX, 1976; ELAD et al, 1982) , o micoparasitismo, onde hifas de *Trichoderma* entrando em contato com hifas de outros fungos podem enrolar-se ao longo destas, causando danos como alteração da parede celular, retração da membrana plasmática da parede e, num último estágio, o extravazamento do

conteúdo citoplasmático do fungo hospedeiro (WELLS et al, 1972; BENHAMOU & CHET, 1993) e competição (WIDDEN, 1984; WIDDEN & SCATTOLIN, 1988).

Por definição, “micoparasitismo é o parasitismo de um fungo por outro” (HAWKSWORTH et al, 1983), podendo abranger relações biotróficas, onde o parasita se utiliza apenas do conteúdo citoplasmático de hospedeiros vivos como fonte de nutrientes e relações necrotróficas, que envolvem o aproveitamento da biomassa de hospedeiros mortos. No solo, porém, é difícil distinguir os efeitos do antagonismo direto, envolvendo enrolamento e penetração de hifas ou secreção de antibióticos deletérios ao hospedeiro, e do antagonismo indireto, como a competição durante a colonização do substrato. O sucesso de *Trichoderma* spp. como antagonista e grande competidor nos solos é atribuído ao fato deste gênero reunir em si todos os tipos de relações antagonísticas já descritos (JEFFRIES & YOUNG, 1994).

No entanto, é pequeno o conhecimento sobre a ecologia de espécies individuais de *Trichoderma*, devido às dificuldades taxonômicas encontradas para esse gênero, que foram amenizadas após a revisão de RIFAI (1969). Levantamentos sobre a distribuição de *Trichoderma* spp. em solos de florestas naturais e investigação dos fatores que podem afetá-la (WIDDEN & ABTIBOL, 1980; WIDDEN, 1986; WIDDEN & HSU, 1987), demonstraram que cada espécie tem um modelo diferente de abundância sazonal (WIDDEN & ABTIBOL, 1980) e apresenta preferências por diferentes tipos de solos (WIDDEN, 1986).

Várias espécies de *Trichoderma*, cultivadas em laboratório a diferentes temperaturas, apresentam crescimento ótimo a 25°C ou mais (WIDDEN, 1984). Amostras de solo de uma plantação de *Picea abies*, ao sul de Quebec, Canadá, foram avaliadas quanto à frequência de diferentes espécies de *Trichoderma* e as mesmas foram identificadas segundo a chave proposta por RIFAI (1969), em função de diferentes épocas do ano e, conseqüentemente,

diferentes temperaturas. O pH do solo foi mantido ao redor de cinco, durante o período de amostragens. As espécies mais comumente encontradas foram *Trichoderma polysporum*, *T. viride* e *T. koningii*. Em baixas proporções, foram isoladas *T. hamatum*, *T. pseudokoningii*, *T. harzianum* e *T. longibrachiatum*. A população total do gênero foi maior à temperatura de $19\pm 2^{\circ}\text{C}$, permanecendo alta até o início do inverno, durante o qual foi bem baixa, a uma média de $- 25^{\circ}\text{C}$, até a chegada da primavera, havendo algumas variações entre cada uma das espécies avaliadas (WIDDEN & ABTIBOL, 1980).

Após quinze dias da ocorrência de um ciclone e de chuvas fortes em Orissa, Índia, foram recolhidas amostras de esporos do ar e quantificados e qualificados aqueles viáveis em meio de cultura. O número de esporos total aumentou, gradativamente, na segunda semana após as chuvas, sendo que *Trichoderma viride* apareceu apenas na quarta semana, precedido por *Aspergillus niger* e *Cladosporium cladosporioides*. Concluiu-se que as chuvas fortes exerceram alto impacto sobre a concentração de esporos no ar, alterando a distribuição de espécies de *Trichoderma* e dos demais fungos no ambiente (PANDA & BEHERA, 1991).

O efeito de diferentes teores de umidade do solo sobre a população de *Trichoderma* spp. é significativo. Segundo WU (1986), em três tipos de solos - arenoso, de aluvião e argiloso - não houve diferenças nas populações de *Trichoderma* spp.. Quando a cada solo foram adicionados diferentes volumes de água, os resultados variaram entre os tratamentos, ou seja, a população de *Trichoderma* spp. foi menor em solo arenoso a 5% de umidade enquanto que *T. harzianum* e *T. pseudokoningii*, no mesmo tipo de solo, mas a 15% de umidade, apresentaram populações elevadas.

SCHONHAR (1991) investigou a microbiota associada a talhões de *Picea abies* e *Fagus sylvatica*, com sessenta a oitenta anos de idade, em solos

muito, moderadamente ou pouco ácidos e, também, em solos neutros. Cinco espécies de *Trichoderma* foram encontradas, sendo *T. viride* dominante em solos muito ácidos e *T. hamatum* naqueles moderadamente ácidos a neutros. *Trichoderma polysporum* foi relativamente indiferente à reação do solo. *Trichoderma piluliferum* e *T. koningii* foram encontrados apenas ocasionalmente.

As estratégias de competição e de antagonismo de cinco espécies de *Trichoderma*, combinadas entre si e com um patógeno de espécies arbóreas florestais, *Botrytis cinerea*, foram avaliadas em laboratório sob diferentes temperaturas. Quatro espécies de *Trichoderma*, as quais *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. polysporum* e *T. viride*, foram plaqueadas sobre celofane em meio de extrato de malte a 2% com ágar e incubadas a 5, 10, 15, 20 ou 25° C, por 14, 7, 4, 2 e 2 dias, respectivamente. Após a diálise da membrana de celulose, as colônias de *Trichoderma* foram removidas das placas, as quais receberam, então, discos de inóculos das quatro espécies de *Trichoderma* para cada espécie previamente desenvolvida em cada placa, com a finalidade de se avaliar a capacidade de cada uma delas em inibir o desenvolvimento das outras. A inibição de crescimento de *Botrytis cinerea* foi de 100% por *T. koningii*, *T. polysporum* e *T. viride* a todas as temperaturas, não havendo inibição por *T. hamatum*. A temperatura também afetou a habilidade de espécies de *Trichoderma* em inibir outras do mesmo gênero. *T. polysporum* inibiu todas as outras espécies a todas as temperaturas, enquanto que *T. hamatum* e *T. viride* causaram a menor inibição das demais espécies. O efeito da temperatura, todavia foi complexo, com *T. hamatum* tendendo a ser menos inibido a altas temperaturas (acima de 15° C), não importando o inibidor envolvido, sendo que *T. polysporum* e *T. viride* demonstraram ser menos inibidos a baixas temperaturas. Quando cultivadas conjuntamente em composto de *Picea abies*, *T. polysporum* e *T. viride* foram as espécies menos isoladas, indicando menor poder competitivo (WIDDEN &

SCATTOLIN, 1988), o que contradiz os resultados de WIDDEN (1984) em estudo similar. A competição entre as espécies deve estar intimamente relacionada à capacidade que cada uma possui de produzir diferentes antibióticos e enzimas extracelulares (WIDDEN & SCATTOLIN, 1988), bem como às diferentes razões de crescimento, características de cada espécie, e à habilidade da primeira espécie a colonizar o substrato em impedir outras que ali procurem se estabelecer (WIDDEN, 1984).

Espécies de *Trichoderma* demonstram-se potencialmente eficazes como agentes de controle biológico de doenças de plantas e inúmeras pesquisas têm sido realizadas nesta área. Mas poucos são os estudos sobre as possíveis interações entre este gênero ou outros microrganismos utilizados no controle biológico de doenças de plantas e as micorrizas arbusculares ou fungos ectomicorrízicos, que são presentes na maioria dos ecossistemas agrícolas e florestais. Há evidências de que não ocorra antagonismo apenas a patógenos de plantas, mas também aos microrganismos benéficos às mesmas. Todavia, fungos micorrízicos poderiam influenciar a atividade dos agentes de controle biológico, através de efeitos diretos ou indiretos sobre a microbiota associada à micorrizosfera (PAULITZ & LINDERMAN, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Experimento de viveiro

O experimento de viveiro foi instalado em 20 de novembro de 1995, permanecendo até 26 de fevereiro de 1996, em área do viveiro de produção de mudas de espécies florestais, junto ao Departamento de Ciências Florestais, ESALQ/USP.

Foram utilizados dois substratos: Plantmax[®] (EUCATEX), composto por casca de *Pinus* e turfa decompostas e vermiculita expandida, específico para uso florestal, e casca de eucalipto compostada, de uso corrente pelo viveiro no qual foi instalado o experimento, cujas análises químicas encontram-se no APÊNDICE 1.

A espécie de eucalipto utilizada foi *Eucalyptus citriodora*, por ter apresentado os melhores resultados de micorrização após a inoculação com *Pisolithus tinctorius*, *in vitro*, entre outras quatro espécies do mesmo gênero testadas por GALLI (1996).

Os substratos foram acondicionados em dez bandejas de isopor, próprias para a produção de mudas, cada uma com 128 células piramidais, base quadrada (3,5 x 3,5 cm) e altura de 12 cm, suspensas a 0,5 m do chão, sobre ripado de madeira. Cada bandeja representou uma parcela, dividida entre os

tratamentos primários tindalizado e não tindalizado e subdividida pelos tratamentos secundários com e sem muda de eucalipto. A sub-subdivisão foi feita pelos seis períodos de amostragens: quatro, seis, oito, dez, doze e quatorze semanas após a semeadura. As parcelas, as subparcelas e as sub-subparcelas foram distribuídas inteiramente ao acaso, ficando duas fileiras de células vazias entre as subparcelas, como bordadura. Foram utilizadas cinco repetições por substrato.

Durante a tindalização os substratos foram submetidos à temperatura de 100°C, por uma hora, em dois dias consecutivos (18 e 19 de novembro de 1995) em autoclave horizontal fechada com vapor fluente. Um dia depois, as subparcelas que deveriam apresentar mudas de eucalipto foram semeadas com três a quatro sementes por célula. A emergência das plântulas ocorreu sete dias após e um desbaste foi feito em 17 de dezembro, para que ficasse uma plântula por célula. As bandejas ficaram sob sombrite durante duas semanas após a semeadura.

Todas as parcelas receberam três adubações de cobertura com solução de sulfato de amônio e cloreto de potássio, nas proporções de 1 Kg e de 300g, respectivamente, para 100 litros de água, dos adubos em forma de pó solúvel. Após a aplicação da solução sobre as mudas, houve irrigação das parcelas por aspersão com a finalidade de se evitar a queima das folhas de eucalipto pelo contato direto com os adubos.

3.1.1. Quantificação de *Trichoderma* spp. e de outros fungos em substratos

Realizou-se uma amostragem inicial, a partir dos substratos não tindalizados e imediatamente após a tindalização, denominada de P_0 . Pesou-se 10 g de cada substrato, tindalizado ou não, e prosseguiu-se com a diluição em série dos mesmos, em 90 ml de água destilada estéril mantida sob agitação durante 30 min., para obtenção da diluição 10^{-1} , da qual uma alíquota de 1 ml foi diluída em 9 ml de água destilada estéril, para a diluição 10^{-2} e, assim, para a obtenção das diluições posteriores. Plaqueou-se a diluição 10^{-1} para os tindalizados (verificação da eficácia da tindalização) e as diluições 10^{-3} e 10^{-4} para os não tindalizados.

Iniciou-se, quatro semanas após a semeadura, uma sequência de seis amostragens P_4 , P_6 , P_8 , P_{10} , P_{12} e P_{14} com intervalos de duas semanas entre si. Como cada período era composto por três células, em cada subparcela, estas foram retiradas, misturadas entre si e peneiradas, quando apresentavam mudas, para separar as raízes dos substratos. A seguir foram pesados 10 g de substrato seco ao ar para diluição em série e plaqueamento das diluições 10^{-3} e 10^{-4} . Todos os plaqueamentos foram realizados a partir de 0,1 ml da diluição utilizada, com cinco repetições por diluição, em placas de Petri contendo meio de Martin ágar com antibiótico (APÊNDICE 2). Apenas em P_0 não foi adicionado antibiótico ao meio de cultura, para se avaliar o real efeito da tindalização como processo de desinfestação de substratos.

Os resultados foram calculados em número de propágulos viáveis de *Trichoderma* spp. e de todos os fungos (os quais incluíram *Trichoderma*) por grama de substrato, obtidos a partir da contagem das colônias por placa, considerando-se os valores da diluição que permitiu a visualização do maior número possível de colônias perfeitamente distinguíveis entre si.

O parâmetro número de propágulos fúngicos viáveis foi analisado estatisticamente, com a fixação dos períodos de amostragem, para cada substrato separadamente. Foram testados os fatores tindalização e eucalipto e a interação entre eles.

3.1.2. Quantificação de *Trichoderma* spp. e de outros fungos em raízes.

A quantificação de espécies de *Trichoderma* e de fungos isolados também das raízes das mudas cultivadas nos substratos teve por objetivo verificar se a interpretação dos resultados obtidos seria equivalente àquela relacionada aos mesmos períodos, para os isolamentos a partir dos substratos.

Das amostragens de Plantmax[®] e de casca de eucalipto compostada tindalizados e não tindalizados, com mudas de eucalipto, foram aproveitadas P₁₀, P₁₂ e P₁₄ para quantificação de *Trichoderma* spp. e de fungos nas raízes das mudas, as quais foram separadas do substrato no momento da peneiragem.

As raízes das três plantas amostradas por período, para cada subparcela, foram também misturadas, como ocorreu com os substratos, e cortadas em pedaços de um centímetro. Para Plantmax[®], pesou-se 1 g de raízes por tratamento, suspenso em 10 ml de água destilada estéril mantida sob agitação por 30 min., obtendo-se a suspensão 10^{-1} e prosseguiu-se igual à diluição em série para solo para obtenção das demais suspensões de raízes. Em casca de eucalipto compostada, foi pesado 0,5 g de raízes, suspenso em 5 ml de água destilada estéril mantida sob agitação por 30 min., para obtenção da suspensão 10^{-1} .

Para ambos os substratos, foram plaqueados 0,1 ml das suspensões de raízes 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , em placas de Petri contendo meio de Martin ágar com antibiótico (APÊNDICE 2), utilizando-se cinco repetições por suspensão.

Os resultados foram calculados em número de propágulos viáveis de *Trichoderma* spp. e de todos os fungos (inclusive *Trichoderma*) por grama de raiz, obtidos pela contagem de colônias na diluição que permitiu a visualização do maior número possível de colônias distinguíveis entre si.

O delineamento experimental adotado foi o de parcela sub-subdividida inteiramente casualizado, analisando-se os substratos separadamente. Foi feita a comparação das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), fixando-se cada período de amostragem, de P_4 a P_{14} . Com a fixação de cada período, os fatores analisados foram tinalização e presença de eucalipto, bem como as interações entre eles.

O parâmetro número de propágulos fúngicos viáveis foi analisado estatisticamente, com a fixação de cada período de amostragem, testando a interação do fator esterilização com cada um dos substratos.

3.1.3. Peso da matéria fresca da parte aérea e altura das mudas ao final do experimento

Em P_{14} , foram avaliadas quanto ao peso da matéria fresca e à altura as mudas formadas durante o experimento. Tomaram-se as quinze plantas de cada subparcela (três por repetição, no viveiro) para pesagem, em gramas, e medição da altura, em centímetros.

A análise estatística testou a influência dos fatores substrato e tinalização e a interação entre eles, sobre os valores de peso da matéria fresca e de altura das mudas de *Eucalyptus citriodora* formadas.

3.2. Avaliação do potencial de *Trichoderma* spp., isoladas durante o experimento de viveiro, em hiperparasitar *Pisolithus tinctorius*, *in vitro*

Durante o isolamento de microrganismos a partir dos substratos e das raízes de *Eucalyptus citriodora*, as colônias obtidas de *Trichoderma* spp. foram repicadas para placas de Petri com BDA (batata-dextrose-ágar), até a obtenção de culturas puras. A seguir, foram separadas em diferentes isolados que distinguiam entre si quanto à coloração das colônias e, tanto ao microscópio óptico quanto ao microscópio eletrônico de varredura, também diferiam quanto à morfologia das fiálides e dos conídios, durante a reprodução assexuada. Foram considerados, então, três isolados diferentes, denominados de TR₁, TR₂ e TR₃.

Os três isolados de *Trichoderma* spp. foram testados quanto ao potencial antagônico a dois isolados do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, identificados como 1604 e 1612, de basidiocarpos coletados em povoamentos de *Eucalyptus grandis* em Tupi, SP, e Mogi-Guaçu, SP, respectivamente.

Cada isolado de *Trichoderma* spp. foi pareado com cada um dos isolados de *Pisolithus tinctorius*, segundo metodologia utilizada por BARNETT & LILLY (1962), aqui adaptada. Em uma das extremidades de lâminas de vidro para observação ao microscópio óptico, esterilizadas e recobertas por uma camada de aproximadamente 5 mm de espessura de BDA, colocou-se um disco de 5 mm de diâmetro dos isolados 1604 e 1612, de *Pisolithus tinctorius*, sendo estas lâminas colocadas no interior de placas de Petri fechadas, sobre papel de filtro umedecido com 2 ml de água destilada estéril. As placas foram incubadas no escuro a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, por quinze dias, a fim de que as colônias de *P. tinctorius* atingissem um diâmetro médio de 2,5 cm. Esses isolados previamente crescidos foram pareados com cada um dos isolados de *Trichoderma*, TR₁, TR₂ e TR₃, os quais foram repicados para as extremidades opostas àquelas contendo o fungo ectomicorrízico, em discos de 5 mm de diâmetro, havendo cinco repetições para cada pareamento. Os papéis de filtro, no interior das placas, foram mantidos sempre úmidos durante o período de incubação, pela adição de 2 ml de água

destilada estéril, sempre que necessário. Após o pareamento, as placas foram mantidas por mais sete dias no escuro a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

As placas foram observadas, a olho nu, quanto à ocorrência de halo de inibição entre as colônias pareadas ou de sobreposição das colônias de *P. tinctorius* pelos isolados de *Trichoderma* spp. .Das colônias de *P. tinctorius* encobertas por *Trichoderma* spp. foram retirados discos de 10 mm de diâmetro e imediatamente submetidos à sequência de tratamentos necessários para que pudessem ser examinados, posteriormente, ao microscópio eletrônico de varredura, localizado no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica, ESALQ/USP, para verificação da ocorrência de indícios de hiperparasitismo entre os gêneros pareados.

Os discos de BDA retirados foram fixados por uma hora, em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% e cloreto de cálcio 0,001M, pH 7,2. Depois, passaram por três lavagens, de 10 min. cada uma, em tampão cacodilato 0,05M, e por uma pós-fixação, em tampão cacodilato 0,1M com tetróxido de ósmio (1:1), seguida por três lavagens rápidas em água destilada. A seguir, foram desidratados, permanecendo por 10 min. em cada uma das soluções de acetona 30%, 50%, 70% e 90%, e passando por três lavagens, de 10 min. cada uma, em acetona a 100%. Então, o material passou pelo aparelho de secagem ao ponto crítico Balzers CPD 030 e depois as amostras foram montadas em suportes (“stubs”) metálicos, de 1 cm de diâmetro, os quais foram submetidos à metalização com ouro, em evaporador Balzers MED 010.

As amostras assim tratadas foram minuciosamente analisadas ao microscópio eletrônico de varredura, sendo os pontos de interesse encontrados fotografados, com filme 120, Neopan SS, ASA 100, em câmara fotográfica SINAR 67, acoplada ao microscópio. Tanto a revelação dos filmes, para obtenção dos negativos, quanto as ampliações, em papel Kodabromide, foram realizadas no próprio Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento de viveiro

4.1.1. Quantificação de *Trichoderma* spp. e de outros fungos em substratos

Os resultados para a amostragem inicial, P_0 , foram obtidos pela contagem das colônias de *Trichoderma* spp. e de todos os fungos nos plaqueamentos da diluição 10^{-1} para Plantmax[®] e casca de eucalipto compostada tinalizados e nos plaqueamentos da diluição 10^{-3} para os substratos não tinalizados (Tabela 1).

Foi observada a eficiência do processo de tinalização para os dois substratos, pela eliminação de propágulos viáveis.

Inicialmente, a proporção de *Trichoderma* spp. em relação ao total de fungos em Plantmax[®] não tinalizado foi de 3,1% , enquanto que em casca de eucalipto compostada foi de 18%, demonstrando melhor adaptação dos isolados de *Trichoderma* ao segundo substrato.

Tabela 1 - Número de propágulos viáveis de *Trichoderma* spp. e de todos os fungos por grama de Plantmax[®] (PL) e de casca de eucalipto compostada (CE), tindalizados (T) ou não (NT), secos ao ar, em P₀

substratos	número de propágulos viáveis/g de substrato *	
	<i>Trichoderma</i> spp. x10 ³	fungos x10 ³
PLT	0	0
PLNT	2,7	85,0
CET	0	0
CENT	6,4	28,4

* Médias originais de cinco repetições

De P₄ a P₁₄, amostragens da quarta à décima quarta semana após a semeadura, a diluição de substrato adotada para a contagem das colônias de *Trichoderma* e de fungos foi sempre 10⁻³.

Aspergillus spp. e *Penicillium* spp. foram predominantes em todos os isolamentos, para ambos os substratos.

Espécies de *Trichoderma* foram isoladas esporadicamente, não seguindo o padrão dos demais fungos em todas as repetições plaqueadas. Para Plantmax[®], tindalizado ou não, com ou sem mudas de eucalipto, foram isoladas colônias de *Trichoderma* spp. em algumas amostragens, não ultrapassando 3x10⁴ propágulos viáveis por grama de substrato seco ao ar. Em casca de eucalipto compostada, foi isolada uma média de 12x10⁴ propágulos viáveis, apenas em P₁₂ e P₁₄, para todas as combinações dos níveis dos fatores avaliados.

Tais resultados não trazem nenhum esclarecimento sobre uma possível influência da rizosfera de *Eucalyptus citriodora* na dinâmica

populacional de espécies de *Trichoderma* presentes nos substratos, durante a fase de formação das mudas e também contrariam a idéia deste gênero como recolonizador vigoroso e pioneiro de substratos desinfestados (BLISS, 1951; WARCUP, 1957; MUGHOGHO, 1968; SIVASITHAMPARAM et al, 1987).

A temperatura não deve ter sido fator limitante à viabilidade dos propágulos de *Trichoderma* spp. nos substratos, uma vez que, durante o período de amostragens, sua média não foi inferior a 23°C (Figura 1) e, segundo WIDDEN (1984), a maioria das espécies de *Trichoderma* apresenta crescimento ótimo ao redor de 25°C. Conforme as análises químicas dos substratos (APÊNDICE 1), inicialmente o pH dos substratos também não seria fator limitante, sendo próximo da neutralidade ou ligeiramente ácido, mas a lixiviação ocorrida principalmente em dezembro e janeiro, devido às chuvas (Figura 1), pode ter aumentado a acidez dos substratos, inviabilizando esporos de espécies ali presentes, mas sensíveis à variação do pH de acordo com observações feitas por SCHONHAR (1991). Segundo PANDA & BEHERA (1991), a ocorrência de chuvas diminui a concentração de esporos de *Trichoderma* spp. no ar, o que teria dificultado a colonização dos substratos.

Considerando-se que a produção de mudas de eucalipto, em escala comercial, é geralmente realizada em condições de viveiro então, em épocas de temperaturas elevadas, que favoreceriam a colonização dos substratos por espécies de *Trichoderma*, a ocorrência de chuvas fortes e contínuas, normalmente associadas às altas temperaturas, poderia afetar de forma negativa as populações de *Trichoderma* presentes no local.

No substrato Plantmax[®] (Tabela 2) houve influência positiva da interação planta e processo de tinalização sobre as populações fúngicas em cinco dos seis períodos analisados. Na ausência da muda de eucalipto, os efeitos da interação entre substrato e tinalização foram variáveis entre os períodos.

Para o substrato casca de eucalipto compostada (Tabela 2) observou-se que, para a maioria dos períodos, houve maior número de propágulos viáveis de fungos no substrato não tindalizado, na ausência da planta, diferindo de Plantmax[®]. O efeito predominantemente positivo da rizosfera de *Eucalyptus citriodora* em interação com o processo de tindalização foi verificado tanto para casca de eucalipto compostada quanto para Plantmax[®].

De P₈ a P₁₄ nenhuma colônia fúngica foi isolada a partir de casca de eucalipto compostada tindalizada, na ausência de mudas. Porém, não se pode excluir a possibilidade de isolamento de fungos em diluições do substrato inferiores a 10⁻³, a qual foi utilizada para a contagem do número de colônias formadas.

O número de propágulos viáveis de fungos seria, neste caso, de grandeza inferior a 10⁻⁴.

Casca de eucalipto compostada não tindalizada apresentava, inicialmente, uma comunidade fúngica adaptada ao substrato e que foi eliminada com a tindalização (Tabela 1). Os recolonizadores, provavelmente, caracterizaram-se por baixo número de propágulos viáveis e baixas atividade metabólica, biomassa e adaptação ao tipo de substrato, rico em compostos de difícil degradação.

Como ocorreu em relação à quantificação de *Trichoderma* spp., as chuvas também podem ter exercido influência sobre a concentração de esporos de fungos no ar, contribuindo para diferentes resultados entre as mesmas interações dos fatores, no decorrer do experimento.

Figura 1 - Precipitação (mm) e temperatura média (°C) diárias, durante o período de instalação do experimento de viveiro, conforme dados do Departamento de Física e Meteorologia, ESALQ/USP.

Tabela 2 - Número de propágulos viáveis de fungos totais por grama de Plantmax[®] e de casca de eucalipto compostada, tinalizados (T) ou não (NT), com mudas de eucalipto (E) ou sem (SE), em cada um dos períodos de amostragem (P₄ a P₁₄).

Tratamentos	Períodos				
	P ₄	P ₆	P ₈	P ₁₀	P ₁₄
	x10 ⁴				
T					
(E)	181,03* a	44,63 a	72,65 a	34,29 a	41,93 a
(SE)	3,47 b	23,52 b	32,33 a	22,23 b	13,74 b
NT					
(E)	40,41 a	16,12 a	44,25 a	39,34 a	18,30 a
(SE)	16,26 b	22,48 a	23,55 a	14,29 b	15,85 a
T					
(E)	2,35 a	1,64 a	17,71 a	4,74 a	13,13 a
(SE)	1,49 b	4,12 a	<10 ⁴ b	<10 ⁴ b	<10 ⁴ b
NT					
(E)	7,94 a	8,71 a	3,10 a	9,43 a	6,97 a
(SE)	11,91 a	16,11 a	4,47 a	3,40 b	5,30 b

* médias originais

Em cada período, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, dentro de cada fator, pelo teste de Tukey (p < 0,05)

4.1.2. Quantificação de *Trichoderma* spp. e de outros fungos em raízes

A suspensão de raízes utilizada para a contagem das colônias isoladas foi 10^{-2} para os três períodos de amostragens, ou seja, P_{10} , P_{12} e P_{14} .

Para Plantmax[®], houve influência altamente significativa do processo de tinalização sobre a colonização das raízes por fungos, durante os três últimos períodos (Tabela 3) o que ocorreu com o substrato apenas em P_{12} e P_{14} (Tabela 2).

Raízes cultivadas em casca de eucalipto compostada apresentaram resultados inversos àqueles verificados para o isolamento a partir do substrato, em P_{10} e P_{14} . Em P_{12} , a interpretação dos resultados equivale à do substrato, para o mesmo período. Houve, portanto, predominância da influência positiva da tinalização nos isolamentos a partir das raízes (Tabela 3)

4.1.3. Peso da matéria fresca da parte aérea e altura das mudas ao final do experimento.

A interpretação dos resultados (Tabela 4) é a mesma para altura e para peso da matéria fresca, ou seja, não houve efeito significativo da tinalização sobre o desenvolvimento das plantas ou da interação substrato-tinalização para casca de eucalipto compostada e Plantmax[®]. Apenas entre os diferentes substratos obteve-se diferença altamente significativa entre os valores analisados, com mudas maiores e mais bem formadas em Plantmax[®]. Estes resultados devem estar

relacionados ao maior número de propágulos viáveis de fungos em Plantmax[®] cultivado com eucalipto em comparação aos valores obtidos para casca de eucalipto compostada também cultivada (Tabela 2).

Tabela 3 - Número de propágulos viáveis de fungos por grama de raízes, em Plantmax[®] (PL) e em casca de eucalipto compostada (CE), tinalizados (T) ou não (NT), em P₁₀, P₁₂ e P₁₄.

Interação		Períodos		
Substrato	Tindalização	P ₁₀	P ₁₂	P ₁₄
		x10 ³		
PL	(T)	115,02*a	92,04 a	81,91 a
	(NT)	69,36 b	21,57 b	41,70 b
CE	(T)	35,89 a	48,54 a	20,03 b
	(NT)	11,58 b	26,29 b	38,81 a

* Médias originais

Em cada período, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), na vertical

Tabela 4 - Altura (cm) e peso da matéria fresca (g) da parte aérea das mudas de *Eucalyptus citriodora* ao final do experimento, para Plantmax[®] (PL) e casca de eucalipto compostada (CE), tinalizados (T) ou não (NT)

Substratos	Altura (cm) *	Peso fresco (g) *
PL	28.30 a	5.63 a
CE	14.86 b	1.84 b

* médias de 30 plantas

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), na vertical

4.2. Avaliação do potencial de *Trichoderma* spp., isoladas durante o experimento de viveiro, em hiperparasitar *Pisolithus tinctorius*, *in vitro*

Os pareamentos entre os isolados TR₁, TR₂ e TR₃ de *Trichoderma* spp. e os isolados 1604 e 1612 de *P. tinctorius* apresentaram como resultado, em todas as repetições, a sobreposição das colônias de *P. tinctorius* por *Trichoderma* spp. avaliados inicialmente a olho nu.

Não houve ocorrência de halo de inibição entre todos os isolados pareados, em meio de cultura, contrariando observações feitas por BUENO (1994), que pareou outros isolados dos mesmos gêneros e verificou apenas antibiose entre eles.

(1994), que pareou outros isolados dos mesmos gêneros e verificou apenas antibiose entre eles.

Da observação das amostras retiradas dos pareamentos, ao microscópio eletrônico de varredura, primeiramente foi feita a distinção morfológica entre as hifas dos dois gêneros, a qual foi facilitada pela presença de grampos de conexão em *P. tinctorius*, para cada pareamento. Depois, procurou-se encontrar sinais de hiperparasitismo, tais como enrolamento de hifas hospedeiras por *Trichoderma* spp., estrangulamento ou perfuração das mesmas.

Resultados positivos ocorreram para os pareamentos 1604-TR₁ e 1612-TR₃, com o enrolamento de hifas de *P. tinctorius* por *Trichoderma* (Figura 2-a,b). Para 1612-TR₂, a hifa hospedeira enrolada apresentou sinais de estrangulamento (Figura 2c).

Nos demais pareamentos, verificou-se apenas a sobreposição das hifas do fungo ectomicorrízico pelas hifas dos isolados de *Trichoderma* spp., sem qualquer evidência de interação mais íntima entre elas.

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados mostraram-se capazes de hiperparasitar os dois isolados de *P. tinctorius* utilizados para os pareamentos, por enrolamento de hifas, em meio de cultura.

A não observação de resultados positivos quanto ao hiperparasitismo para todos os pareamentos não deve excluir a possibilidade de sua ocorrência, já que não houve crescimento totalmente uniforme dos diferentes isolados de *Trichoderma* spp. sobre aqueles de *P. tinctorius* no prazo pré-estabelecido para retirada das amostras a serem avaliadas. Se a análise de alguns pareamentos de crescimento mais lento das colônias fosse realizada dias depois, talvez pudessem ter sido encontrados sinais de hiperparasitismo. Porém, com o passar do tempo, há maior agregação micelial dificultando a observação microscópica.

Figura 2 - Enrolamento de hifas de *Pisolithus tinctorius* por hifas de *Trichoderma* spp.. **a)** isolados 1604 (*P. tinctorius*) e TR₁ (*Trichoderma* sp.) x2000; **b)** isolados 1612 (*P. tinctorius*) e TR₃ (*Trichoderma* sp.) x3000; **c)** isolados 1612 (*P. tinctorius*) e TR₂ (*Trichoderma* sp.) x2000

Considerando-se que as amostras analisadas representavam apenas uma pequena porção das colônias de *P. tinctorius* encobertas , retiradas aleatoriamente de cada repetição dos pareamentos, é possível que pudesse haver maior interação entre hifas em outros locais das colônias não amostrados.

O método de pareamento foi utilizado , inicialmente, com o intuito de induzir as espécies de *Trichoderma* ao hiperparasitismo, pois suas colônias teriam apenas uma fina camada de BDA, com as dimensões de uma lâmina de vidro, como fonte de nutrientes. Haveria, também, pouco espaço físico para a expansão das colônias, já que *P. tinctorius* ocupava, praticamente, a metade da superfície disponível, quando efetuou-se o pareamento.

Finalmente, se existem espécies de *Trichoderma* aptas a hiperparasitar diferentes isolados de *P. tinctorius*, tais resultados, obtidos *in vitro*, podem sugerir hipóteses do que ocorre em condições naturais. Se durante a formação de mudas de eucalipto, em viveiro, estas tiverem seus substratos colonizados por espécies de *Trichoderma* com potencial hiperparasita sobre *P. tinctorius*, a inoculação destas mudas com o fungo ectomicorrízico seria prejudicada.

5. CONCLUSÕES

Conclusões tiradas a partir do presente trabalho:

- espécies de *Trichoderma* estavam presentes tanto em Plantmax[®] como em casca de eucalipto compostada, substratos utilizados para a produção de mudas de eucalipto e, também, em raízes de *Eucalyptus citriodora*;
- raízes de *Eucalyptus citriodora* cultivadas em Plantmax[®] e casca de eucalipto compostada exerceram influência positiva sobre o número de propágulos viáveis de fungos presentes nestes substratos ;
- a interação entre Plantmax[®] e tinalização exerceu influência positiva sobre o número de propágulos viáveis de fungos isolados tanto do substrato quanto das raízes de *E. citriodora* nele cultivadas;
- o efeito da interação entre tinalização e casca de eucalipto compostada foi predominantemente positivo para os isolamentos a partir de raízes associadas à interação, o que não ocorreu com os isolamentos a partir dos substratos.

- três isolados de *Trichoderma*, obtidos a partir dos substratos e das raízes de *Eucalyptus citriodora*, apresentaram sinais de hiperparasitismo em relação aos dois isolados do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, em meio de cultura, por enrolamento de hifas. Não houve formação de halo de inibição entre as colônias pareadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACCHI, L.M.A. Desenvolvimento ectomicorrízico em mudas de *Eucalyptus urophylla* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* em viveiro comercial. Piracicaba, 1988. 81p. Dissertação (M.S) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- BAKER, R. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 6, p. 263-294, 1968.
- BARNETT, H.L.; LILLY, V.G. A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum*. **Mycologia**, v. 54, p. 72-77, 1962.
- BEHERA, N.; PATI, D.P.; BASU, S. Ecological studies of soil microfungi in a tropical forest soil of Orissa, India. **Tropical Ecology**, v. 32, n. 1, p. 136, 1991. Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, v. 3A, 1990-91.
- BELLEI, M.M.; CARVALHO, E.M. Ectomicorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N. (coord.). **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (SPCS), 1992. cap. 21, p. 297-319.

- BENHAMOU, N.; CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**, v. 83, p. 1062-1071, 1993.
- BERINGER, J.E.; BURGRAAF, J.P.; REDDELL, P.; TURNER, G. The role of mycorrhizas in growth and prospects or producing modified strains of mycorrhizal fungi. In: DAY, P.R.; JELLIS, G.J. (Ed.). **Genetics and plant pathogenesis**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987. p. 91-100.
- BETTIOL, W.; KRÜGNER, T.L. Influência da matéria orgânica na formação de ectomicorizas em mudas de *Pinus* por *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, p. 619-624, 1986.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 924-931, 1984.
- BLACK, R.L.B.; DIX, N.J. Utilization of ferulic acid by microfungi from litter and soil. **Transaction of the British Mycological Society**, v. 66, p. 305-311, 1976.
- BLISS, D.E. The destruction of *Armillaria mellea* in citrus soils. **Phytopathology**, v. 41, p. 665-683, 1951.
- BOUDARGA, K.; LAPEYRIE, F.; DEXHEIMER, J. A technique for dual vesicular-arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal infection of *Eucalyptus* “*in vitro*”. **New Phytologist**, v. 114, p. 73-76, 1990.

- BOUGHER, N.L.; MALAJCZUK, N. Effects of high soil moisture on formation of ectomycorrhizas and growth of karri (*Eucalyptus diversicolor*) seedlings inoculated with *Descolea maculata*, *Pisolithus tinctorius* and *Laccaria laccata*. **New Phytologist**, v. 114, p. 87-91, 1990.
- BOWEN, G.D.; THEODOROU, C. Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. **Soil Biol. Biochem.**, v. 11, p. 119-126, 1979.
- BUENO, J.T. Efeito inibidor de microrganismos do solo no desenvolvimento de ectomicorrizas em mudas de *Eucalyptus urophylla* inoculadas “*in vitro*” com *Pisolithus tinctorius*. Piracicaba, 1994. 72 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. 1. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 25-39, 1971.
- ELAD, Y.; CHET, I.; BOYLE, P.; HENIS, Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. **Phytopathology**, v. 73, p. 85-88, 1982.
- GALLI, M.A. Efeito de diferentes fontes de matéria orgânica no desenvolvimento de ectomicorrizas em mudas de *Eucalyptus citriodora*. Piracicaba, 1996. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- GIBBS, J.N.; SMITH, M.E. Antagonism during the saprophytic phase of the life cycle of two pathogens of wood hosts, *Heterobasidium annosum* and *Ceratocystis ulmi*. **Annals of Applied Biology**, v.89, p. 125-128, 1978.
- HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of **Rhizoctonia solani** damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 69, p. 64-68, 1979.
- HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. **Mycorrhizal symbiosis**. New York: Academic Press, 1983.
- HARMAN, G.E.; CHET, I.; BAKER, R. Factors affecting *Trichoderma harman* applied to seeds as a biocontrol agent. **Phytopathology**, v. 71, p. 569-572, 1981.
- HAWKSWORTH, D.L.; SUTTON, B.C.; AINSWORTH, G.C. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi**. 7^a ed. Wallingford: CAB International. 1983. 445p.
- HENIS, Y.; ELAD, Y.; CHET, I.; HADAR, Y.; HADAR, E. Control of soil-borne plant pathogenic fungi in carnation, strawberry and tomato by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 39, p. 1031, 1979.
- JEFFRIES, P.; YOUNG, T.W.K. **Interfungal Parasitic Relationships**. Wallingford: CAB International. 1994. 296 p.

- KRÜGNER, T.L. Ectomicorrizas: caracterização, produção de inóculo e inoculação. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1, Lavras, 1985. **Anais**. Lavras: FAEPE, 1986. p.138-141.
- LAI, P.; BRUEHL, G.W. Antagonism among *Cephalosporium gramineum*, *Trichoderma* spp. and *Fusarium culmorum*. **Phytopathology**, v. 58, p. 562-566, 1968.
- LE TACON, F.; NELSON, E.B.; HARMAN, G.E.; HOCH, H.C. The use of mycorrhizas in temperate and tropical forests. **Simbiosis**, v. 3, p. 179-206, 1987.
- LEWIS, J.A.; PAPAVIDAS, G.C. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on populations of *Rhizoctonia solani* and the incidence of damping-off. **Phytopathology**, v. 75, p. 812-817, 1985.
- MALAJCZUK, N.; LAPEYRIE, F.; GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* "in vitro". 1. Mycorrhiza formation in model systems. **New Phytologist**, v. 114, p. 627-631, 1990.
- MANDELS, M. Microbial sources of cellulose. In: WILKE, C.R. (Ed.). **Cellulose as a chemical and energy resource**. Wiley, New York: 1975. p.81-105.
- MAROIS, J.J.; MITCHELL, D.J.; SONODA, R.M. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato under field conditions. **Phytopathology**, v. 71, p. 1257-1260, 1981.

- MARX, D.H. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 23, p. 217-223, 1977.
- MARX, D.H. Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. In: MIKOLA, P. **Tropical Mycorrhiza Research**. Oxford, 1980. 270p.
- MARX, D.H. Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age and reisolation. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 11, p. 168-174, 1981.
- MARX, D.H.; CORDELL, C.E.; KENNEY, D.S. et al. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* an inoculation techniques of development of ectomycorrhizae on bare-root tree seedlings. **Forest Science**, Monograf, 1984. 25 p.
- McAFEE, B.J.; FORTIN, J.A. Comparative effects of the microflora on ectomycorrhizal inoculation of conifer seedlings. **New Phytologist**, v. 108, p. 443-449, 1988.
- MENGE, J.A. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. **VA Mycorrhiza**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1984. p. 187-203.
- MUGHOGHO, L.K. The fungus flora of fumigated soil. **Transactions of the British Mycological Society**, v.51, p. 441-459, 1968.

- OLIVEIRA, V.L. de. Controle biológico da podridão branca do alho, causada por *Sclerotium cepivorum* Berk., utilizando *Trichoderma harzianum* Rifai, sob condições controladas. Viçosa, 1982. 50 p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal de Viçosa.
- PANDA, T.; BEHERA, N. Seasonal incidence and succession of fungal spores in air after rain fall. **Acta Botanica Indica**, v. 19, n. 1, p. 136-138, 1991. Resumo em **CAB-Abstracts on CD-ROM**, v. 3A, 1990-91.
- PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p. 23-54, 1985.
- PAULITZ, T.C.; LINDERMAN, R.G. Mycorrhizal interaction with soil organisms. In: ARORA, D.K.; RAI, B.; MUKERJI, K.G.; KNUDSEN, G.R. (Ed.). **Handbook of applied mycology**. New York: Narcel Dekker, 1991. v. 1, p. 77-129.
- RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, n. 116, p. 1-56, 1969.
- SCHONHAR, S. Ocurrance of species of the fungus genus *Trichoderma* in soil of various forest sites. **Allgemeine Forst und Jagdzutung**, v. 162, n. 11-12, p. 234-235, 1991. Resumo em **CAB-Abstracts on CD-ROM**, v. 3A, 1990-91.

- SIVASITHAMPARAM, K.; MacNISH, G.C.; FANG, C.S.; PARKER, C.A. Microflora of soil and wheat rhizosphere in a field following fumigation. **Australian Journal of Soil Research**, v. 25, n. 4, p. 491-498, 1987.
- SUMMERBELL, R.C. The inhibitory effects of *Trichoderma* species and other soil microfungi on formation of mycorrhiza by *Laccaria bicolor* “*in vitro*”. **New Phytologist**, v. 105, p. 437-448, 1987.
- TRAPPE, J.M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. **Annual Review of Phytopathology**, v. 15, p. 203-222, 1977.
- VIDA, J.B. Obtenção de ectomicorrizas em mudas de *Eucalyptus* a partir de “plantlets” e plântulas inoculadas “*in vitro*” com *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch. Piracicaba, 1989. 177p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- WARCUP, J.H. Chemical and biological aspects of soil sterilization. **Soils Fertilizers**, v. 20, p. 1-5, 1957.
- WELLS, H.D.; BELL, D.K.; JAWORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v. 62, p. 442-447, 1972.
- WIDDEN, P. Fungal populations from forest soils in Southern Quebec. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1324-1331, 1979.

- WIDDEN, P. The effects of temperature on competition for spruce needles between sympatric species of *Trichoderma*. **Mycologia**, v.76, p. 873-883, 1984.
- WIDDEN, P. Microfungal community structure from forest soils in Southern Quebec, using discriminant function and factor analysis. **Canadian Journal of Botany**, v.64, p. 1402-1412, 1986.
- WIDDEN, P.; ABITBOL, J.J. Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. **Mycologia**, v. 72, p. 775-784, 1980.
- WIDDEN, P.; HSU, D. The effects of temperature and litter type on competition between *Trichoderma* species. **Soil Biol. Biochem.**, v. 19, p. 89-93, 1987.
- WIDDEN, P.; SCATTOLIN, V. Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. **Mycologia**, v. 80, n. 6, p. 795-803, 1988.
- WU, W.S. Effectiveness of soil texture, water contents and organic amendments on the growth of *Trichoderma* spp. and *Rhizoctonia solani*. **Memoirs of the College of Agriculture**, v. 26, n. 1, p. 70-80, 1986. Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1986.

APÊNDICE 2 - Composição do meio de Martin (modificado)

KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5 g
Peptona	5.0 g
Dextrose	10.0 g
Rose Bengal	0.033 g
Agar	20.0 g
Pentabiótico®	0.05 g
(após autoclavagem)	
Água	1000 ml