

EFEITO DA SERAPILHEIRA DE *Eucalyptus grandis* NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Pisolithus tinctorius* EM MEIO DE CULTURA

CELSO GARCIA AUER
WAGNER BETTIOL
C.P.G. em Fitopatologia - ESALQ-USP
13400 - Piracicaba - SP

ABSTRACT - The effects of aqueous extract of eucalypt litter incorporated in medium were studied at the concentrations of 0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10%, on the mycelial growth of two isolates of ***Pisolithus tinctorius*** obtained from commercial stands of ***Eucalyptus grandis***. The results showed that there was a direct relationship between extract concentration and inhibition of the mycelial growth expressed by colony diameter and dry weight biomass.

RESUMO - Foram estudados os efeitos das concentrações 0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10% do extrato aquoso de serapilheira de ***Eucalyptus grandis***, no crescimento micelial de dois isolados de ***Pisolithus tinctorius*** obtidos de talhões comerciais de ***E. grandis***. Os resultados mostraram a existência do relacionamento direto entre a concentração do extrato e a inibição no crescimento micelial, expresso pelo diâmetro das colônias e a produção de biomassa seca.

INTRODUÇÃO

Um dos principais fatores relacionados com a perfeita adaptação de espécies florestais a solos de baixa fertilidade é a presença de fungos simbioses, formadores de micorrizas. ***Pisolithus tinctorius*** pode ser encontrado em associação com ***Pinus*** spp. e com ***Eucalyptus*** spp.(MARX,1977). Esta associação, por sua vez, é influenciada por vários fatores, e dentre estes ALLISON (1973) destaca a importância da matéria orgânica .

BETTIOL (1984) e BETTIOL & KRÜGNER (1986a) verificaram que O aumento do teor de matéria orgânica no substrato de mudas de ***Pinus caribaea*** var. ***hondurensis***, estimulou o desenvolvimento das mudas, porém com inibição na formação de micorrizas por ***P. tinctorius*** e ***Thelephora terrestris***. A serapilheira da floresta pode tomar parte na nutrição de fungos, como sugeriu Melin (1957) citado por ASHTON (1976) cuja experimentação mostrou a transferência de carbono marcado, de folhas de eucalipto em decomposição, para a manta micelial de fungos micorrízicos.

Observações em povoamentos florestais de ***Eucalyptus***, que apresentam serapilheira em decomposição, indicam a dificuldade de se encontrar frutificações de ***P. tinctorius*** no interior dos talhões, sugerindo um possível efeito inibitório no desenvolvimento do fungo. Este possível efeito inibitório para o sistema ***Eucalyptus-Pisolithus*** foi proposto como principal objetivo deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada para o isolamento foi adaptada de YOKOMIZO (1981). Basidiocarpos parcialmente maduros foram coletados de talhões comerciais de **Eucalyptus grandis**, localizados no município de Mogi Guaçu, SP, pertencentes à Champion Papel e Celulose S/A.

Após corte da gleba do basidiocarpo, sob condições assépticas, peridólos parcialmente maduros foram retirados e transferidos para placas de Petri com BDA (batata-dextrose-ágar) e incubadas por uma semana a 25°C e posteriormente purificadas. As culturas puras foram repicadas para placas de Petri contendo BDA, nas quais serviram como fonte de inóculo.

Foram utilizados os isolados I-1 e I-2 obtidos a partir de diferentes basidiocarpos.

A coleta da serapilheira foi efetuada em talhão de **E. grandis**, localizado no Horto "Navarro de Andrade" no município de Rio Claro-SP, de propriedade da Ferrovia Paulista S.A. - FEPASA e consistiu de folhas, cascas e ramos de eucalipto. Segundo classificação de Miller (1974) citado por MASON (1980) o estágio de decomposição qualifica o material como "uma massa de fragmentos de vegetais sem mistura íntima com o solo mineral", na fase intermediária à total mineralização da matéria orgânica.

O extrato aquoso foi obtido pela autoclavagem da mistura serapilheira-água, na proporção 1:1 (v/v), durante uma hora a 120°C e posterior filtragem através de algodão com auxílio da bomba de vácuo.

No ensaio com meio sólido foram utilizados dois meios de cultura em ágar: meio de Melin-Norkrans modificado (MMN) por Marx (MARX,1969) e meio de Pachlewski(MP) utilizado por PACHLEWSKI (1974).

O extrato foi adicionado aos meios básicos (MMN e MP), nas proporções de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% e posteriormente autoclavados. O pH das soluções encontrava-se em torno de 6,0 antes da esterilização. Discos de micélio dos isolados I-1 e I-2 de **P. tinctorius** cultivados em BDA e incubados a 25°C, com 0,5 cm de diâmetro foram transferidos para o centro das placas com os respectivos substratos e colocados para incubação a 25°C no escuro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições.

O crescimento dos fungos foi avaliado através da determinação de dois diâmetros da colônia, perpendiculares entre si.

Como o desenvolvimento em meio sólido foi superior em MMN (Tabela 1) , este foi utilizado como meio líquido básico. Foi adicionado extrato aquoso de serapilheira nas proporções 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% (v/v), permanecendo o pH da solução entre 6,1 -6,4 antes da autoclavagem. Foram utilizados erlenmeyers de 250 ml, nos quais o volume de meio foi de 50 ml.

Dois discos de 0,5 cm de diâmetro dos isolados I-1 e I-2 de **Pisolithus tinctorius**, cultivados em BDA, foram transferidos para cada erlenmeyer e incubados, sem agitação, por 49 dias a 25°C, no escuro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições.

O desenvolvimento dos fungos foi avaliado através da pesagem da matéria seca, conforme método apresentado por FERGUS (1952) que consiste em filtrar o meio líquido em cadinho sinterizado e retirar as substâncias residuais solúveis, pela passagem de 3 lavagens sucessivas com 10 ml de água destilada quente e posterior secagem do cadinho mais a biomassa do fungo por 8 horas a 80°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando-se o crescimento micelial dos isolados de **Pisolithus tinctorius**, verificou-se que o meio de cultura MMN foi superior ao MP, sem interação significativa com a presença do extrato (Tabela 1). O isolado I-2 apresentou crescimento superior ao isolado I-1 em todas as concentrações de extrato de serapilheira testadas (Tabela 2).

Em todas as concentrações estudadas observou-se que o extrato de serapilheira (E.S.) inibiu o crescimento micelial de **P. tinctorius** (Tabela 1 e 2), quando comparadas as doses extremas, a inibição foi de 21,8% (Tabela 2). O efeito inibitório da adição de extratos de matéria orgânica em decomposição em meio de cultura sólido está em concordância com trabalhos de BETTIOL (1984).

TABELA 1. Efeito de meios de cultura e da concentração de extrato e serapilheira de eucalipto sobre o crescimento micelial (cm) de dois isolados de *Pisolithus tinctorius*, após 14 dias de incubação.

Concentração	Meio de Cultura	Diâmetro das colônias (cm)		Médias
		Isolados I-1	Isolado I-2	
0,0	MMN	b	a	3,23 A
		3,08	3,39	
	x	x		
	a	a		
MP	MP	2,86	2,94	2,90 B
		x	x	

	2,5	MMN	b	
2,35			3,10	
x		x		
b		a		
MP	MP	1,91	2,88	2,39 B
		y	y	

	5,0	MMN	b	
2,75			3,21	
x		x		
b		a		
MP	MP	2,53	3,19	2,85 A
		y	x	

	7,5	MMN	b	
2,79			3,11	
x		x		
b		a		
MP	MP	2,05	2,99	2,52 B
		y	x	

	10,0	MMN	a	
2,41			2,60	
x		x		
b		a		
MP	MP	2,10	2,48	2,28 B
		y	x	

	Médias		2,48 Y	

1 - Médias seguidas de mesma letra, médias de isolados dentro do mesmo tratamento meio de cultura / concentração de extrato com letras iguais sobre as mesmas e médias de meio de cultura / concentração de extrato dentro de isolados com letras iguais sob as mesmas não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%). Os valores foram obtidos da média de 4 repetições (placas de Petri).

TABELA 2. Efeito da concentração do extrato de serapilehira de eucalipto sobre o crescimento micelial (cm) de dois isolados de *Pisolithus tinctorius*, em meio MMN e MP, após 14 dias de incubação.

Isolado	Concentração (%)					Médias
	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0	
I-1	2,97a	2,13d	2,64b	2,42bc	2,26cd	2,48B
I-2	3,16x	3,20x	2,99x	3,05x	2,54y	2,99A

1 - Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%). Os valores foram obtidos da media de 8 observações (4 placas para cada meio estudado).

A inibição do crescimento micelial dos isolados foi diretamente proporcional à quantidade de E.S. no meio de cultura. Esta mesma tendência foi verificada por BETTIOL (1984) e BETTIOL E KRÜGNER (1986b).

Verificou-se ainda a inexistência de diferenças estatísticas entre a testemunha (dosagem 0%) e as menores concentrações de E.S., fato em concordância com TAN & NOPAMORN BODI (1979) os quais demonstraram que o ácido fúlvico em concentrações de 320, 640 e 1600 ppm, em meio MMN sólido, estimulou o crescimento de *P. tinctorius*, porém com efeito inibitório a 3.200 ppm.

McLOUGHLIN & KOSTER (1972) estudando o efeito de substâncias húmicas no crescimento de *Candida utilis* relataram que a fração húmica de turfa não causou benefícios nem inibição; os componentes isolados: ácido húmico, ácido fúlvico, ácido himatomelânico e humina não exerceram nenhum efeito sobre a levedura. Desta forma, há necessidade de se estudar o efeito da matéria orgânica no comportamento de fungos, dentre os quais os formadores de micorrizas, pois BETTIOL & KRÜGNER (dados não publicados) verificaram que o crescimento micelial de *Suillus granulatus* não foi influenciado nas concentrações de até 30% de extrato de acículas de *Pinus* em MMN agarizado e BETTIOL & KRÜGNER (1986b) verificaram a inibição do crescimento micelial de *P. tinctorius* e *T. terrestris* por extratos de matéria orgânica.

No segundo ensaio, o meio MMN na forma de meio líquido estacionário apresentou semelhante efeito de redução no crescimento do fungo, pela adição de E.S. (Tabela 3).

TABELA 3. Efeito da concentração do extrato de serapilheira de eucalipto na produção de biomassa seca (mg) de dois isolados de *Pisolithus tinctorius*, em meio líquido estacionário, após 49 dias de incubação.

Concentração (%)	Biomassa Seca (mg)		Médias
	Isolado I-1	Isolado I-2	
0,0	a	a	82,4 A
	95,5	69,2	
2,5	x	x	86,7 A
	a	a	
5,0	98,8	74,5	81,6 A
	x	x	
7,5	a	a	37,1 B
	102,7	60,5	
10,0	x	x	3,5 B
	b	a	
Médias	2,2	72,0	41,2 X
	y	x	
	a	a	51,5 X
	0,0	6,9	
	y	y	

1 - Médias seguidas de mesma letra, médias de isolados dentro de concentrações com letras iguais sobre as mesmas e médias de concentrações dentro de isolados com letras iguais sob as mesmas não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%). Os valores foram obtidos da média de 3 repetições (frascos de Erlenmeyer).

O comportamento dos isolados estudados foi diferenciado. O isolado I-1 apresentou maior produção de biomassa em baixas concentrações do extrato, porém sem apresentar diferença significativa, quando comparado com a testemunha (0% de E.S.). No entanto, nas concentrações 7,5 e 10% a biomassa produzida foi de 2,2 e 0,0 mg respectivamente. Com o isolado I-2 houve maior tolerância à presença do extrato de serapilheira, nas concentrações testadas, destacando-se seu desenvolvimento na maior concentração.

Notou-se tendência geral dos isolados produzirem maior quantidade de biomassa seca em concentrações menores do extrato e sendo inibido nas maiores.

Durante a etapa de coleta de basidiocarpos de **Pisolithus** nos talhões de eucalipto, foi observado que a maioria dos corpos de frutificação estavam localizados em pontos externos destes povoamentos, por vezes, nas estradas entre os talhões. No interior dos talhões, foi verificado que sua ocorrência era muito baixa. A distribuição dos basidiocarpos pode estar ligada ao efeito da serapilheira depositada sobre o solo da floresta, como foi discutido por TAN & NOPAMORBODI (1979), MASON (1980) e LAMB (1985), baseando-se no significado ecológico dos subprodutos da decomposição de material de origem vegetal. Os compostos húmicos, em quantidades superiores aos açúcares simples, podem servir como fonte de alimento para microrganismos específicos a este substrato e, por outro lado, promover efeitos inibitórios ao crescimento de fungos, inclusive micorrízicos (BURGER & LATTE, 1960 e MATHUR & PAUL, 1966).

Povoamentos florestais adultos de **Pinus** apresentam grande cobertura de acículas sobre o solo e normalmente, possuem o mesmo padrão de distribuição de basidiocarpos de **P. tinctorius**. A relação entre estes fatos, poderia ser explicada pela ação da serapilheira em decomposição sobre o desenvolvimento do fungo, pois BETTIOL (1984) registrou que acículas de **Pinus** reduziram o crescimento micelial **in vitro**, afetaram negativamente a sobrevivência do fungo e a associação micorrízica de mudas de **Pinus** em concentrações acima de 10%, incorporado ao substrato. Os resultados obtidos com o presente trabalho confirmam o similar efeito da serapilheira de eucalipto em reduzir o desenvolvimento de **P. tinctorius**, expresso na produção de basidiocarpos que pode estar relacionada com um menor desenvolvimento micorrízico.

São sugeridos maiores estudos na distribuição de basidiocarpos de fungos micorrízicos em povoamentos de diferentes idades e sua relação com a tolerância dos fungos à matéria orgânica. Estas informações podem ser importantes em programas que incluem a seleção de fungos micorrízicos e produção de inóculo, a partir dos presentes na floresta (KRÜGNER & TOMAZELLO FILHO, 1979).

BIBLIOGRAFIA

ALLISON, F.E., 1973. **Soil organic matter and its role in crop production**. Elsevier scientific Publishing Company, London, 637p .

ASHTON, D.H. , 1976. Studies on the mycorrhizae of **Eucalyptus regnans** F. Muell. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, 24: 723-41.

BETTIOL, W., 1984. Influência de algumas fontes de matéria orgânica na formação de ectomicorrizas em mudas de **Pinus caribaea** Morelet var. **hondurensis** Barret & Golfari pelos fungos **Pisolithus tinctorius** (Pers.) Coker & Couch e **Thelephora Terrestris** Ehr. ex Fr. Piracicaba, ESALQ/USP, 1984. 79p. (Dissertação de Mestrado).

BETTIOL, W. & KRÜGNER, T .L. , 1986a. Influência de algumas fontes de matéria orgânica na formação de ectomicorrizas em mudas de **Pinus caribaea** var. **hondurensis** pelos fungos **Pisolithus tinctorius** e **Thelephora terrestris**. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, 12(1-2): 39. (Resumo).

BETTIOL, W. KRÜGNER, T.L. 1986b. Influência de extratos de algumas fontes de matéria orgânica no crescimento micelial dos fungos ectomicorrízicos **Pisolithus tinctorius** e **Thelephora terrestris**. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, 12 (1-2): 38. (Resumo).

BURGES, A. & LATTER, P., 1960. Decomposition of humic acid by fungi. **Nature**, London, 186: 404-5.

FERGUS, C.L., 1952. The nutrition of **Penicillium digitatum** Sacc. **Mycologia**, Lancaster, 44: 183-99.

KRUGNER, T.L. & TOMAZELLO FILHO, M., 1979. Tecnologia da inoculação micorrízica em viveiro de **Pinus** spp. **Circular Técnica. IPEF**, Piracicaba, 71, 5p.

- LAMB, R.J., 1985. Litter fall and nutrient turnover in two eucalypt woodlands. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, 33: 1-14.
- MARX, D.H., 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections: I. Antagonism of mycorrhizal fungi and soil bacteria **Phytopathology**, Saint Paul, 59: 153-163.
- MARX, D.H., 1977. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizae fungus **Pisolithus tinctorius**. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, 23: 217-23.
- MASON, C.F., 1980. Decomposição. São Paulo, EPU-Ed. da Universidade de São Paulo. Temas de Biologia, V.18, 63p.
- MATHUR, S.P. & E.A. PAUL, 1966. A microbiological approach to the problem of soil humic acid structures. *Nature*, London, 212: 646-7.
- McLOUGHLIN, A.J. & KOSTER, E., 1972. The effect of humic substances on the respiration and growth of micro-organisms. I. Effects on the yeast *Candida utilis*. **Plant and Soil**. The Hague 37: 17-25.
- PACHLEWSKI, R. & PACHLEWSKA, J., 1974. Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of pine (***Pinus sylvestris*** L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure culture on agar. **Forest Research Institute**, Warsaw, Poland, 228p.
- TAN, K.H. & NOPAMORNBOON, V., 1979. Fulvic acid and the growth of the ectomycorrhizal fungus, ***Pisolithus tinctorius***. **Soil Biological and Biochemistry**, Oxford, 11: 651-3.
- YOKOMIZO, N.K.S., 1981. Associação ectomicorrízica de ***Pisolithus tinctorius*** (Pers.) Coker & Couch com espécies de ***Eucalyptus***. Piracicaba, ESALQ-USP, 58p. (Dissertação de Mestrado).