

Interação *in vitro* entre micorrizas de *Castanea sativa* e o patógeno *Phytophthora cinnamomi*

Rodrigues PC e Martins A.

CIMO – Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária de Bragança, Quinta de Sta. Apolónia, Apt. 1 172, 5301-855 Bragança, Portugal. prodrigues@ipb.pt

Resumo

Nas últimas décadas, o controlo biológico de doenças das plantas tem vindo a ganhar importância no sentido de reduzir os custos económicos e ambientais resultantes da aplicação sucessiva de produtos químicos. *Pisolithus tinctorius* é um importante micorriza ectomicorrizal de *Castanea sativa*, frequentemente referido como tendo um efeito positivo no controlo de *Phytophthora cinnamomi*. No entanto, os mecanismos subjacentes a este efeito não são conhecidos. O presente estudo teve como objectivo investigar o efeito de antagonismo de *P. tinctorius* contra *Ph. cinnamomi*.

A interacção entre os dois organismos foi testada em cultura dupla em placa de Petri. Os resultados mostram que, pelo menos para as condições testadas, não existe acção de antibiose de *P. tinctorius* contra *Ph. cinnamomi*, o que sugere outros mecanismos envolvidos, possivelmente de resposta de defesa das plantas.

Palavras-chave: *Pisolithus tinctorius*, *Phytophthora cinnamomi*, *Castanea sativa*, biocontrolo.

Summary

In the last decades, biocontrol of plant disease has been considered a viable way of reducing economic and environmental costs associated to chemical treatments. *Pisolithus tinctorius* is an important ectomycorrhizal macrofungus of *Castanea sativa*, known for its positive effect on the control of *Phytophthora cinnamomi*. However, the mechanisms underlying this effect have not been clarified. The present study aimed at investigating a possible effect of antibiosis of *P. tinctorius* against *Ph. cinnamomi*.

The interaction between the two organisms has been studied by dual culture tests. Results showed that there is no direct antibiosis effect, at least under test conditions, suggesting other mechanisms are involved, probably plant defense responses.

Key-words: *Pisolithus tinctorius*, *Phytophthora cinnamomi*, *Castanea sativa*, biocontrol.

Introdução

A doença da tinta, causada pelo Oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands., é uma das mais devastadoras doenças do castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill.), atingindo actualmente proporções epidémicas em Portugal (ABREU et al., 1999). O seu controlo por métodos químicos e por desenvolvimento de variedades resistentes tem-se mostrado ineficaz (SALESSES et al., 1993; ABREU et al., 1999), pelo que o desenvolvimento de formas alternativas de controlo da doença assume importância premente.

Os fungos micorrizais têm sido apontados como potenciais agentes de biocontrolo contra patógenos radiculares de várias espécies vegetais. A demonstração do papel protector dos fungos micorrizais contra agentes patogénicos foi feita pela primeira vez em 1969 por Marx e Davey em raízes de germinantes do género *Pinus* inoculadas com *Phytophthora cinnamomi* (MARX & DAVEY, 1969a, b). Posteriormente, diversas experiências, quer em condições

axénicas, quer em condições naturais, confirmaram o papel de vários fungos micorrízicos na indução de resistência às plantas hospedeiras: *Pisolithus tinctorius* (MARX, 1972, 1974; KOPE & FORTIN, 1989, 1990; MARTINS, 2004), *Paxillus* sp. (BUSCOT et al., 1992; DUCHESNE et al., 1998, 1989; BRANZANTI et al., 1999; YAMAJI et al., 2005), *Laccaria laccata* (BUSCOT et al., 1992; BRANZANTI et al., 1994, 1999), *Hebeloma* spp. (PERRIN & GARBAYE, 1983; VROT & GREENTE, 1985; BRANZANTI et al., 1994, 1999), *Boletus* sp. (VROT & GREENTE, 1985) *Glomus* spp. (ST-ARNAUD et al., 1997; BODKER et al., 1998; FILION et al., 1999; GUENOUNE et al., 2001; POZO et al., 2002). Segundo estes autores, a protecção pode ser conferida por diversos mecanismos: melhoria do estado nutricional das plantas; formação de uma barreira mecânica (rede de Hartig); produção de substâncias antibióticas; competitividade com o patógeno; hiperparasitismo; pré-indução de mecanismos de defesa da planta, aquando da colonização pelo fungo micorrízico; entre outras. Relativamente ao biocontrolo de *Ph. cinnamomi*, é possível encontrar em ERWIN & RIBEIRO (1996) e MARTINS (2004) revisões exaustivas de estudos sobre o uso de diversos agentes de biocontrolo em vários hospedeiros, mas são poucos os estudos dedicados à interacção entre *C. sativa*, fungos micorrízicos e *P. cinnamomi* (BRANZANTI et al., 1999; MARTINS, 2004).

Pisolithus tinctorius é um importante macrofungo ectomicorrízico de várias espécies florestais e agro-florestais (e.g. pinheiro, castanheiro, eucalipto), que alguns autores referem como tendo um efeito positivo no controlo de *Ph. cinnamomi* (MARX, 1972, 1974; KOPE & FORTIN, 1989, 1990; MARTINS, 2004). Num estudo de micorrização de plantas micropropagadas de *C. sativa*, Martins (2004) verificou que plantas previamente micorrizadas com *P. tinctorius* mostravam maior sobrevivência quando infectadas com *Ph. cinnamomi* do que plantas não micorrizadas, mas plantas inoculadas simultaneamente com *P. tinctorius* e *Ph. cinnamomi* registavam maior mortalidade. Efeitos contraditórios de fungos micorrízicos e de outros organismos usados como agentes de biocontrolo tinham já sido anteriormente descritos (revisão em ERWIN & RIBEIRO, 1996). Alguns autores referem ainda que, em solos contaminados com um agente patogénico, o papel protector dos fungos micorrízicos parece depender do intervalo de tempo que decorre entre a inoculação do fungo micorrízico e do agente patogénico, sendo muito baixo quando se faz simultaneamente (BUSCOT et al., 1992, STENSTRÖM et al., 1997, SINGH et al., 2000). Nesta conformidade, considera-se de vital importância o esclarecimento dos mecanismos e condições de interacção subjacentes ao efeito protector dos fungos micorrízicos, antes de poderem ser considerados agentes eficazes de biocontrolo.

Um dos mecanismos de biocontrolo mais estudados é o efeito antagonista entre organismos, por produção de substâncias antimicrobianas ou outros metabolitos extracelulares. Vários autores demonstraram o efeito antagonista de fungos micorrízicos contra patógenos radiculares, por produção de substâncias inibidoras do crescimento (e.g. KOPE & FORTIN, 1989, 1990; BRANZANTI et al., 1994; YAMAJI et al., 2005). O presente estudo teve como objectivo investigar o potencial antagonista de *P. tinctorius* sobre *Ph. cinnamomi*, em condições *in vitro* e na ausência da planta e de outros microrganismos.

Material e Métodos

Material biológico

O fungo ectomicorrízico usado foi *P. tinctorius* (Pers.) Coker and Couch isolamento 289/Marx, anteriormente identificado como conferindo tolerância de pinheiro e castanheiro a *Ph. cinnamomi* (MARX, 1974; MARTINS, 2004). A estirpe de *Ph. cinnamomi* usada foi isolada de um souto local (gentilmente fornecida por E. Gouveia, Escola Superior Agrária de Bragança). As culturas stock de *Pisolithus tinctorius* e *Phytophthora cinnamomi* foram mantidas em cultura axénica em caixa de Petri nos meios Melin & Norkrans Modificado (MMN) e Potato Dextrose Agar (PDA).

Teste de antagonismo *in vitro*

A interação *in vitro* entre *P. tinctorius* (Pt) e *Ph. cinnamomi* (Pc) foi testada por co-cultura de micélio em MMN e PDA em placa de Petri de 90 mm de diâmetro. Para tal, foram efectuadas as co-culturas Pt + Pc (inoculação simultânea) e Pt → Pc (inoculação de Pc uma semana após a inoculação com Pt). Como controlos foram usadas as co-culturas Pt + Pt (inoculação simultânea) e Pc + Pc (inoculação simultânea). A inoculação efectuou-se por transferência de inóculos com 5 mm de diâmetro, retirados da região periférica de colónias com 3 a 4 semanas de crescimento. Nas placas de Petri em que foi feita a inoculação desfazada, Pt foi inoculado com 7 dias de antecedência relativamente à inoculação com Pc. Em todas as co-culturas, os inóculos foram colocados a uma distância de 30 mm entre si. Foram efectuadas 6 repetições (placas) para cada co-cultura. As placas foram incubadas a 23 °C, no escuro.

Análise dos dados

Foi feita a medição diária dos 4 raios das colónias ao longo de uma semana, e a caracterização morfológica macroscópica e microscópica (com recurso ao microscópio invertido) dos microrganismos ao longo de duas semanas de contacto.

A análise dos resultados foi feita por comparação do raio de crescimento do patógeno em direcção ao fungo ectomicorrízico (raio interno, Ri) nas co-culturas Pt + Pc e Pt → Pc com os restantes raios de crescimento do patógeno nas mesmas placas e com o raio interno de crescimento do patógeno na cultura dupla Pc + Pc.

Os dados foram analisados usando o programa SAS 9.1. para Windows. Foi efectuada análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas entre tratamentos foram calculadas pelo teste de Tukey, para $P < 0,05$.

Resultados e discussão

Os resultados dos testes de antagonismo em MMN e PDA não revelaram qualquer efeito de antagonismo de Pt sobre Pc. Nas Figuras 1 e 2 encontra-se representada a evolução do crescimento das colónias de Pc (raio interno) em direcção ao organismo oposto. Como se pode verificar, nas placas de Pt + Pc (inoculação simultânea) e Pt → Pc (inoculação desfazada), independentemente do meio de cultura, o crescimento de Pc em direcção a Pt não sofreu qualquer limitação ou retardamento, quando comparado com o crescimento verificado nas co-culturas Pc + Pc (Figuras 1 e 2) e com o crescimento de Pc nos restantes sentidos (resultados não apresentados).

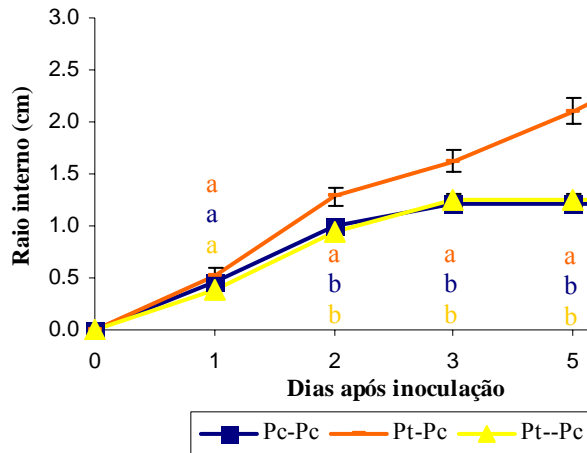


Figura 1. Valores médios (\pm SE, n=6) do raio interno (Ri) de Pc nos sistemas Pc + Pc, Pt + Pc e Pt \rightarrow Pc em meio PDA. Letras diferentes para o mesmo tempo representam diferenças significativas entre tratamentos (sistemas de co-cultura) para o teste de Tukey ($p < 0,05$); ns = diferenças não significativas.

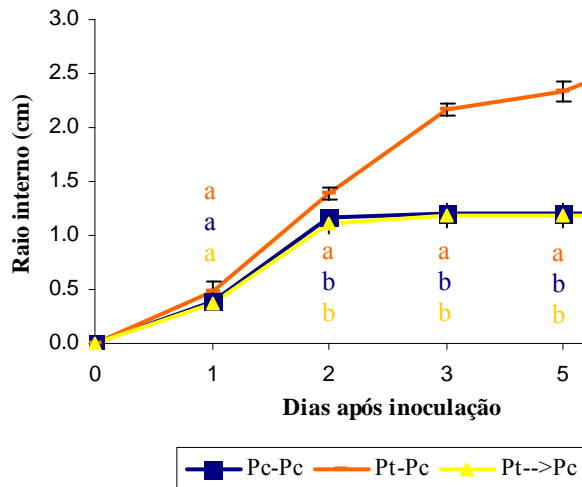


Figura 2. Valores médios (\pm SE, n=6) do raio interno (Ri) de Pc nos sistemas Pc + Pc, Pt + Pc e Pt \rightarrow Pc em meio MMN. Letras diferentes para o mesmo tempo representam diferenças significativas entre tratamentos (sistemas de co-cultura) para o teste de Tukey ($p < 0,05$); ns = diferenças não significativas.

Nas co-culturas Pc + Pc, registou-se um crescimento rápido de Pc em direcção à colónia oposta, com coalescência ao 3º dia e concomitante paragem de crescimento (Figuras 3a e 3d). Nas placas Pt + Pc (Figuras 3b e 3e), verificou-se um maior raio interno de Pc do que nas restantes co-culturas. Esta situação resulta do facto de o crescimento de Pt ser significativamente mais lento do que o de Pc, pelo que Pc cresceu sobre a colónia de Pt e ocupou toda a placa. Igual fenómeno se verificou na co-cultura Pt \rightarrow Pc (Figuras 3c e 3f). No entanto não foi passível de medição (que nas Figuras 1 e 2 se traduz na aparente paragem de crescimento após 3 dias de co-cultura), uma vez que neste caso a colónia de Pt possuía já maior desenvolvimento, sendo apenas possível verificar a sobreposição de crescimentos pela parte superior da placa. A Figura 3 permite ainda verificar que Pc produz, em qualquer das situações, colónias características, com crescimento rosáceo (revisão em ERWIN & RIBEIRO, 1996). No entanto, este efeito é mais marcado em

PDA, meio de cultura *standard* usado para estudo e caracterização deste Oomycete, do que em MMN.

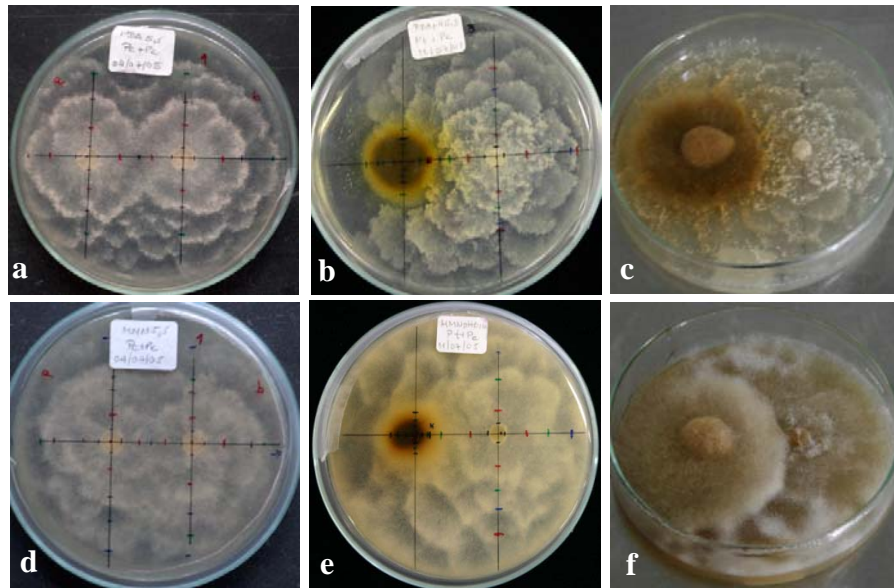


Figura 3. Aspectos morfológicos macroscópicos de Pc em PDA (em cima) e em MMN (em baixo), após 10 dias de co-cultura. (a) e (d) Co-cultura Pc + Pc; (b) e (e) co-cultura Pt + Pc; (c) e (f) co-cultura Pt → Pc.

No que respeita à caracterização morfológica microscópica de Pc, efectuada por observação ao microscópio invertido, não se verificou qualquer influência da presença de *P. tinctorius* na morfologia do micélio nem nas estruturas microscópicas do patógeno (Figura 4). No entanto, ocorrem diferenças no crescimento nos dois meios de cultura usados. Mais uma vez, o crescimento em PDA revela-se bastante mais característico do que em MMN, com micélio muito ramificado e corralóide, hifas com “inchaços” e clamidósporos abundantes com paredes finas e inserção nas hifas predominantemente terminal (revisão em ERWIN & RIBEIRO, 1996).

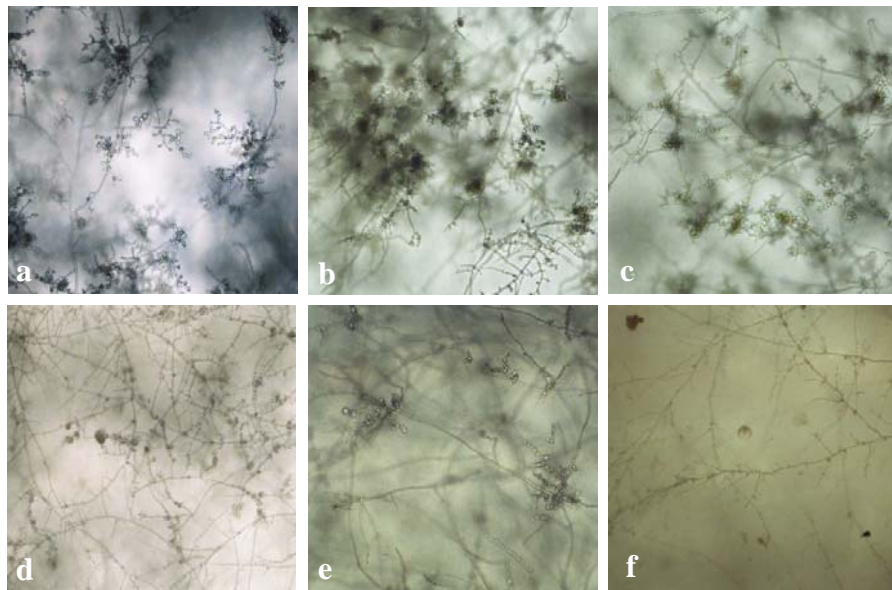


Figura 4. Aspectos morfológicos microscópicos de micélio de Pc em PDA (em cima) e em MMN (em baixo), com 10 dias de crescimento. (a) e (d) Co-cultura Pc + Pc; (b) e (e) co-cultura Pt + Pc; (c) e (f) co-cultura Pt → Pc.

Ao contrário do que foi verificado noutros estudos sobre o efeito antagónico de fungos micorrízicos no controlo de patógenos (e.g. KOPE & FORTIN, 1989, 1990; BRANZANTI et al., 1994; ST-ARNAUD et al., 1997; FILION et al., 1999; YAMAJI et al., 2005), os resultados aqui obtidos sugerem não existir acção de antagonismo de Pt contra Pc, pelo menos nas condições *in vitro* testadas. No entanto, o efeito positivo da micorrização com Pt na sobrevivência de plantas de *C. sativa* contaminadas com Pc foi verificado por MARTINS (2004) em viveiro. O aparente efeito de controlo de Pt sobre Pc em plantas micorrizadas deverá passar, neste caso, por outros mecanismos que envolvem a planta, por exemplo a produção de exudados radiculares (DUCHESNE et al., 1988, 1989) o reforço dos mecanismos de defesa da planta, resultante do aumento de produção de compostos fungistáticos de natureza fenólica (BUSCOT et al., 1992) ou de enzimas hidrolíticas (DUMAS-GADOT et al., 1996; POZO et al., 1999, 2002; SLEZACK et al., 1999); pelo aumento do vigor das plantas micorrizadas (BUSCOT et al., 1992; BRANZANTI et al., 1999) ou pela formação de manto (BRANZANTI et al., 1999).

Nos casos em que os estudos de antagonismo em condições laboratoriais sugerem o efeito antagónico entre um fungo micorrízico e um patógeno radicular, subsistem algumas dúvidas sobre a eficácia desse efeito em condições de campo. De facto, para a maioria dos estudos laboratoriais publicados, não se conhece a confirmação do efeito em condições de campo, o que compromete seriamente a viabilidade da utilização desses organismos como agentes de biocontrolo. Na verdade, e apesar de o uso de antagonismo contra *Phytophthora* ter sido, ao longo das últimas décadas, considerado uma abordagem promissora no biocontrolo deste patógeno, até ao momento não foi encontrado um agente antagónico comprovadamente eficaz no campo e sem efeitos deletérios para a planta. O desenvolvimento de um agente de biocontrolo eficaz contra este patógeno tem encontrado sérias dificuldades devido à sua capacidade de produção de vários tipos de inóculo (zoósporos, esporângios, clamidósporos, oósporos, micélio), a sua rapidez e eficácia na penetração e infecção da planta hospedeira, e a propensão para se instalar em camadas profundas do solo, permitindo-lhe escapar facilmente à maioria dos antagonistas (ERWIN & RIBEIRO, 1996). Esta última característica será particularmente significativa quando do uso de um fungo micorrízico como agente de biocontrolo, uma vez que estes se desenvolvem e distribuem preferencialmente nas camadas mais superficiais do solo.

Estão em curso estudos *in vitro* que envolvem a interacção *C. sativa* - *P. tinctorius* - *Ph. cinnamomi*, numa tentativa de esclarecimento dos mecanismos subjacentes ao efeito de biocontrolo anteriormente verificado em viveiro. Se se vier a verificar que o efeito de controlo nesta interacção se deve ao despoletamento de respostas de defesa da planta quando inoculada com o fungo micorrízico, e que assim predispõe a planta para uma maior tolerância ao patógeno, pode-se esperar um efeito de controlo mais consistente e eficaz em condições de campo.

Conclusões

O controlo biológico, fenómeno que explora os efeitos de um ou mais organismos contra um patógeno, tem vindo a ser considerado uma solução cada vez mais viável em patologia vegetal. Inúmeros organismos têm vindo a ser estudados como agentes de biocontrolo pelo seu efeito directo ou indirecto sobre o desenvolvimento de fitopatógenos radiculares, alguns apresentando resultados promissores. No entanto, no que respeita ao biocontrolo de *Ph. cinnamomi*, várias dificuldades têm surgido no desenvolvimento de agentes de biocontrolo comprovadamente eficazes em condições de campo.

O presente trabalho resulta da tentativa de elucidar o(s) mecanismo(s) subjacente(s) ao efeito positivo da micorrização de plantas de *C. sativa* com um importante fungo ectomicorrízico,

Pisolithus tinctorius, na sobrevivência e tolerância das plantas a *Ph. cinnamomi*. Um dos mecanismos de controlo a considerar passa pelo antagonismo entre os dois microrganismos. Nas condições do presente trabalho, foi possível constatar que o efeito da presença de *P. tinctorius* na redução da infecção das plantas não resulta de um efeito directo de antagonismo contra o patógeno, pelo que haverá outro(s) mecanismo(s) subjacente(s) a este efeito, provavelmente envolvendo de forma activa a planta.

Referências Bibliográficas

- ABREU, C.G., CARVALHO, L., GASPAR, M.J., GOMES, A.L., COLAÇO, J., CARDOSO, A.O. 1999. Assessment of resistance to chestnut ink disease. *Acta Horticulturae* 494, 363–367
- AZCON-AGUILAR, C., BAREA, J.M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464
- BODKER, L., KJOLLER, R., ROSENTHAL, S. 1998. Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mycorrhiza* 8: 169-174.
- BRANZANTI, M.B., ROCCA, E., PISI, A. 1999. Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza* 9: 103-109
- BRANZANTI, M.B., ROCCA, E., ZAMBONELLI, A. 1994. Influenza di funghi ectomicorrizici su *Phytophthora cambivora* e *P. cinnamomi* del castagno. *Mycol Ital* 1: 47-52.
- BUSCOT, F., WEBER, G., OBERWINKLER, F. 1992. Interactions between *Cylindrocarpon destructans* and ectomycorrhizas of *Picea abies* with *Laccaria laccata* and *Paxillus involutus*. *Trees*. 6: 83-90.
- DUCHESNE, L.C., ELLIS, B.E., PETERSON, R.L., 1989. Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*: contribution of oxalic acid. *Can. J. Bot.* 67: 2726-2730.
- DUCHESNE, L.C., PETERSON, R.L., ELLIS, B.E., 1988. Pine root exudates stimulates the synthesis of antifungal compounds by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol.* 108: 471-476.
- DUMAS-GADOT, E., SLESACK, S., DASSI, B., POZO, M.J., GIANINAZZI-PEARSON, V., GIANINAZZI, S. 1996. Plant hydrolytic enzymes (chitinases and β -1,3-glucanase) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms. *Plant Soil* 185: 211-221
- ERWIN, D.C., RIBEIRO, O.K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, USA.
- FILION, M., ST-ARNAUD, M., FORTIN, J.A. 1999. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytologist* 141: 525-533
- GUENOUNE, D., GALILI, S., PHILIPS, D.A., VOLPIN, H., CHET, I, OKON, Y., KAPULNIK, Y. 2001. The defense response elicited by the pathogen *Rhizoctonia solani* is suppressed by colonization of the AM-fungus *Glomus intraradices*. *Plant Science* 160: 925-932.
- KOPE HH & FORTIN JA, 1990. Antifungal activity in culture filtrates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can. J. Bot* 68: 1254-1259.

- KOPE, H.H., FORTIN, J.A. 1989. Inhibition of phytopathogenic fungi in vitro by cell free culture media of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 113: 57-63.
- MARTINS, A. 2004. *A micorrização controlada de Castanea sativa Mill.: Aspectos fisiológicos da micorrização in vitro e ex vitro*. Dissertação de Doutoramento em Biologia/Biotecnologia Vegetal, Faculdade de Ciências de Lisboa, 506 pp.
- MARX, D.H. 1972. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infection. *Ann. Review Phytopathol.* 10: 429-454.
- MARX, D.H. 1974. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Ann. Rev. Phytopathol.* 10: 429-454
- MARX, D.H., DAVEY, C.B. 1969a. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. III. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 59: 549-558.
- MARX, D.H., DAVEY, C.B. 1969b. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. IV. Resistance of naturally occurring mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 59: 559-565.
- PERRIN, R. GARBAYE, J. 1983. Influence of ectomycorrhizae on infectivity of *Pythium*-infested soils and substrates: *Plant and Soil* 71: 345-351.
- POZO, M.J., AZCÓN-AGUILAR, C., DUMAS-GAUDOT, E., BAREA, J.M. 1999. β -1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Sci* 141: 149-157
- POZO, M.J., CORDIER, C., DUMAS-GAUDOT, E., GIANINAZZI, S., BAREA, J.M., AZCÓN-AGUILAR, C. 2002. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J Exp. Bot.* 53 (368): 525-534
- SALESSES, G., RONCO, L., CHAUVIN, J.E., CHAPA, J. 1993. Amélioration génétique du châtaignier. Mise au point de tests d'évaluation du comportement vis-à-vis de la maladie de l'encre. *Arboric. Fruit.* 458, 23-31.
- SINGH, R., ADHOLEYA, A., MUKERJI, K.G. 2000. *Mycorrhiza in control of soil born pathogens*. In: Mycorrhizal Biology. Mukerji KG, Singh J Eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Pp. 173-196.
- SLEZACK, S., DUMAS-GAUDOT, E., ROSENDAHL, S., KJOLLER, R., PAYNOT, M., GIANINAZZI, S. 1999. Endoproteolytic activities in pea roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and / or *Aphanomyces euteiches* in relation to bioprotection. *New Phytol.* 142: 517-529
- ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., VIMARD, B., CARON, M., FORTIN, J.A. 1997. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in the non-VAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Botany* 75: 998-1005
- STENSTRÖM, E., DAMM, E., UNESTAM, T. 1997. Le rôle des mycorrhizes dans la protection des arbres forestiers contre les agents pathogènes du sol. *Rev. For. Fr.* n° sp. 121- 128.
- VROT, F., GRENTE, J. 1985. Recherche d'un moyen de lutte biologique la maladie de l'encre du châtaignier par utilisation de la symbiose mycorrhizienne. *Agronomie* 5 (6): 558-559.

YAMAJI, K., ISHIMOTO, H., USUI, N., MORI, S. 2005. Organic acids and water-soluble phenolics produced by *Paxillus* sp. 60/92 together show antifungal activity against *Pythium vexans* under acidic culture conditions. *Mycorrhiza* 15: 17-23