

Impacto de sulfentrazona, isoxaflutol e oxyfluorfem sobre a microbiota de dois solos florestais

Gustavo Soares da Silva ⁽¹⁾; Christiane Augusta Diniz Melo ^(1*); Cíntia Maria Teixeira Fialho ⁽¹⁾; Leonardo David Tuffi Santos ⁽²⁾; Maurício Dutra Costa ⁽¹⁾; Antonio Alberto da Silva ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Fitotecnia, Rua PH Rolfs s/n, 36570-000 Viçosa (MG) Brasil.

⁽²⁾ Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Instituto de Ciências Agrárias, Av. Universitária, 1.000, 39404-006 Montes Claros (MG), Brasil.

^(*) Autora correspondente: chrisadinizmelo@yahoo.com.br

Recebido: 7/nov./2013; Aceito: 5/maio/2014

Resumo

Questões referentes à aplicação de herbicidas em pré-emergência das plantas daninhas na cultura do eucalipto merecem destaque devido ao impacto dessa prática no ambiente, principalmente sobre a atividade microbiana do solo e micro-organismos benéficos, como os fungos micorrízicos e os solubilizadores de fosfatos. Objetivou-se estudar o impacto da aplicação dos herbicidas sulfentrazona, isoxaflutol e oxyfluorfem sobre a colonização micorrízica, biomassa e atividade microbiana de dois solos florestais cultivados com eucalipto. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação utilizando um solo argiloso e um solo franco-arenoso distribuídos em vasos de 12 dm³. O esquema fatorial utilizado foi 4 x 3, sendo três herbicidas (sulfentrazona, isoxaflutol e oxyfluorfem) mais a testemunha e três avaliações (5, 20 e 70 dias após a aplicação – DAA), no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Após a aplicação dos herbicidas na dose recomendada para a cultura transplantaram-se as mudas do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Avaliaram-se a biomassa microbiana, a taxa respiratória do solo, o quociente metabólico e o potencial de solubilização de fosfato inorgânico aos 5, 20 e 70 DAA. Aos 70 DAA verificou-se a colonização micorrízica e a viabilidade de esporos. Os herbicidas sulfentrazona, isoxaflutol e oxyfluorfem, bem como o tempo decorrido da aplicação afetaram os indicadores microbiológicos de maneira diferenciada. No solo franco-arenoso, o sulfentrazona foi mais prejudicial à biomassa microbiana, à colonização micorrízica e aos micro-organismos solubilizadores de fosfato inorgânico. No solo argiloso, no entanto, a aplicação dos três herbicidas não afetou a biomassa microbiana, mas reduziu a colonização radicular do eucalipto por fungos micorrízicos arbusculares e o potencial de solubilização de fosfato inorgânico. O herbicida sulfentrazona se destacou por provocar aumento do número de esporos não viáveis de fungos micorrízicos arbusculares nesse solo.

Palavras-chave: herbicida, *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, micorrizas, solubilização de fosfato, biomassa microbiana.

Impact of sulfentrazone, isoxaflutole and oxyfluorfen on the microorganisms of two forest soils

Abstract

Questions regarding the application of pre-emergence herbicides for control weeds in eucalyptus are noteworthy due to the impact of this practice on the environment, particularly on soil microbial activity and beneficial micro-organisms such as mycorrhizal fungi and phosphate solubilizers. The aim of this research was to study the impact of applying herbicides sulfentrazone isoxaflutole and oxyfluorfen on mycorrhizal colonization, microbial biomass and microbial activity of two forest soils cultivated with eucalyptus. The trial was conducted in a greenhouse using two soils, one clay and sandy loam distributed in 12 dm³ pots. The 4x3 factorial design was used, with three herbicides (sulfentrazone, oxyfluorfen, isoxaflutole) over the untreated control and three assessments (5, 20 and 70 days after application (DAA)), in a completely randomized design with four replications. After herbicide application seedlings of the hybrid *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. We evaluated the microbial biomass of the soil respiration rate, the quotient and the metabolic potential of solubilization of inorganic phosphate at 5, 20 and 70 DAA. At 70 DAA verified the percentage of roots colonized by mycorrhizal fungi and spore viability in the soil. The sulfentrazone, isoxaflutole and oxyfluorfen as well as the time of application affected the microbiological indicators differently. In the sandy loam soil sulfentrazone was more harmful to microbial biomass, mycorrhizal colonization and microorganisms solubilizing inorganic phosphate. In clay soil, however, the application of the three herbicides did not affect microbial biomass, but reduced root colonization of eucalyptus by mycorrhizal fungi and the potential solubilization of inorganic phosphate. The sulfentrazone stood for caused an increase in the number of non-viable spores of mycorrhizal fungi in the soil.

Key words: herbicides, *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, mycorrhiza, phosphate solubilization, microbial biomass.

1. INTRODUÇÃO

As florestas plantadas de *Eucalyptus* spp. no Brasil atualmente ocupam uma área de 6,66 milhões de hectares, representando 76,6% do total da área de plantio florestal. O aumento das áreas de plantio e o consumo de madeira em 2012 foram 2,1% e 7,2% superiores, respectivamente, em relação ao ano de 2011 (ABRAF, 2013), demonstrando, dessa forma, que há uma crescente demanda de produtos madeireiros e consequente necessidade de elevação da produção.

O gênero *Eucalyptus* apresenta espécies de rápido crescimento e apesar de boa competitividade quanto a seu estabelecimento no campo, não está livre dos danos causados pela interferência das plantas daninhas, que podem comprometer tanto a qualidade do produto quanto a produção (Tuffi Santos et al., 2006). Essa interferência dá-se pela competição por nutrientes, água, luminosidade, alelopatia, além da possibilidade de as plantas daninhas serem hospedeiras de patógenos e servirem de abrigo de pragas importantes à cultura (Silva e Silva, 2007).

Em plantios comerciais de eucalipto, o uso de herbicidas para o controle de plantas daninhas é realizado em larga escala como forma de manejo mais eficiente devido às extensas áreas e à baixa disponibilidade de mão de obra (Toledo et al., 2003). No entanto, herbicidas podem causar impactos negativos à microbiota edáfica, devido às diferentes composições, às características físico-químicas e ao comportamento no solo. Produtos aplicados em pré-emergência das plantas daninhas, a exemplo de sulfentrazone, isoxaflutol e oxyfluorfen, atingem diretamente o solo, podendo causar maiores prejuízos por aumentarem o risco de exposição dos micro-organismos do solo, especialmente aqueles benéficos, como os fungos micorrízicos e micro-organismos solubilizadores de fosfatos.

Diversos trabalhos têm demonstrado, através de indicadores microbiológicos da qualidade do solo, a importância da microbiota do solo no sucesso do estabelecimento de plantios de eucalipto em diversas regiões do país, principalmente em áreas de reflorestamento e de recuperação de áreas degradadas (Campos et al., 2011; Caproni et al., 2005; Chaer e Tótola, 2007; Coelho et al., 1997; Cordeiro et al., 2005; Lima et al., 2013; Silva et al., 2009), onde geralmente se encontram solos com características físicas e químicas alteradas, de baixa fertilidade e com elevados teores de alumínio associado a baixos valores de pH. Um dos motivos que contribuem para esse sucesso é a associação simbiótica das raízes das plantas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) ou fungos ectomicorrízicos (FECM) no solo. Essa associação micorrízica propicia maior densidade e longevidade às raízes, proteção contra patógenos (Sylvia e Williams, 1992), maior exploração do solo, com incrementos na absorção de água e de nutrientes, bem como mobilização de formas não disponíveis de nutrientes (Marchner e Dell, 1994), o que pode contribuir para maior produtividade e competitividade.

Outros indicadores, como o carbono da biomassa microbiana (CBM), a taxa respiratória (TR) e o quociente metabólico ($q\text{CO}_2$), são ferramentas que auxiliam na avaliação dos efeitos que a aplicação de herbicidas causa aos micro-organismos do solo. A ação desses produtos também se reflete sobre o potencial de solubilização de fosfato inorgânico (Pi), a colonização das raízes por fungos micorrízicos e a viabilidade de esporos de FMA. Diante do exposto, objetivou-se estudar o impacto da aplicação dos herbicidas sulfentrazone, isoxaflutol e oxyfluorfen sobre a colonização micorrízica, biomassa e atividade microbiana de dois solos florestais com diferentes características físicas e químicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições. Os tratamentos foram dispostos, para cada tipo de solo, em esquema fatorial 4 x 3, sendo três herbicidas: Boral 500 SC® (sulfentrazone), Goal BR® (oxyfluorfen) e Fordor 750 WG® (isoxaflutol), nas doses recomendadas pelos fabricantes de 0,5 kg ha⁻¹, 0,72 kg ha⁻¹ e 0,113 kg ha⁻¹, respectivamente, e mais uma testemunha sem aplicação de herbicida, e três épocas de avaliação: 5, 20 e 70 dias após a aplicação – DAA. Os solos utilizados possuem características químicas e físicas distintas, provenientes de plantios de eucalipto dos municípios de Viçosa e Belo Oriente, ambos do Estado de Minas Gerais (Tabela 1), sendo um solo franco-arenoso e um solo argiloso, respectivamente.

Vasos de 12 dm³ foram preenchidos com os solos citados, previamente adubados conforme análise química do solo e recomendação para a cultura, e logo após aplicaram-se os referidos herbicidas. Para aplicação utilizou-se um pulverizador costal com pressão constante mantida por CO₂, acoplado a barra com um bico tipo leque TT11002, com pressão de trabalho de 250 kpa e volume de calda de 150 L ha⁻¹. Após aplicação transplantaram-se as mudas padronizadas do clone de eucalipto, híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, com aproximadamente três meses de idade. Foram realizadas irrigações diárias, de modo a manter o solo próximo de sua capacidade de campo.

Aos 5, 20 e 70 DAA dos herbicidas foram feitas coletas de solo (200 g) na camada de 0 a 10 cm de profundidade de cada vaso, sendo as amostras acondicionadas em sacos plásticos, fechados frouxamente e mantidos à temperatura de 4 °C por no máximo três dias até o processamento. Avaliou-se a taxa respiratória (TR) do solo por meio da evolução de C-CO₂, o carbono da biomassa microbiana (CBM) e a solubilização de fosfato inorgânico (Pi) pelos micro-organismos do solo.

Tabela 1. Resultados das análises química e física das amostras dos solos provenientes dos municípios de Viçosa e Belo Oriente, MG

Caracterização química									
Origem do solo	pH	P	K	Al ³⁺	H + Al	Ca ²⁺	Mg ²⁺	M.O.	P-rem
		-- mg dm ⁻³ --			----- cmol _c dm ⁻³ -----			dag kg ⁻¹	mg L ⁻¹
Viçosa	5,5	2,2	40	0,0	3,47	1,2	0,6	3,5	33,4
Belo Oriente	4,1	15,9	46	1,7	8,08	0,3	0,1	2,7	22,6
Caracterização física									
	Argila	Silte	Areia		Classe textural				
	-----dag kg ⁻¹ -----								
Viçosa	13	11	76		Franco-arenosa				
Belo Oriente	50	18	32		Argiloso				

As amostras de solo, após passadas por peneira com malha de 2 mm e determinação do teor de água, tiveram sua umidade ajustada para 75% da capacidade de campo para incubação por 15 dias. A respiração microbiana foi estimada, para cada época de coleta, a partir da quantidade de CO₂ evoluído de amostras de 100 g de solo e capturado em frascos contendo 100 mL de NaOH (0,5 mol L⁻¹), em sistema de fluxo de ar contínuo isento de CO₂. Após o período de incubação procedeu-se à titulação indireta do NaOH com HCl (0,5 mol L⁻¹), conforme metodologia descrita por Vivian et al. (2006).

O CBM foi estimado pelo método descrito por Vance et al. (1987) e modificado por Islam e Weil (1998), utilizando-se, em lugar do clorofórmio (fumigação), forno de micro-ondas (irradiação). De posse dos dados de TR e CBM, calculou-se o quociente metabólico (q_{CO_2} - $\mu\text{g CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{CBM d}^{-1}$), por meio da relação entre a evolução de C-CO₂ diária ($\mu\text{g CO}_2 \text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$) e o carbono total da biomassa microbiana ($\mu\text{g CBM g}^{-1}$ de solo).

Para determinação do potencial de solubilização de fosfato inorgânico, transferiu-se 1 g de solo de cada unidade experimental, em triplicata, para tubo de ensaio com 10 mL de meio líquido NBRI, pH 6,8-7,0, contendo (g L⁻¹): glicose, 10; Ca₃(PO₄)₂, 5; MgCl₂.6H₂O, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,25; KCl, 0,2; e (NH₄)₂SO₄, 0,1 (Nautiyal, 1999). Os tubos foram tampados com rosca e levados para BOD, onde ficaram incubados por 15 dias a 25 °C. Após o período de incubação, 1,0 mL da fase líquida foi submetido à centrifugação (8.000 rpm, 25 °C, por 20 minutos). Em seguida, determinou-se a quantidade de P inorgânico do sobrenadante pelo método colorimétrico da vitamina C modificada, em espectrofotômetro a 725 nm (Braga e DeFelipo, 1974).

Aos 70 DAA foram coletadas amostras de 50 g de solo de cada parcela para avaliação da viabilidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares. Utilizou-se o método de peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) e centrifugação em solução de sacarose (Jenkins, 1964). A suspensão de esporos (10 mL) foi colocada em recipientes com tampa, aos quais se adicionaram 2 mL de cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) (1g L⁻¹) (Walley e Germida, 1995).

Os recipientes foram deixados em temperatura ambiente por 72 horas, sem contato com a luz. Posteriormente procedeu-se a contagem dos esporos viáveis e não viáveis. Neste estudo foram considerados viáveis os esporos que reagiram com o INT, ficando avermelhados, e não viáveis, além dos sem conteúdo celular, aqueles com conteúdo citoplasmático que não reagiu com o INT, mantendo sua coloração natural.

Ao final do experimento, aos 70 DAA, foram coletadas raízes finas para avaliação da colonização por FMA, as quais foram lavadas em água corrente e armazenadas em frascos com tampa contendo FAA (formaldeído: ácido acético: álcool etílico 96°) 1:1:18 (v/v/v), para posterior avaliação. Em laboratório, as raízes foram inicialmente descoloridas com KOH 10% em banho-maria a 70 °C e posteriormente lavadas com água destilada. Em seguida, adicionou-se solução de HCl a 1%, drenada após cinco minutos, sendo essas raízes então coradas com o corante azul de tripano (0,05% em lactoglicerol). A percentagem de raízes colonizadas por FMA foi avaliada pelo método de interseção em placa quadriculada sob lupa binocular (Giovannetti e Mosse, 1980). Os segmentos que apresentavam vesículas, arbúsculos ou hifas características, por vezes ligadas a esporos típicos, foram considerados colonizados por FMA.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Sendo o valor de F significativo, aplicou-se o teste de Tukey para comparação das médias dos tratamentos ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se o carbono da biomassa microbiana (CBM) de acordo com o desdobramento da interação época de avaliação x efeito do herbicida, notou-se que no solo franco-arenoso, para as três épocas de aplicação, houve diferença estatística apenas para os solos tratados com o herbicida sulfentrazone aos 20 e 70 DAA, as quais apresentaram, em média, valor de 98,32 $\mu\text{g CBM g}^{-1}$ de solo menor em relação à da primeira época de avaliação (Tabela 2). Além disso, evidenciou-se que, aos 70 DAA, apenas o herbicida sulfentrazone diferiu da testemunha, provocando redução de 56% no CBM (Tabela 2). Vivian et al. (2006) também

observaram efeito negativo de sulfentrazone sobre os micro-organismos do solo, o que, segundo os autores, pode ser atribuído à elevada persistência apresentada no Argissolo Vermelho-Amarelo avaliado. Embora conste que o principal mecanismo de degradação do sulfentrazone seja microbiano (FMC CROP, 1995), outros estudos também comprovaram a sua ação tóxica sobre micro-organismos do solo (Chang et al., 2001; Reddy e Locke, 1998) e, por essa razão, esse herbicida deve ser usado com cautela. Além disso, conhecer os processos de supressão, redução da atividade e seleção microbiológica do solo por esse herbicida pode auxiliar na redução do seu efeito residual (Vivian et al., 2006).

No solo argiloso tratado com isoxaflutol e oxyfluorfen houve incremento no CBM aos 20 DAA, observando-se um decréscimo aos 70 DAA. O mesmo comportamento foi observado para a testemunha, com redução mais acentuada entre as épocas de avaliação (Tabela 2). Na avaliação realizada aos 5 DAA o resultado obtido possivelmente advém da aplicação do herbicida no solo, uma vez que a muda foi recentemente transplantada e provavelmente concentra toda energia no estabelecimento e desenvolvimento do sistema radicular, enquanto na avaliação realizada aos 20 DAA os indicadores microbiológicos já estão sofrendo influência da ação conjunta da planta em presença do herbicida. Solos com a presença de sulfentrazone apresentaram, nas duas primeiras épocas, CBM 42% superior à avaliada aos 70 DAA. Tironi et al. (2009), trabalhando com herbicidas aplicados em pós-emergência em cana-de-açúcar, verificaram o aumento do CBM provocado por alguns deles, o que foi atribuído a efeitos fitotóxicos causados pelos herbicidas, que podem aumentar a exsudação radicular, beneficiando a microbiota presente na rizosfera da planta. As maiores sínteses e exsudações radiculares de aminoácidos e açúcares

normalmente são influenciadas pelas condições de estresse (Bertin et al., 2003). Infere-se, portanto, que o estresse provocado pelos herbicidas pode influenciar na composição e na quantidade dos exsudatos radiculares do eucalipto.

A taxa respiratória (TR) de ambos os solos foi afetada pela interação entre herbicidas e épocas de avaliação (Tabela 3). No solo franco-arenoso ocorreu aumento da TR aos 20 DAA, exceto para o tratamento com oxyfluorfen, e redução da atividade microbiana aos 70 DAA (Tabela 3). Tal fato pode ser reflexo da tentativa de metabolização dos produtos pela biomassa microbiana, que não foi alterada ao longo do tempo (Tabela 2), quando mais próximo de sua aplicação (20 DAA), e prevalência do efeito tóxico causado por esses ou pelos subprodutos gerados aos 70 DAA. Quanto ao efeito dos herbicidas em cada época, verificou-se aos 5 DAA maior atividade biológica no solo franco-arenoso tratado com o oxyfluorfen (Tabela 3), o que pode dever-se tanto a um efeito tóxico imediato do produto e aumento de atividade com o intuito de destoxificação, quanto a sua utilização como fonte de carbono e energia pelos micro-organismos edáficos. Já aos 70 DAA, a aplicação dos três herbicidas promoveu redução da TR do solo em relação à testemunha (Tabela 3), evidenciando provavelmente a ação deletéria desses produtos à medida que decorre o tempo de aplicação, intervalo em que pode ter ocorrido a lixiviação deles para camadas subsuperficiais do solo franco-arenoso.

A atividade dos micro-organismos no solo é considerada um atributo positivo para a qualidade do solo, sendo a taxa respiratória um indicador sensível da decomposição de resíduos, do giro metabólico do carbono orgânico do solo e de distúrbios no ecossistema (Paul et al., 1999), mas a interpretação de seus valores deve ser realizada com cuidado. Uma alta taxa de respiração, indicativo de alta

Tabela 2. Carbono da biomassa microbiana dos solos franco-arenoso e argiloso submetidos à aplicação de herbicidas e avaliados em três épocas

Carbono da biomassa microbiana (CBM - $\mu\text{g C-CO}_2\text{g}^{-1}$ de solo)			
Solo franco-arenoso			
Herbicida	Época de avaliação		
	5 DAA ⁽¹⁾	20 DAA	70 DAA
Testemunha	227,72 Aa ⁽²⁾	214,21 Aa	301,05 Aa
Sulfentrazone	256,57 Aa	185,27 Ba	131,23 Ba
Isoxaflutol	191,05 Aa	119,65 Aa	208,42 Aab
Oxyfluorfen	129,30 Aa	200,77 Aa	165,97 Aab
CV		36,15%	
Solo argiloso			
Herbicida	5 DAA	20 DAA	70 DAA
Testemunha	250,88 Ba	378,25 Aa	127,37 Ca
Sulfentrazone	260,53 Aa	287,54 Aa	158,25 Ba
Isoxaflutol	169,83 Ba	291,40 Aa	185,26 Ba
Oxyfluorfen	169,82 Ba	301,05 Aa	165,94 Ba
CV		22,98%	

⁽¹⁾DAA: dias após a aplicação dos herbicidas; ⁽²⁾Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada solo, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 3. Taxa respiratória (TR) dos solos franco-arenoso e argiloso submetidos à aplicação de herbicidas avaliada em três épocas

Taxa respiratória (TR - $\mu\text{g C-CO}_2\text{g}^{-1}$ de solo d^{-1})			
Solo franco-arenoso			
Herbicida	Época de avaliação		
	5 DAA ⁽¹⁾	20 DAA	70 DAA
Testemunha	59,87 Cb ⁽²⁾	116,11 Aa	82,50 Ba
Sulfentrazone	75,17 Bb	108,17 Aa	50,72 Cb
Isoxaflutol	70,28 Bb	111,83 Aa	26,89 Cc
Oxyfluorfen	96,56 Aa	103,28 Aa	59,87 Bb
CV		11,81%	
Solo argiloso			
Herbicida	5 DAA	20 DAA	70 DAA
Testemunha	51,33 Ba	100,87 Aa	52,38 Aa
Sulfentrazone	50,11 Ba	97,78 Aa	54,35 Ba
Isoxaflutol	65,39 Ba	113,06 Aa	28,15 Cab
Oxyfluorfen	51,33 Ba	89,83 Aa	20,93 Cb
CV		19,17%	

⁽¹⁾DAA: dias após a aplicação dos herbicidas; ⁽²⁾Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada solo, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

atividade biológica, pode ser uma característica desejável se for considerada como um sinal de rápida decomposição de resíduos orgânicos em nutrientes disponíveis para as plantas. Entretanto, a decomposição da matéria orgânica estável, ou seja, da fração húmica do solo, é desfavorável para muitos processos químicos e físicos, como a agregação, a capacidade de troca de cátions e a capacidade de retenção de água (Tótolá e Chaer, 2000).

O solo argiloso submetido à aplicação de sulfentrazona, isoxaflutol e oxyfluorfem apresentou o mesmo comportamento evidenciado para TR no solo franco-arenoso, com incremento aos 20 DAA e decréscimo aos 70 DAA. Para o efeito dos herbicidas foi observada diferença estatística somente aos 70 DAA, com redução superior a 50% na atividade respiratória do solo tratado com o herbicida oxyfluorfem em relação à testemunha (Tabela 3).

Para a variável qCO_2 não houve efeito da interação herbicida x época no solo franco-arenoso, sendo significativo somente o fator época. Aos 20 DAA, a atividade metabólica específica da biomassa microbiana foi 46% mais elevada que nas demais épocas (Tabela 4), o que indica que nessa época houve baixa eficiência energética dos micro-organismos edáficos, ou seja, uma respiração elevada estava sendo requerida para manutenção de uma mesma biomassa microbiana.

O qCO_2 é um indicador de equilíbrio do sistema proposto por Anderson e Domsch (1993) o qual prediz que quanto mais próximo do equilíbrio ele estiver, menos energia requer para manutenção da célula microbiana e, quanto mais distante do equilíbrio, maior atividade específica necessita. Assim, um baixo qCO_2 indica economia na utilização de energia e, supostamente, reflete um ambiente mais estável ou mais próximo de seu estado de equilíbrio; valores elevados, ao contrário, indicam ecossistemas submetidos a alguma condição de estresse ou de distúrbio (Tótolá e Chaer, 2000), evidenciando sistemas menos conservacionistas da matéria orgânica do solo.

Como efeito da interação dos fatores no solo argiloso, verificou-se que com a aplicação do herbicida sulfentrazona, aos 20 DAA e 70 DAA houve elevação do quociente

Tabela 4. Quociente metabólico (qCO_2) dos solos franco-arenoso e argiloso submetidos à aplicação de herbicidas avaliado em três épocas

Quociente metabólico (qCO_2 - $\mu g C-CO_2 \mu g^{-1} CBM d^{-1}$)					
Solo franco-arenoso			Solo argiloso		
Época	qCO_2	Herbicida	Época de avaliação		
			5 DAA ⁽¹⁾	20 DAA	70 DAA
5 DAA	0,35 b	Testemunha	0,25 Aa ⁽²⁾	0,29 Aa	0,43 Aa
20 DAA	0,59 a	Sulfentrazona	0,18 Ba	0,34 Aa	0,34 Aab
70 DAA	0,28 b	Isoxaflutol	0,38 Aa	0,40 Aa	0,18 Bb
		Oxyfluorfem	0,30 Aa	0,30 Aa	0,16 Ab
CV	39,74%	CV	32,10%		

⁽¹⁾DAA: dias após a aplicação dos herbicidas; ⁽²⁾Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada solo, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

metabólico, gerado provavelmente por um distúrbio no sistema solo-planta-micro-organismos. Por outro lado, à medida que se distanciou da aplicação do isoxaflutol no solo houve redução do quociente metabólico (Tabela 4), destacando-o também em relação à ação dos herbicidas, na época de 70 DAA, juntamente com oxyfluorfem, indicando um ambiente mais equilibrado (Tabela 4). Tais resultados permitem constatar que embora a aplicação desses herbicidas tenha alterado a taxa respiratória do solo e a biomassa microbiana ela não afetou a estabilidade do sistema comparada à da testemunha sem aplicação, destacando-se ainda o aumento da eficiência energética da microbiota do solo proporcionado pela aplicação do oxyfluorfem e isoxaflutol na avaliação aos 70 DAA.

O potencial de solubilização de fosfato inorgânico (Pi) para o solo franco-arenoso tratado com os herbicidas sulfentrazona, isoxaflutol e oxyfluorfem foi reduzido aos 5 DAA e aos 20 DAA quando comparado aos 70 DAA (Tabela 5), seguindo o mesmo comportamento evidenciado pela testemunha. Nesse solo, os produtos podem ter apresentado maior mobilidade no solo com as irrigações, ao passar do tempo, exercendo ação tóxica para uma população maior de micro-organismos solubilizadores de fosfato, ocorrendo ação danosa e seleção de alguns desses micro-organismos, aumentando-se posteriormente o potencial de solubilização de Pi aos 70 DAA. No solo argiloso, a aplicação do herbicida sulfentrazona apresentou efeito nas épocas de coleta de solo, com redução da concentração de Pi aos 5 DAA (Tabela 5).

Rossi et al. (2005) observaram que o sulfentrazona apresentou uniformidade de distribuição até 22,5 cm no perfil de um Chernossolo (arenoso), proporcional ao aumento da precipitação, contudo em um Latossolo Vermelho

Tabela 5. Potencial de solubilização de fosfato inorgânico avaliado em três épocas nos solos franco-arenoso e argiloso submetidos à aplicação de herbicidas

Potencial de solubilização de fosfato inorgânico (mg P)			
Solo franco-arenoso			
Herbicida	Época de avaliação		
	5 DAA ⁽¹⁾	20 DAA	70 DAA
Testemunha	0,60 Ba ⁽²⁾	0,62 Bab	0,87 Aa
Sulfentrazona	0,52 Ba	0,39 Bc	0,95 Aa
Isoxaflutol	0,53 Ba	0,44 Bbc	0,96 Aa
Oxyfluorfem	0,54 Ba	0,61 Ba	1,00 Aa
CV	14,06%		
Solo argiloso			
Herbicida	5 DAA	20 DAA	70 DAA
Testemunha	0,65 Ca	1,35 Aa	1,05 Ba
Sulfentrazona	0,47 Ba	0,80 Ab	0,78 Aab
Isoxaflutol	0,53 Aa	0,77 Ab	0,62 Ab
Oxyfluorfem	0,59 Aa	0,74 Ab	0,71 Ab
CV	21,61%		

⁽¹⁾DAA: dias após a aplicação dos herbicidas; ⁽²⁾Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada solo, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

(argiloso) o herbicida permaneceu na camada superficial de 2,5 cm, não apresentando mobilidade independentemente da precipitação utilizada. Melo et al. (2010) verificaram movimentação descendente de sulfentrazona até 27,5 cm, em solo franco-arenoso, e até 25 e 17,5 cm em solo argiloso com baixo e alto teor de matéria orgânica, respectivamente. Esses autores ainda observaram presença do herbicida isoxaflutol até 25 cm em solo franco-arenoso, apresentando-se decréscimo da concentração do produto com o aumento da profundidade no perfil do solo. Inoue et al. (2010), trabalhando com lixiviação de herbicidas em solo arenoso e argiloso, observaram em amostras de solo arenoso pequena mobilidade das moléculas de oxyfluorfen para a camada de 5-10 cm com aplicação de lâminas superiores a 80 mm de água, notando que pode ocorrer pequena movimentação das moléculas do herbicida sob precipitações intensas, não sendo detectada lixiviação das moléculas de oxyfluorfen abaixo da camada superficial (0-5 cm) nos ensaios realizados com solo argiloso.

Algumas propriedades dos solos, como pH, teor de argila, ferro total, matéria orgânica, cristalinidade dos óxidos de ferro (Upchurch, 1966) e umidade podem reduzir a eficácia dos herbicidas, influenciando as perdas por lixiviação e, conseqüentemente, o impacto sobre uma extensa gama de micro-organismos do solo.

Quanto ao fator herbicida, notou-se variação apenas aos 20 DAA para o solo franco-arenoso nos tratamentos com aplicação de sulfentrazona, apresentando-se menor potencial de solubilização de Pi (Tabela 5). Para essa mesma época, no solo argiloso a aplicação dos três herbicidas reduziu o potencial de solubilização de Pi em relação à testemunha (Tabela 5). Aos 70 DAA, solos com isoxaflutol e oxyfluorfen afetaram negativamente a disponibilização dessa fonte de fósforo no solo para as plantas. Massensini et al. (2008) relataram que o glyphosate em diferentes formulações comerciais foi prejudicial à atividade de bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas da rizosfera de eucalipto in vitro. Pelos resultados encontrados no presente estudo pode-se inferir que esses herbicidas aplicados diretamente sobre o solo afetam negativamente a atividade dos micro-organismos solubilizadores de fosfato inorgânico, sendo a ação danosa variável de acordo com a textura do solo e o tempo decorrido da aplicação dos produtos.

A colonização das raízes por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em solo argiloso foi reduzida pela aplicação dos três herbicidas (Tabela 6). No entanto, em solo franco-arenoso, somente o herbicida sulfentrazona afetou a colonização radicular do eucalipto, reduzindo-a em cerca de 50% (Tabela 6).

Na implantação de um plantio florestal, a baixa colonização micorrízica das mudas florestais pode representar fator limitante para o seu estabelecimento a campo (Araújo et al., 2004). A colonização micorrízica é uma característica que pode

ser afetada por inúmeros fatores, como a espécie vegetal, a idade da planta, a densidade de raízes, os propágulos fúngicos no solo e o tipo de manejo empregado no solo na hora do plantio (Campos et al., 2011). Smith e Read (1997) relatam que em plantios de eucalipto há uma sucessão micorrízica com predomínio de FMA em plantios mais jovens e de fungos ectomicorrízicos (FECM) em plantios com idade avançada. Considerando a importância dessa simbiose para a cultura, especialmente na fase inicial de crescimento, e os efeitos negativos decorridos da aplicação de herbicidas com atividade residual elevada e potencial de lixiviação, o manejo químico de plantas daninhas em plantios florestais deve primar pelo uso racional de herbicidas que apresentem, dentre outras características, baixo risco de impacto negativo sobre fungos micorrízicos arbusculares.

A viabilidade de esporos no solo franco-arenoso não foi afetada pela aplicação dos herbicidas, contudo, verificou-se no solo argiloso tratado com sulfentrazona baixa percentagem de esporos viáveis e aumento do número de esporos não viáveis (Tabela 7). Esse resultado complementa a informação obtida na análise da colonização micorrízica, vindo a confirmar a toxicidade desse herbicida para os micro-organismos do solo, afetando a simbiose e a viabilidade dos esporos nele presentes, diminuindo assim as possibilidades de interação fungo-planta.

Segundo Brundrett et al. (1996) a densidade de esporos de FMA na rizosfera geralmente é bastante variável, relacionando-se com a distribuição, morfologia e idade fisiológica das raízes, assim como dependendo de outros fatores que influenciam

Tabela 6. Percentagem de raízes de eucalipto colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em solo franco-arenoso e argiloso submetidos à aplicação de herbicidas

Percentagem de colonização micorrízica por FMAs (%)		
Herbicida	Solo franco-arenoso	Solo argiloso
Testemunha	22,67 a ⁽¹⁾	22,39 a
Sulfentrazona	11,80 b	9,60 b
Isoxaflutol	13,30 ab	14,33 b
Oxyfluorfen	18,41 ab	14,23 b
CV	29,44%	21,67%

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, para cada solo, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 10%.

Tabela 7. Viabilidade de esporos de fungos micorrízicos em solo argiloso cultivado com eucalipto submetido à aplicação de herbicidas

Percentagem de esporos viáveis e não viáveis (%)		
Herbicida	Solo argiloso	
	Esporos viáveis	Esporos não viáveis
Testemunha	14,67 ab ⁽¹⁾	22,00 bc
Sulfentrazona	4,67 b	33,67 a
Isoxaflutol	12,00 ab	31,00 ab
Oxyfluorfen	20,00 a	17,00 c
CV	47,02%	19,89%

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, para cada solo, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 10%.

na esporulação, como pluviometria, temperatura, período de insolação e espécies de FMA. Steffen et al. (2010), trabalhando com micorrização de *E. grandis*, observaram que em alguns casos a presença dos esporos não corresponde ao grau de colonização das raízes.

A abundância e viabilidade de propágulos como esporos de fungos micorrízicos determinam a persistência dos FMAs no solo em situações adversas, como aquelas oriundas de modificações no uso do solo ou da aplicação de agrotóxicos (Brundrett et al., 1996). São escassos na literatura estudos envolvendo o impacto de herbicidas sobre a colonização micorrízica e a densidade de esporos totais, viáveis ou não viáveis de fungos micorrízicos, e dada a relevância da presença desses propágulos no solo para o estabelecimento de simbioses com as raízes de eucalipto, outros trabalhos devem ser propostos de modo a avaliar-se, sob diferentes condições de solos, manejos e culturas, a ação desses produtos.

Diante do exposto, a escolha dos herbicidas para o manejo de plantas daninhas na cultura do eucalipto deve primar não só pela seletividade e eficácia como também pelo baixo impacto negativo sobre a biomassa e atividade microbiana do solo. O conhecimento sobre o comportamento de cada herbicida nos diferentes solos é fundamental para recomendação mais segura desses produtos em condições tropicais.

4. CONCLUSÃO

Os herbicidas sulfentrazone, isoxaflutol e oxyfluorfen afetam os indicadores microbiológicos de maneira diferenciada nos solos e épocas avaliados.

No solo franco-arenoso, o sulfentrazone é o mais prejudicial à biomassa microbiana, à colonização micorrízica e aos micro-organismos solubilizadores de fosfato inorgânico. No solo argiloso, a aplicação de nenhum dos três herbicidas afetou a biomassa microbiana em relação ao solo sem herbicida, mas reduziu a colonização radicular do eucalipto por fungos micorrízicos arbusculares e o potencial de solubilização de fosfato inorgânico. O herbicida sulfentrazone se destaca por provocar aumento do número de esporos não viáveis de fungos micorrízicos arbusculares nesse solo.

AGRADECIMENTOS

À Celulose Nipo Brasileira (CENIBRA), pela disponibilização das mudas e solo, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF. Anuário estatístico ABRAF 2013 ano base 2012. Brasília: ABRAF, 2013. p.24.
- ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient of CO₂ (q_{CO_2}) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental condition, such as pH, on the microbial of forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v.25, p.393-395, 1993. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90140-7](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(93)90140-7)
- ARAÚJO, C.V.M.; ALVES, L.J.; SANTOS, O.M.; ALVES, J.M. Micorriza arbuscular em plantações de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell no litoral norte da Bahia, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.18, p.513-520, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062004000300011>
- BERTIN, C.; YANG, X.; WESTON, L.A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil*, v.256, p.67-83, 2003. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1026290508166>
- BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. *Revista Ceres*, v.21, p.73-85, 1974.
- BRUNDRETT, M.C.; ASHWATH, N.; JASPER, D.A. Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia. *Plant and Soil*, v.184, p.173-184, 1996. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00029286>
- CAMPOS, D.T.S.; SILVA, M.C.S.; LUZ, J.M.R.; TELESFORA, R.J.; KASUYA, M.C.M. Colonização micorrízica em plantios de eucalipto. *Revista Árvore*, v.35, p.965-974, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000600002>
- CAPRONI, A.L.; FRANCO, A.A.; BERBARA, R.L.L.; GRANHA, J.R.D.O.; MARINHO, N.F. Fungos micorrízicos arbusculares em estéril revegetado com *Acácia mangium*, após mineração de bauxita. *Revista Árvore*, v.29, p.373-381, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622005000300004>
- CHAER, G.M.; TÓTOLA, M.R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.31, p.1381-1396, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832007000600016>
- CHANG, Y.J. Impact of herbicides on the abundance structure of indigenous beta-subgroup ammonia-oxidizer communities in soil microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.20, p.2462-2468, 2001. PMID:11699770. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620201110>
- COELHO, F.C.; BORGES, A.C.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F.; MYCHOVY, R.M.C. Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus camaldulensis* dehn., nos municípios de Paraopeba, Bocaiuva e João Pinheiro, Minas Gerais. *Revista Árvore*, v.21, p.393-404, 1997.
- CORDEIRO, M.A.S.; CARNEIRO, M.A.C.; PAULINO, H.B.; SAGGIN JUNIOR, O.J. Colonização e densidade de esporos de fungos micorrízicos em dois solos do cerrado sob diferentes sistemas de manejo. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.35, p.147-153, 2005.
- FMC Corp. Technical bulletin of sulfentrazone. Philadelphia: FMC corporation, 1995. 6p.

- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wt-sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, v.46, p.235-244, 1963. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, v.84, p.489-500, 1980. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>
- INOUE, M.H.; SANTANA, D.C.; OLIVEIRA JR., R.S.; CLEMENTE, R.A.; DALLACORT, R.; POSSAMAI, A.C.S.; SANTANA, C.T.C.; PEREIRA, K.M. Potencial de lixiviação de herbicidas utilizados na cultura do algodão em colunas de solo. *Planta Daninha*, v.8, p.825-833, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582010000400016>
- ISLAM, K.R.; WEIL, R.R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. *Biology and Fertility of Soils*, v.27, p.408-416, 1998. <http://dx.doi.org/10.1007/s003740050451>
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, v.48, p.692, 1964.
- LIMA, F.; SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S. Ocorrência e atividade de fungos micorrízicos arbusculares em plantios de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) no litoral norte da Bahia, Brasil. *Revista Árvore*, v.37, p.245-255, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622013000200006>
- MARCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil*, v.159, p.89-102, 1994.
- MASSENSINI, A.M.; COSTA, M.D.; REIS, M.R.; SILVA, A.A. Atividade de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato na presença de formulações comerciais de Glyphosate. *Planta Daninha*, v.26, p.815-823, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582008000400013>
- MELO, C.A.D.; MEDEIROS, W.N.; TUFFI SANTOS, L.D.; FERREIRA, F.A.; TIBURCIO, R.A.S.; FERREIRA, L.R. Lixiviação de sulfentrazone, isoxaflutole e oxyfluorfen no perfil de três solos. *Planta Daninha*, v.28, p.385-392, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582010000200018>
- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v.170, p.265-270, 1999. PMID:9919677. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- PAUL, E.A.; HARRIS, D.; COLLINS, H.P.; SCHULTHESS, U.; ROBERTSO, G.P. Evolution of CO₂ and soil carbon dynamics in biologically managed, row-crop agrosystems. *Applied Soil Ecology*, v.11, p.53-65, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00130-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00130-9)
- REDDY, K.N.; LOCKE, M.A. Sulfentrazone sorption, desorption, and mineralization in soils from two tillage systems. *Weed Science*, v.46, p.494-500, 1998.
- ROSSI, C.V.S.; ALVES, P.L.C.A.; MARQUES JUNIOR, J. Mobilidade do sulfentrazone em latossolo vermelho e em chernossolo. *Planta Daninha*, v.23, p.701-710, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582005000400019>
- SILVA, L.G.; MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B.; FERNANDES, M.F.; MELO, J.T.; KATO, E. Atributos físicos, químicos e biológicos de um Latossolo de cerrado em plantio de espécies florestais. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.44, p.613-620, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009000600010>
- SILVA, A.A.; SILVA, J.F. Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 367p.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal symbiosis*, 2. ed. San Diego: Academic, 1997. 605p.
- STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I.; STEFFEN, G.P.K.; ECKHARDT, D.P. Micorrização das mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden comercializadas no município de Santa Maria, RS. *Ciência e Natura*, v.32, p.25-35, 2010.
- SYLVIA, D.M.; WILLIAMS, S.E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*, ASA, Special Publication, n.54, p.101-124, 1992.
- TIRONI, S.P.; REIS, M.R.; SILVA, A.F.; FERREIRA, E.A.; BARBOSA, M.H.P.; COSTA, M.D.; SILVA, A.A.; GALON, L. Impacto de herbicidas na biomassa microbiana e nos microrganismos solubilizadores de ortofosfato do solo rizosférico de cana-de-açúcar. *Planta Daninha*, v.27, p.1053-1062, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582009000500019>
- TOLEDO, R.E.B.; VICTÓRIA FILHO, R.; ALVES, P.L.C.A.; PITELLI, R.A.; LOPES, M.A.F. Faixas de controle de plantas daninhas e seus reflexos no crescimento de plantas de eucalipto. *Scientia Forestalis*, v.64, p.78-92, 2003.
- TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ V., V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M. (Ed.). Tópicos em ciência do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.1, p.195-276, 2000.
- TUFFI SANTOS, L.D.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, L.R.; DUARTE, W.M.; TIBURCIO, R.A.S.; SANTOS, M.V. Intoxicação de Espécies de eucalipto submetidas à deriva do glyphosate. *Planta Daninha*, v.24, p.359-364, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582006000200020>
- UPCHURCH, R.P. Behavior of herbicides in soil. *Residue Reviews*, v.16, p.46, 1966.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, v.19, p.703-707, 1987. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- VIVIAN, R.; REIS, M.R.; JAKELAITIS, A.; SILVA, A.F.; GUIMARÃES, A.A.; SANTOS, J.B.; SILVA, A.A. Persistência de sulfentrazone em Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. *Planta Daninha*, v.24, p.741-750, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582006000400015>
- WALLEY, F.L.; GERMIDA, J.J. Estimating the viability of vesicular-arbuscular mycorrhizae fungal spores using tetrazolium salts as vital stains. *Mycologia*, v.87, p. 273-279, 1995. <http://dx.doi.org/10.2307/3760914>