

Tolerância de isolados *Pisolithus* sp. ao glyphosate *in vitro*⁽¹⁾

Cleriston Souza Silva⁽²⁾, Lidia Alves Antunes⁽³⁾, Paulo Henrique Graziotti⁽⁴⁾, Arley José Fonseca⁽⁵⁾, Mayara Cristina Silva Fernandes⁽⁶⁾, José Barbosa⁽⁷⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Fapemig.

⁽²⁾ Estudante de graduação em Engenharia Florestal Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, cleristonflorestal@gmail.com; ⁽³⁾ Estudante de graduação em Agronomia Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; Diamantina, Minas Gerais; ⁽⁴⁾ Prof. Associado, departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; ⁽⁵⁾ Estudante mestrado em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; ⁽⁶⁾ Estudante de graduação em Engenharia Florestal Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; ⁽⁷⁾ Prof. Adjunto, departamento de Agronomia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

RESUMO: Os fungos ectomicorrízicos possuem tolerância diferenciada aos herbicidas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a tolerância de isolados de *Pisolithus* sp. ao glyphosate em meio de cultura sólido e líquido. Os tratamentos foram em esquema fatorial 5x5, sendo os isolados D10, D17, D51, D106 e D118 de *Pisolithus* sp. e as concentrações 0; 33,3; 66,6; 133,3 e 266,6 $\mu\text{L L}^{-1}$ de glyphosate, com 9 repetições. O crescimento dos isolados foi avaliado aos 30 dias em meio MNM sólido pelo diâmetro das colônias e em meio líquido pela massa seca de micélio. Como os isolados possuem velocidade de crescimento diferente, para comparação entre eles foi calculado o índice de tolerância (IT%), que representa a porcentagem do crescimento dos isolados no meio com o glyphosate em relação ao crescimento no meio sem o herbicida. Os isolados tiveram tolerância diferenciada ao glyphosate e esta tolerância foi dependente das concentrações e tipo do meio de cultura usado. Em meio sólido os isolados foram pouco influenciados pelo glyphosate e em meio líquido foram muito sensíveis. Em meio sólido D17 é mais estimulado na concentração inicial e o D106 o mais tolerante em todas as concentrações. Em meio líquido o D10 é o mais estimulado na concentração inicial e o D51 o mais tolerante.

Termos de indexação: Ectomicorriza, herbicida e fungo ectomicorrízico.

INTRODUÇÃO

O glyphosate é um herbicida não seletivo, pós-emergente e de ação sistêmica, com elevada amplitude de utilização (COX, 2000). É o herbicida mais usado no controle de plantas daninhas na cultura do eucalipto (TUFFI SANTOS et al., 2005), pois exerce efetivo controle de grande número de espécies daninhas e com baixo impacto ambiental (MALIK, et al., 1989). O maior problema do uso desse herbicida é a deriva acidental (TUFFI

SANTOS, 2005), pois compromete o controle das plantas daninhas e leva ao aumento compensatório da dosagem, elevando os gastos e causando prejuízos às espécies não-alvo e ao meio ambiente (HEMPHILL JÚNIOR e MONTGOMERY, 1981). Há trabalhos que demonstram efeitos inibitórios do glyphosate sobre micro-organismos em meio de cultura (QUINN et al., 1988; GORLACH-LIRA et al., 1997).

O uso de herbicidas pelas empresas florestais pode inibir a formação de ectomicorrizas (ILOBA, 1978; CULDLIN, 1983; TRAPPE et al., 1984). Contudo, alguns estudos demonstram que o efeito do herbicida sobre os FEM podem ser: nenhum efeito (WARDLE e PARKINSON, 1990, 1991) e de estimulação (ROSLYCKY, 1982). Esta resposta dos FEM aos herbicidas é dependente da espécie, do herbicida e da dosagem (TRAPPE et al. 1984; MOORMAN, 1989). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a tolerância de isolados de *Pisolithus* sp. ao glyphosate em meio de cultura sólido e líquido.

MATERIAL E MÉTODOS

O crescimento dos isolados D10, D17, D106 e D118 de *Pisolithus* sp., obtidos de plantações de *Eucalyptus* spp. na região do Alto Vale do Jequitinhonha, foi avaliado em meio Melin-Norkrans modificado - MNM líquido e sólido adicionados de concentrações crescentes do herbicida glyphosate na fórmula do Roudup Original[®]. O Roudup Original é um herbicida não seletivo de ação sistêmica do grupo químico glicina substituída, tem como princípio ativo o sal de amônio de glyphosato e é medianamente tóxico.

Os tratamentos foram estabelecidos pelo esquema fatorial 5x5, sendo os cinco isolados de *Pisolithus* sp. e as concentrações de glyphosate: 0; 33,3; 66,6; 133,3 e 266,6 $\mu\text{L L}^{-1}$, com nove repetições. As concentrações do glyphosate foram estabelecidas pela dose recomendada para a cultura (5 L ha⁻¹) fazendo-se uma extrapolação para

a área da placa de Petri (0,006362 m²). As concentrações foram obtidas a partir de soluções estoques dos herbicidas preparadas com água destilada e esterilizada, em câmara de fluxo laminar.

A partir de culturas dos isolados crescidas por 29 dias a 25 °C em meio de cultura sólido MNM foram retirados discos de 5 mm de diâmetro das bordas das colônias de cada isolado. Em seguida transferiu-se os discos para placas de Petri contendo o mesmo meio e incubados por mais três dias sob as mesmas condições para permitir a recuperação do micélio danificado durante a repicagem, confirmar a viabilidade e comprovar a ausência de contaminações. Este procedimento inicial foi realizado em todos os ensaios.

Ensaio em meio de cultura sólido

O meio de cultura foi esterilizado e após ser resfriado até a temperatura de 45 °C em banho-maria recebeu alíquotas da solução estoque do glyphosate para produzir as diferentes concentrações. Em seguida, 20 mL do meio foram vertidos em placas de Petri. Após a solidificação do meio de cultura, um disco de 5 mm de diâmetro, contendo o micélio previamente crescidos por três dias, foi colocado no centro de cada placa de Petri com micélio voltado para cima e incubado a 25 °C por 30 dias. Ao final deste período, o crescimento radial das colônias dos isolados foi avaliado pela média de dois diâmetros da colônia obtidos em duas direções diferentes e cálculo do índice de tolerância (IT%), multiplicando o diâmetro das colônias nos meios contendo as concentrações de glyphosate por cem e dividindo pelo diâmetro das colônias no meio sem o herbicida. Essa variável foi usada para comparação entre isolados porque estes possuem velocidade de crescimento diferente.

Ensaio em meio de cultura líquido

Quarenta e oito mililitros do meio de cultura foram colocados em Erleymeyers de 125 mL e esterilizados e após o resfriamento, foi adicionado assepticamente alíquotas da solução estoque de glyphosate para produzir as concentrações finais de glyphosate. Em seguida, 10 discos de 5 mm de diâmetro das bordas das colônias dos isolados pré-crescidos por três dias foram adicionados aos frascos e incubados a 25 °C. Os frascos foram suavemente agitados por três segundos todos os dias e, ao final de 30 dias, o micélio foi coletado em peneira de abertura de malha de 0,053 mm, lavado com água destilada e colocado para secar a 60 °C por três dias para determinação da massa seca de

micélio e cálculo do índice de tolerância (IT%), multiplicando a produção de massa seca nos meios contendo as concentrações de herbicidas por cem e dividindo pela produção de massa seca no meio sem herbicida.

Análise estatística

Os tipos de meio de cultura foram analisados em ensaios independentes. Os dados de IT% foram submetidos análise de variância, e quando a interação foi significativa tentou-se estabelecer regressões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tolerância dos isolados em meio sólido

Os isolados de *Pisolithus* sp. que apresentaram maior crescimento em meio sem a adição de glyphosate foram, em ordem decrescente: D10 = 811,1mm; D51 = 657,9 mm; D118 = 619,4 mm; D106 = 570,0 mm e D17 = 548,2 mm. O IT% dos isolados de *Pisolithus* sp. ao glyphosate foi influenciado de forma diferenciada entre os isolados (Figura 1). Os IT% de todos os isolados reduziram nas maiores concentrações de glyphosate, mas para nenhum deles foi observado redução de 50 % do crescimento. O crescimento dos D17 e D51 foi estimulado nas menores concentrações de glyphosate. Para o D17 esse estímulo ocorreu com a adição de até 35,0 µL L⁻¹ de glyphosate, em que o IT% foi de 107,0 %. O D51 também foi estimulado com 33,3 µL L⁻¹ com IT% de 105,8%. O D10 foi o mais sensível, já decrescendo de forma raiz quadrada e o IT% do D106 reduziu de forma linear, contudo na maior concentração foi o menos influenciado. Na maior concentração os isolados em ordem decrescente de IT% foram: D106 > D17 > D118 > D51 > D10. Estes resultado corroboram com o observado também em meio sólido, para os herbicidas triclopyr, glyphosate, hexazinone e 2,4D, que em concentrações menores que 100 mg L⁻¹ não inibiram o crescimento dos *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma longicaudum* e *Pisolithus* sp. (ESTOK et al. 1989).

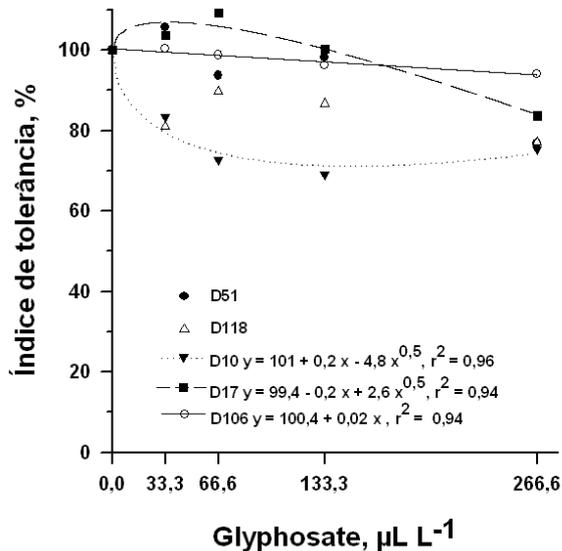


Figura 1: Índice de tolerância (IT%) para o diâmetro de colônia dos isolados de *Pisolithus* sp. crescidos em meio de cultura MNM sólido com glyphosate.

Tolerância dos isolados em meio líquido

Para o ensaio em meio líquido os isolados de *Pisolithus* sp. apresentaram a seguinte produção de massa seca de micélio no meio sem a adição de glyphosate: D10 = 259 mg; D51 = 222 mg; D17 = 209 mg; D118 = 198 mg e D106 = 140 mg. O IT % de todos os isolados de *Pisolithus* sp. reduziu nas maiores concentrações de glyphosate. (Figura 2). A concentração que reduziu o crescimento em 50 % para o D51 foi de 53,08 $\mu\text{L L}^{-1}$, de 28,16 $\mu\text{L L}^{-1}$ para D118 e de 19,15 $\mu\text{L L}^{-1}$ para o D106. O D10 foi estimulado na concentração de 33,3 $\mu\text{L L}^{-1}$ em que seu IT% foi de 131%, mas ele já mostrou-se sensível na concentração de 66,6 $\mu\text{L L}^{-1}$ com IT% de 43% e o D17 já mostrou-se sensível na concentração inicial de 33,3 $\mu\text{L L}^{-1}$ com IT% de 31%. Os isolados avaliados no presente trabalho demonstraram menor tolerância ao glyphosate do que o *Pisolithus* sp. que teve sua massa seca de micélio reduzida em 20 % em uma concentração de 250 mg L⁻¹ de glyphosate em mesmo meio de cultura líquido, crescido por 30 dias (PAULA JR. et al, 1995).

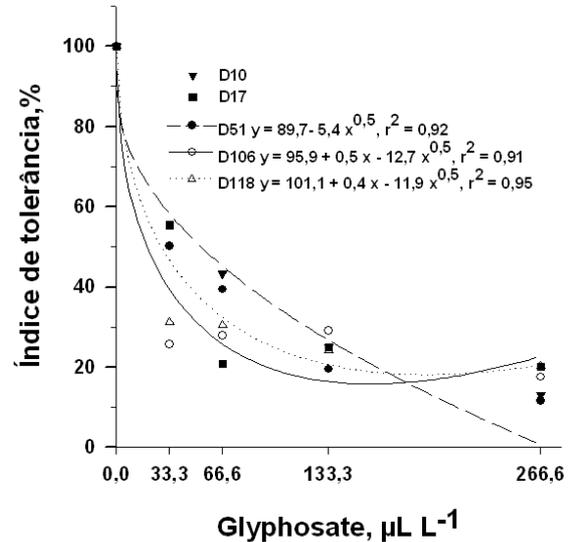


Figura 2: Índice de tolerância (IT%) para massa seca de micélio dos isolados de *Pisolithus* sp. crescidos em meio de cultura MNM líquido com glyphosate.

Considerações finais

Os isolados de *Pisolithus* sp. tiveram tolerância diferenciada ao glyphosate e esta tolerância foi dependente das concentrações e tipo do meio de cultura usado (líquido e sólido). Em meio sólido os isolados foram pouco influenciados pelo glyphosate (figura 1) e em meio líquido foram muito sensíveis (Figura 2). A maior tolerância em meio sólidos de FEM, pode ser devido à adição de ágar como agente solidificante que interferem nos processos de absorção e de translocação de íons.

A ocorrência de estímulo, ausência de efeito ou redução no crescimento dos diferentes isolados de *Pisolithus* sp. em meio de cultura observada no presente trabalho, foi semelhante ao observado para diferentes espécies em meio com adição de glyphosate (ESTOK et al. 1989).

CONCLUSÕES

Os isolados de *Pisolithus* sp. diferiram quanto a tolerância ao glyphosate.

Em meio sólido D17 é mais estimulado na concentração inicial e o D106 o mais tolerante em todas as concentrações.

Em meio líquido o D10 é o mais estimulado na concentração inicial e o D51 o mais tolerante.



AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto e à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pela infra-estrutura necessária para realização das análises.

REFERÊNCIAS

COX, C. Glyphosate factsheet. Journal of Pesticide Reform, v.108, 2000.

CULDLIN, P., MEJSTRIK, V., SKOUPY, J. Effects of pesticides on ectomycorrhizae of *Pinus sylvestris* seedlings. Plant and Soil, 17:353-361, 1983.

ESTOK, D; FREEDMAN, B; BOYLE, D. Effects of the Herbicides 2,4-D, Glyphosate, Hexazinone, and Triclopyr on the Growth of Three Species of Ectomycorrhizal Fungi. Environmental Contamination and Toxicology, 42:835-839, 1989.

GORLACH-LIRA, K.; STEFANIAK, O.; SLIZAK, W.; OWEDYK, I. The response of forest soil microflora to the herbicide formulations Fusilade and Roundup. Microbiological Research, 152:319-329, 1997.

HEMPHILL Jr., D. D.; MONTGOMERY, M. L. Response of vegetable crops to sublethal application of 2,4-D. Weed Science Society of America, 29:632-635, 1981.

ILOBA, C. The influence of 2,4-D on ectomycorrhizal symbiosis in pine and spruce seedlings. European Journal of Forest Pathology, 8:379-383, 1978.

MALIK, J.; BARRY, G.; KISHORE, G. The herbicide glyphosate. Biofactores, 2:17-25, 1989.

PAULA JR, T.J., COMERLATO, A.G., GAVASSONI, W.L., OLIVEIRA, V.L., ZAMBOLIM, L. Efeito de glifosato e oxyfluorfen sobre *Pisolithus tinctorius* e sobre a micorrização de raízes de *Eucalyptus grandis*. Revista Árvore, 19:241-248, 1995.

QUINN, J.P.; PEDEN, J.M.M.; DICK, R.E. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. Applied Microbiology and Biotechnology, 29:511-516, 1988.

ROSLYCKY, E.B. Glyphosate and the response of the soil microbiota. Soil Biology and Biochemistry, 14:87-92, 1982.

TRAPPE, J.M.; MOLINA, R; CASTELLANO M.. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhizal formation to pesticides. Annual Review Phytopathology, 22:331-359, 1984.

TUFFI SANTOS, L.D. Crescimento e morfoanatomia foliar de eucalipto sob efeito de deriva do glyphosate. Planta Daninha, 23:133-142, 2005.

WARDLE, D.A., PARKINSON, D. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. Plant and Soil, 122:29-37, 1990. .

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Relative importance of the effect of 2,4-D, glyphosate, and environmental variables on the soil microbial biomass. Plant and Soil, 134:209-219, 1991.