

GILVANI CARLA MALLMANN

**EFEITO DE POLUENTES SOBRE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES: PROPOSTA DE ADAPTAÇÃO E
AMPLIAÇÃO DE USO DO PROTOCOLO ISO/TS 10832:2009**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Dr. Dilmar Baretta

LAGES, SC

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo (a) autor (a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Mallmann, Gilvani Carla

Efeito de poluentes sobre fungos micorrízicos
arbusculares: proposta de adaptação e ampliação de
uso do protocolo ISO/TS 10832:2009 / Gilvani Carla
Mallmann. Lages - 2016.

115 p.

Orientador: Dilmar Baretta
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Do Solo, Lages, 2016.

1. Fungos micorrízicos arbusculares. 2.
Ecotoxicologia. 3. Efeito de poluentes. I. Baretta,
Dilmar . IV. Título.

GILVANI CARLA MALLMANN

**EFEITO DE POLUENTES SOBRE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES: PROPOSTA DE ADAPTAÇÃO E
AMPLIAÇÃO DE USO DO PROTOCOLO ISO/TS 10832:2009.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência do Solo.

Banca Examinadora

Orientador/Presidente:

Prof. Dr. Dilmar Baretta
(UDESC – Chapecó – SC)

Membro externo:

Prof. Dr. José Paulo F. A. de Sousa
(Universidade de Coimbra – Portugal)

Membro interno:

Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho
(UDESC – Lages – SC)

Lages, SC, 16/02/2016

*À memória de Maria Marlene
Giongo, pelo exemplo e
carinho, por ter sido muito
mais do que minha tia e a
maior entusiasta do início desta
minha jornada,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe pelo apoio de sempre, por ouvir pacientemente todas as minhas inquietações, pelas palavras acertadas e por me puxar mais de uma vez de volta pros trilhos. Por ser meu suporte, exemplo e inspiração desde sempre e para sempre.

Ao Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho, por apostar às cegas, pelo voto de confiança e orientação e por me permitir conhecer um pouquinho desse fascinante mundo dos esporos.

Ao Prof. Dr. Dilmar Baretta pela orientação, aos 45 minutos do segundo tempo e pelas pertinentes contribuições.

Ao Prof. Dr. José Paulo de Sousa pela disponibilidade e contribuições desde a concepção do projeto.

Ao amigo Márcio Gonçalves da Rosa pelo empurrão e incentivo para que essa trajetória começasse; pelas horas de mate e conversa; pela ajuda e paciência no esclarecimento de tantas dúvidas.

A Letícia Scopel, pelo apoio, contribuições e imensurável ajuda na maratona que foram os meses finais do mestrado. Pelo carinho, amizade, parceria, caronas (mesmo em época de gasolina cara, rsrs) e pelas ligações só para perguntar se estava tudo bem. Tenha certeza que elas fizeram a diferença.

A dupla dinâmica Ana Maccari e Julia Segat pelo exemplo de trabalho e dedicação, pelas contribuições, conversas e companhia em vários dos finais de semana de quase solidão na ‘Lage’.

A Ana Lovatel e Renato Betto pela paciência e ensinamentos no início das atividades; à Gessiane Ceola pelas assistências remotas desde o começo do projeto e novamente a Ana por toda a ajuda na etapa final dos experimentos.

A Julia Machado, Priscila, Ana Casara, Janaína e Mariana (‘MariJana’ a outra dupla dinâmica), Douglas,

Rafaela, Pâmela, Camila, Giovanna e a todos os demais colegas, atuais e egressos, do laboratório de Ecologia do Solo por quase sempre (risos) tornarem as muitas horas de trabalho mais alegres, pelo apoio, incentivo, exemplo e amizade de cada um (a).

Aos amigos tão queridos que vieram do ‘Velho do Oeste’ junto na bagagem, que permaneceram e que eu sei, continuam torcendo para que tudo dê certo.

Aos colegas de disciplinas pelo convívio e aprendizado. Ao Profº Julio Cesar Pires Santos pela inspiração no modo tranquilo e simples com que encara as coisas.

A Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota – CICG e seu curador Profº Dr. Sidney L. Stürmer pela disponibilização de todos os isolados fúngicos utilizados durante a realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade do mestrado.

A CAPES e UDESC/PROMOP pelo apoio financeiro e disponibilização da bolsa de mestrado.

E a todos que de alguma forma tornaram possível à realização deste projeto.

Meu sincero, OBRIGADA!

“Um ambiente bem conservado tem grande valor econômico, estético e social. Mantê-lo significa preservar todos os seus componentes em boas condições: ecossistemas, comunidades e espécies.”

Primack & Rodrigues (2001) em
Biologia da Conservação.

RESUMO

MALLMANN, Gilvani Carla. **Efeito de poluentes sobre fungos micorrízicos arbusculares: proposta de adaptação e ampliação de uso do protocolo ISO/TS 10832:2009**. 2016. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Lages, 2016.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) tem ampla ocorrência, relevância ecológica para a saúde e desenvolvimento das plantas e sensibilidade a variações nos fatores edafoclimáticos. Estas características tornam os FMAs em um grupo chave na análise de risco de contaminantes do solo. Os objetivos deste estudo foram: (1) selecionar isolados de FMAs originários de solos tropicais e subtropicais em condições adequadas de incubação para ensaios ecotoxicológicos com esporos; (2) validar o Protocolo ISO/TS 10832: 2009, baseando-se na sensibilidade de germinação à metais e agrotóxicos e (3) determinar se o tamanho do tubo germinativo (TG) e comprimento total de hifas (HF), parâmetros de crescimento pré-simbiótico, podem ser utilizados como indicadores de sensibilidade dos isolados de FMAs. No experimento um, avaliou-se a germinação de esporos de dez isolados de FMA: *Acaulospora colombiana* SCT115A, *A. koskei* SCT049C e SCT048A, *A. morrowiae* SCT400B, SCT056A e SCT063A, *Claroideoglossum etunicatum* SCT101A, *Gigaspora albida* SCT200A, *Gi. margarita* SCT077A e *Rizhophagus clarus* SCT720A, em areia sem contaminantes. Destes, cinco foram escolhidos para o experimento dois, onde a germinação foi avaliada em diferentes tempos (14 e 28 dias), temperaturas (24 e 28°C) e substratos não contaminados (areia, solo OCDE (OECD nº 207, 1984) e Solo Artificial Tropical (SAT). No experimento três, os parâmetros germinação, TG e HF de *Gi. albida* e *Gi.*

margarita foram avaliados em dois substratos (areia e SAT) com dois contaminantes (cádmio e clorpirifós). *Gi. albida* SCT200A, *Gi. margarita* SCT077A e *R. clarus* RJ102A tiveram altas taxa de germinação (>75%). Resultados mostraram que 14 dias (de acordo com o protocolo ISO) e 28°C de incubação aumentam a germinação dos isolados. A areia teve alta variação e considerada inapropriada como substrato controle, enquanto SAT foi viável e eficiente, melhorando o desempenho dos testes. Quando expostos aos contaminantes, os parâmetros TG e HF de *Gi. albida* SCT200A e *Gi. margarita* SCT077A se mostraram pouco sensíveis e com comportamento variável para as doses de contaminantes testadas. Para a germinação, ambas a espécies mostraram pouca sensibilidade aos contaminantes ($CI_{50} > 20 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd e $CI_{50} > 20 \text{ mg i.a. kg}^{-1}$ de clorpirifós). Ensaio adicionais com diferentes doses, bem como com outros isolados são indicados para poder melhorar a curva de sensibilidade das espécies aos contaminantes.

Palavras chave: 1. Fungos micorrízicos arbusculares; 2. Ecotoxicologia; 3. Efeito de poluentes.

ABSTRACT

MALLMANN, Gilvani Carla. **Pollutant effect on arbuscular mycorrhizal fungi: proposal for the adaptation and expansion of use of the protocol ISO/TS 10832:2009.**2016. 115p. Dissertation (MSc in Soil Science) – University of the State of Santa Catarina. Graduate Program in Soil Science, Lages, 2016.

The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) have broad occurrence, ecological relevance for health and development of plants and edaphoclimatic factors variation sensitivity. These characteristics makes of AMF key group on environmental risk assessment of pollutants in the soil. The aims of this study was: (1) Selecting isolate AMF originated from tropical and subtropical soils, determining suitable incubation conditions to ecotoxicological tests with spores; (2) validating ISO/TS 10832:2009 protocol, basing on germination sensitivity to metals and pesticides and (3) determining if germ tube size (GT) and total length of hyphae (HP), parameters of pre-symbiotic growth, could be used as sensitive indicators of AMF isolates. In Experiment one, was evaluated spore germination of ten isolates of AMF: *Acaulospora colombiana* SCT115A, *A. koskei* SCT049C and SCT048A, *A. morrowiae* SCT400B, SCT056A and SCT063A, *Claroideoglosum etunicatum* SCT101A, *Gigaspora albida* SCT200A, *Gi. margarita* SCT077A and *Rizhophagus clarus* SCT720A in sand without contaminants. Five were chosen for Experiment two, where germination was evaluated in different times (14 and 28 days), temperatures (24 and 28°C) and substrates uncontaminated (sand, OECD soil (OECD n° 207, 1984) and Tropical Artificial Soil (TAS). In Experiment three, germination, GT and HP parameters of *Gi.albida* and *Gi. margarita* were evaluated in two substrates (sand and TAS) with two contaminants (heavy metal cadmium and pesticide

chlorpyrifos). *Gi.albida* SCT200A, *Gi. Margarita* SCT077A and *R. clarus* RJ102A had high germination rate (>75%). Results showed that 14th days (according with ISO protocol) and 28 °C incubations increase germination of the isolates. Sand had huge variation, been inappropriate as control substrate, while TAS was viable and efficient, improving test performance. When exposed to contaminants, GT and HP parameters of *Gi. albida* SCT200A and *Gi. margarita* SCT077A had insensitive and variable behavior for doses tested. To both species germination, sensitive to contaminants was low ($IC_{50} > 20 \text{ mg kg}^{-1}$ of Cd and $IC_{50} > 20 \text{ mg a.i. kg}^{-1}$ of Chlorpyrifos). Additional tests with different doses, as well as other isolates could improving a sensitivity curve of species to contaminants.

Keywords: 1. Arbuscular mycorrhizal fungi; 2. Ecotoxicology; 3. Effect of pollutants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da montagem das unidades experimentais nos experimentos de germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares.....	62
Figura 2 – Condições de temperatura e períodos de avaliação adotados para cada espécie e substrato testados no experimento 2.....	66
Figura 3 - Porcentagem de germinação de esporos de <i>Gi. albida</i> em areia contaminada com doses crescentes de Cd.	82
Figura 4 - Porcentagem de germinação de <i>Gi. albida</i> (4a) e <i>Gi. margarita</i> (4b) em SAT contaminado com doses crescentes de Cd.	83
Figura 5 - Porcentagem de germinação de <i>Gi. albida</i> (5a) e <i>Gi. margarita</i> (5b) em SAT contaminado com doses crescentes de Clorpirifós.	87
Figura 6 - Comprimento de hifas (mm) de <i>Gi. albida</i> em SAT contaminado com doses crescentes de Clorpirifós.....	90
Figura 7 - Comprimento do tubo germinativo (mm) de <i>Gi. margarita</i> em SAT contaminado com doses crescentes de Clorpirifós.	91
Figura 8 - Comprimento do tubo germinativo (mm) de <i>Gi. margarita</i> em SAT contaminado com doses crescentes de Clorpirifós.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonômica do Filo Glomeromycota, número de espécies já descritas e de ocorrência no Brasil.....	31
Tabela 2 - Ocorrência de Glomeromycetes em diferentes Estados brasileiros. (Continua).....	33
Tabela 3 - Eventos bioquímicos e fenotípicos da germinação de esporos de 0 a 30 dias	43
Tabela 4 - Localidade e ano de estabelecimento das culturas dos isolados testados.....	60
Tabela 5 - Características químicas dos substratos utilizados.	65
Tabela 6 - Percentuais de germinação e desvio padrão (DP) dos isolados fúngicos testados no Experimento 1, após 7 e 14 dias de incubação.	69
Tabela 7 - Percentagem de germinação (% Germ) de isolados de Fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) nos substratos areia, OCDE e SAT, aos 14 e 28 dias de incubação, nas temperaturas de 24 e 28 °C.	74
Tabela 8 - Valores de germinação (%) por espécie de FMA e tratamentos que obtiveram validação de teste, segundo Protocolo ISO 10832:2009.	75
Tabela 9 - Resultados compilados de CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado) estimados para germinação, tamanho do tubo germinativo e comprimento de hifas nos testes de sensibilidade de <i>Gi. albida</i> e <i>Gi. margarita</i> à Cd e Clorpirifós.....	Error!

Bookmark not defined.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA, CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	29
2.2 REPRODUÇÃO E GERMINAÇÃO DE FMAS	39
2.3 POLUENTES NO SOLO E OS FMAS	45
2.4 ECOTOXICOLOGIA	52
3 HIPÓTESES	56
4 OBJETIVO GERAL	57
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
6 MATERIAIS E MÉTODOS	59
6.1 EXPERIMENTO 1 - SELEÇÃO PRELIMINAR DE ESPÉCIES/ISOLADOS DE FMAS COM BASE NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS	63
6.2 EXPERIMENTO 2 - ADAPTAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO PROTOCOLO PARA AS ESPÉCIES/ISOLADOS SELECIONADOS	64
6.3 EXPERIMENTO 3 - TESTE DE SENSIBILIDADE DE <i>Gi. albida</i> E <i>Gi. margarita</i> À Cd E CLORPIRIFÓS	67
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
7.1 EXPERIMENTO 1	69
7.2 EXPERIMENTO 2	73
7.3 EXPERIMENTO 3	81
7.3.1 Cádmio	81
7.3.2 Clorpirifós	86

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
REFERÊNCIAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

O solo é recurso natural não renovável que abriga uma enorme diversidade de organismos em um sistema dinâmico e interativo e que desempenha uma variedade de funções essenciais de caráter ecológico, econômico e social (COM, 2002). A interação do solo com os organismos que o habitam, por sua vez, resulta em funções importantes, como a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes, a regulação biológica e a manutenção da estrutura do solo.

A expansão e intensificação das atividades humanas sobre o ambiente adicionam ao solo grandes quantidades de compostos químicos, não existentes de forma natural no ambiente e poluentes em potencial, como, por exemplo, a deposição de rejeitos agrícolas, industriais e urbanos, a adição de defensivos agrícolas, o controle de zoonoses, além de deposições acidentais diversas (SIQUEIRA et al., 1994; DINIZ; FRAGA, 2005).

A contaminação do solo pode acarretar múltiplas consequências negativas para os organismos edáficos e cadeias alimentares, podendo inclusive, provocar a redução da biodiversidade. A perda de diversidade de organismos pode consequentemente, prejudicar estruturas ou a funcionalidade de sistemas ecológicos e assim influenciar na perda de várias funções do solo (RODRIGUES; DUARTE, 2003). Entre essas perdas, incluem-se atividades diretamente ligadas aos seres humanos, como o fornecimento de água e na produção de alimentos.

Dentre o grupo de organismos que podem ser afetados pela poluição dos solos então os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Estes, compõem a microbiota do solo e são amplamente distribuídos pelos ecossistemas terrestre. São considerados organismos chave nos sistemas solo-planta, pois são fungos capazes de estabelecer associações especializadas com as raízes de cerca de 90% das espécies de plantas

fanerógamas terrestres, incluindo espécies nativas e a maioria das espécies cultivadas (CHU, 2005).

Durante a simbiose, a planta supre o fungo com energia para crescimento e manutenção via fotoassimilados, enquanto o fungo provê à planta uma série de benefícios diretos (por exemplo, o incremento da absorção de P e outros nutrientes, facilitação do acesso à umidade do solo e o fortalecimento do sistema de resistência à patógenos) e indiretos (melhora a estruturação do solo e estabilidade de agregados) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; ARAÚJO, 2008; LOUARN et al., 2012). Além dos efeitos na nutrição e fitossanidade das plantas, os FMAs podem afetar processos em escalas maiores dentro dos ecossistemas. Cita-se aqui a composição das comunidades de fungos micorrízicos, a diversidade da superfície do solo além da produtividade vegetal, características bióticas e abióticas do solo diretamente ligadas a sustentabilidade dos ecossistemas.

Embora o ciclo de vida dos FMAs dependa do estabelecimento da simbiose (simbiotrofismo obrigatório), a etapa de germinação pode ocorrer sem a presença de um hospedeiro e é denominada de fase assimbiótica. A germinação, o crescimento do tubo germinativo, do micélio assimbiótico são eventos importantes para o processo de simbiose e são etapas que podem ser afetadas pela presença de poluentes no solo (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007). O efeito sobre essas etapas tem resultado direto sobre o ciclo de vida dos fungos, ocasionando não formação, diminuição ou até inibição da taxa de colonização micorrízica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MAIA; SILVA; GOTO, 2010).

Dentre os critérios definidos para se utilizar um organismo como bioindicador os FMAs preenchem a maioria. São sensíveis aos poluentes do solo e variações nos fatores edafoclimáticos, possuem distribuição geográfica generalizada e são ecologicamente relevantes para a saúde das plantas e ecossistemas e, é importante levá-los em conta nas avaliações

de riscos ambientais em solos contaminados com diversos tipos de poluentes (ISO, 2009).

A grande maioria das substâncias químicas em uso atualmente, não tem os seus efeitos devidamente estudados e conhecidos, o que dificulta a avaliação dos riscos dessas substâncias no ambiente (NARDOCCI, 2013). Uma das ferramentas que podem ser utilizadas para a avaliação e quantificação desses efeitos sobre a diversidade e funcionalidade dos organismos do solo é a ecotoxicologia.

Atualmente, as avaliações ecotoxicológicas da periculosidade de poluentes no solo são realizadas utilizando diversos testes com organismos vivos (principalmente da fauna do solo e plantas). Estes testes estão padronizados por diversas entidades como a ISO, a USEPA, a OCDE e a ABNT. A padronização para testes têm sido amplamente recomendada, pois permite a comparação de resultados obtidos em circunstâncias distintas, com maior controle e garantia na geração de dados (SISINNO; SÁFADI, 2013).

No que tange a avaliação do efeito ecotoxicológico de poluentes sobre os FMAs, em termos de Brasil ainda não existem protocolos de pesquisa ou normas técnicas que orientem os estudos para esse grupo de organismos. Internacionalmente, foi publicada em 2009 a norma ISO 10832, que norteia a realização de testes ecotoxicológicos sobre a germinação assimiótica de esporos de FMAs, sendo esta, a ferramenta utilizada no país.

Considerando então, a importância já citada dos FMAs, e a necessidade de entender o grau de interferência de substâncias tóxicas aliadas à escassez de metodologias a serem empregadas nesse tipo de pesquisa com FMAs no país, realizou-se o presente estudo com os objetivos de: (1) selecionar isolados de oriundos de solos tropicais e subtropicais e definir as condições de incubação ideais para a realização de testes ecotoxicológicos; (2) validar o protocolo ISO/TS 10832:2009 com base na sensibilidade de germinação a metais

e agrotóxicos e (3) determinar se outros parâmetros de crescimento assimbiótico (tamanho do tubo germinativo; comprimento total de hifas) podem ser utilizados como indicadores de sensibilidade dos isolados de FMAs.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA, CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) são componentes importantes da microbiota do solo, capazes de realizar associações simbióticas mutualísticas com um grande leque de comunidades de plantas (SILVEIRA, 1992; ÖPIK et al., 2006), cerca de 90% das espécies vasculares e a maioria daquelas de interesse florestal e agrícola (SOUZA et al., 2006; ISO, 2009)

A simbiose entre FMAs e raízes de plantas, denominada micorriza arbuscular (MA), é obrigatória para que esses fungos completem o seu ciclo de vida (BENTIVENGA et al., 2013). Durante a simbiose, ocorre a formação dos arbúsculos, uma estrutura característica e diferenciada, que se desenvolve entre a parede celular e a membrana plasmática da célula vegetal e é responsável pela maioria das trocas que acontecem entre o fungo e a planta (SOUZA et al., 2006; STÜRMER; SIQUEIRA, 2008).

Durante a associação simbiótica a planta disponibiliza ao fungo compostos fotoassimilados que permitem seu crescimento e reprodução, enquanto que o fungo provê uma gama de serviços às plantas, destacando-se o incremento da melhor nutrição mineral (especialmente P e N), viabilizando maior crescimento e produtividade, além da proteção contra patógenos, resistência a seca e a estresse por poluentes no solo (SMITH; READ, 1997; ÖPIK et al., 2006; SOUZA; SILVA; BERBARA, 2008; ISO, 2009).

Implicações ecológicas dos efeitos da associação micorrízica, vêm sendo estudadas e apontadas por diversos autores, dentre elas, destacam-se os efeitos desta simbiose no estabelecimento das sucessões primárias (NARA, 2006) e secundárias em ecossistemas terrestres (LERAT et al., 2002;

SCHOONMAKER et al., 2007; TESTE et al., 2009), na facilitação planta-a-planta em situações de estresses abióticos (EGERTON-WARBURTON et al., 2007; BINGHAM; SIMARD, 2012) e a indução à defesa das plantas contra patógenos (SONG et al., 2010; LOUARN et al., 2012). Estes efeitos afetam a composição, as interações e diversidade dentro das comunidades vegetais e dos fungos micorrízicos (SIMARD et al., 2012).

Distintas composições de táxons em comunidades de FMAs podem induzir a diferentes respostas de crescimento em plantas e assim, por sua vez, influenciar a estrutura e composição das comunidades de plantas vasculares (ÖPIK et al., 2006). Informações sobre a diversidade e fatores que afetam estrutura e funções das comunidades naturais de FMAs, por sua vez, colaboram para a determinação e compreensão dos fatores de estruturação das comunidades de plantas (ÖPIK et al., 2006; SOUZA et al., 2010). A busca de tais informações justifica grande parte dos esforços científicos no Brasil e no mundo para identificação das comunidades de fungos e a sua relação com os fatores ambientais e com as comunidades vegetais (SOUZA et al., 2010).

Atualmente as espécies de FMAs estão distribuídas em onze famílias e quatro ordens da Classe Glomeromycetes (glomeromicetos), Filo Glomeromycota, segundo a classificação proposta por Redecker, Schüssler, Stockinger, Stürmer, Morton & Walker em 2013. Essa classificação foi baseada em caracteres genéticos desses organismos e está apresentada na Tabela 1. Os websites da Coleção Internacional de Cultura de Fungos Micorrízicos Arbusculares – INVAM <<http://invam.wvu.edu/>> e o <www.amf-phylogeny.com/>, disponibilizam uma descrição completa das classificações taxonômicas para Glomeromycota e das espécies de FMAs.

Tabela 1 - Classificação taxonômica do Filo Glomeromycota, número de espécies já descritas e de ocorrência no Brasil.

Orden	Família	Gênero	Número de espécies	
			Descritas	Brasil
<i>Archaeosporales</i>	<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>	9	4 (44 %)
	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i>	2	2 (100 %)
	<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geosiphon</i>	1	0
<i>Diversiporales</i>	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>	41	25 (61 %)
	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora</i>	9	1 (11 %)
		<i>Otosporora</i>	1	0
		<i>Redekera</i>	3	1 (33 %)
	<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophospora</i>	3	1 (33 %)
	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i>	8	6 (75 %)
		<i>Dentiscutata</i>	4	2 (50 %)
		<i>Racocetra</i>	13	8 (61 %)
		<i>Scutellospora</i>	23	14 (61 %)
	<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>	7	1 (14 %)
<i>Glomerales</i>	<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus</i>	7	5 (71 %)
	*	<i>Sclerocystis</i>	8	5 (63 %)
	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i> ,	82	31 (38 %)
		<i>Dominikia</i>	4	0
		<i>Funneliformis</i>	9	3 (33 %)
		<i>Kamienskia</i>	2	0
		<i>Rhizophagus</i>	12	6 (50 %)
		<i>Septoglomus</i>	5	2 (40 %)
<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i> ;	3	2 (67 %)
Total	11	22	256	119 (46 %)

* Táxon sem evidências suficiente para ser proposto.

Fonte: Adaptado de SOUZA et al., 2010.

Embora não apresentem um número muito grande de espécies, por volta de 250 são mundialmente conhecidas, os FMAs estão amplamente distribuídos por todo o mundo (ÖPIK et al., 2006; SOUZA et al., 2006). A ubiquidade se deve, provavelmente, a aparente falta de especificidade quanto ao hospedeiro para a efetivação da associação (KLAUBERG-FILHO, 1999). Aliada ao modo de reprodução clonal, a ausência de especificidade de hospedeiros, tem sido utilizada para explicar a baixa riqueza de espécies de FMAs (SOUZA; SILVA; BERBARA, 2008).

Em ecossistemas brasileiros, segundo levantamento realizado por Stürmer & Siqueira (2008) foram identificadas um total de 99 espécies de FMAs e, aproximadamente 51% das espécies até então descritas. Em 2010, Souza et al. atualizaram o número para 119 espécies descritas no Brasil, indicando os ecossistemas do país como fonte relevante da diversidade desses organismos (Tabela 2).

Foram encontrados registros de ocorrência de espécies de FMAs para 18 Estados e o Distrito Federal e as maiores riquezas foram observadas nos Estados de São Paulo (85 espécies), Pernambuco (62), Bahia (61), Paraná (58), Rio Grande do Sul (50) e Pará (45) (Tabela 2). Das 119 espécies 15 apresentam maior distribuição geográfica (entre 12 e 18 Estados): *Acaulospora colombiana*, *A. foveata*, *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, *A. tuberculata*, *Ambispora appendicula*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Gigaspora margarita*, *Glomus macrocarpum*, *Paraglomus occultum*, *Rhizophagus clarus*, *R. diaphanum*, *Sclerocystis sinuosa* e *Scutellospora pellucida* (Souza et al., 2010).

Tabela 2 - Ocorrência de Glomeromycetes em diferentes Estados brasileiros. (Continua)

Espécies de FMA	Norte			Nordeste			Centro-Oeste			Sudeste			Sul			N T E				
	AM	PA	MA	PI	CE	PB	PE	AL	BA	DF	GO	MS	MG	ES	RJ		SP	PR	SC	RS
<i>A. scrobiculata</i> *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17
<i>A. spinosa</i> *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11
<i>A. tuberculata</i> *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
Ambispora																				
<i>A. apendiculata</i> *	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
<i>A. fecundispora</i>										+		+		+	+					2
<i>A. gerdemannii</i>	+					+				+			+			+				9
<i>A. leptoiicha</i>	+											+			+					4
Archaeospora																				
<i>A. trappei</i>				+								+		+		+				6
<i>A. schenckii</i>											+					+				2
Claroideoglomus																				
<i>C. claroideum</i>	+			+		+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>C. etunicatum</i> *	+				+						+	+	+	+	+	+	+	+	+	16
<i>C. lamellosum</i>																	+			1
<i>C. luteum</i>																	+			1
<i>C. claroideum</i>																+				1
Dentiscutata																				
<i>D. erythropus</i>	+						+								+					3
<i>D. heterogama</i> *	+			+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12
Diversispora																				
<i>D. spurca</i>	+						+	+	+						+	+	+	+	+	6

NTE – Número total de espécies; * espécies marcadas com asteriscos são pouco afetadas por mudanças geográficas.

Fonte: Adaptado de Souza et al., 2010.

Tabela 2 - Ocorrência de Glomeromycetes em diferentes Estados brasileiros. (Continua)

Espécies de FMA	Norte			Nordeste					Centro-Oeste				Sudeste			Sul			T	N	E						
	AM	PA	MA	PI	CE	PB	PE	AL	BA	DF	GO	MS	MG	ES	RJ	SP	PR	SC				RS					
<i>Entrophospora</i>																											
<i>E. infrequens</i>	+																			+	+	+	+	8			
<i>Funneliformis</i>																											
<i>F. caledonium</i>	+																							+	3		
<i>F. geosporum</i> *	+																								+	11	
<i>F. mosseae</i>																									+	9	
<i>Gigaspora</i>																											
<i>G. albida</i>																										+	9
<i>G. decipiens</i>																										+	8
<i>G. gigantea</i>																										+	10
<i>G. margarita</i> *																										+	15
<i>G. ramisporophora</i>																										+	3
<i>G. rosea</i>																										+	2
<i>Glomus</i>																											
<i>G. aggregatum</i>																										+	7
<i>G. albidum</i>																										+	3
<i>G. ambisporum</i>																										+	2
<i>G. arborese</i>																										+	1
<i>G. australe</i>																										+	1
<i>G. deserticola</i>																										+	6
<i>G. dimorphicum</i>																										+	1
<i>G. formosanum</i>																										+	2
<i>G. fuegianum</i>																										+	2

NTE – Número total de espécies; * espécies marcadas com asteriscos são pouco afetadas por mudanças geográficas.

Fonte: Adaptado de Souza et al., 2010

Tabela 2 - Ocorrência de Glomeromycetes em diferentes Estados brasileiros. (Continua)

Espécies de FMA	Norte			Nordeste						Centro-Oeste			Sudeste				Sul			NTE	
	AM	PA		MA	PI	CE	PB	PE	AL	BA	DF	GO	MS	MG	ES	RJ	SP	PR	SC		RS
<i>G. globiferum</i>	+							+									+	+			3
<i>G. glomerulatum</i>	+						+														5
<i>G. halonatum</i>									+								+				2
<i>G. heterosporum</i>							+										+				3
<i>G. hoi</i>																					2
<i>G. invermaitum</i>	+						+							+			+				11
<i>G. macrocarpum</i>	+						+				+			+			+				17
<i>G. magnaicaule</i>																		+			2
<i>G. microagregatum</i>	+						+							+			+				10
<i>G. microcarpum*</i>	+						+							+			+				10
<i>G. monosporum</i>																	+				4
<i>G. multicaule</i>																					1
<i>G. multisubstensum</i>																	+				1
<i>G. nanolumem</i>																					1
<i>G. pallidum</i>																					1
<i>G. pansihalos</i>																			+		1
<i>G. reticulatum</i>																	+				2
<i>G. tenebrosus</i>																	+				3
<i>G. tenue</i>																	+				1
<i>G. tortosum</i>	+													+			+				7
<i>G. versiforme</i>	+													+			+				3
<i>G. viscosum</i>	+																				1

NTE – Número total de espécies; * espécies marcadas com asteriscos são pouco afetadas por mudanças geográficas.

Fonte: Adaptado de Souza et al., 2010.

Tabela 2 - Ocorrência de Glomeromycetes em diferentes Estados brasileiros. (Continua)

Espécies de FMA	Norte		Nordeste					Centro-Oeste			Sudeste			Sul		N T E			
	AM	PA	MA	PI	CE	PB	PE	AL	BA	DF	GO	MS	MG	ES	RJ		SP	PR	SC
<i>Pacispora</i>																			
<i>P. scintillans</i>																+			1
<i>Paraglomus</i>																			
<i>P. brasilianum</i>	+							+							+				4
<i>P. occultum*</i>	+				+			+							+				12
<i>Racocetra</i>																			
<i>R. castanea</i>			+					+							+				4
<i>R. coralloidea</i>				+					+						+				7
<i>R. fulgida</i>						+		+							+				5
<i>*R. gregaria</i>			+												+				6
<i>R. minuta</i>															+				1
<i>R. persica</i>	+							+							+				7
<i>R. vernucosa</i>							+				+				+				6
<i>R. weresubiae</i>	+						+				+				+				10
<i>Redeckera</i>																			
<i>R. fulvum</i>																+			1
<i>Rhizophagus</i>																			
<i>R. clarus*</i>	+														+				12
<i>R. diaphanum</i>	+		+						+						+				13
<i>R. fasciculatus</i>	+														+				7
<i>R. intraradices</i>															+				5
<i>R. manihotis</i>															+				2
<i>R. vesiculiferus</i>																			1

NTE – Número total de espécies; espécies marcadas com asteriscos são pouco afetadas por mudanças geográficas.

Fonte: Adaptado de Souza et al., 2010.

Tabela 2 - Ocorrência de Glomeromycetes em diferentes Estados brasileiros.

Espécies de FMA	Norte		Nordeste					Centro-Oeste			Sudeste			Sul			NTE			
	AM	PA	MA	PI	CE	PB	PE	AL	BA	DF	GO	MS	MG	ES	RJ	SP		PR	SC	RS
Sclerocystis																				
<i>S. clavispora</i>	+				+	+	+	+					+	+	+		+			6
<i>S. coremioides</i>		+			+								+	+	+					4
<i>S. rubiformis</i>		+																		2
<i>S. sinuosa</i> *		+			+		+	+				+	+	+	+		+			12
<i>S. taiwanensis</i>					+		+													2
Scutellospora																				
<i>S. aurigloba</i>			+		+	+	+	+			+									5
<i>S. biomata</i>				+					+											5
<i>S. calospora</i> *	+		+		+					+			+	+	+		+			12
<i>S. cerradensis</i>			+		+					+										7
<i>S. dipapillosa</i>													+							2
<i>S. dipurpurescens</i>													+							2
<i>S. gilmorei</i>		+											+							6
<i>S. hawaiiensis</i>																				2
<i>S. pellicida</i> *			+		+		+	+		+			+	+	+		+			14
<i>S. pernambucana</i>																				1
<i>S. nigra</i>																				1
<i>S. reticulata</i>																				4
<i>S. scutata</i>																				2
<i>S. rubra</i>																				1
Septoglonus																				
<i>S. constrictum</i>																				4
<i>S. viscosum</i>	+																			1

NTE – Número total de espécies; * espécies marcadas com asteriscos são pouco afetadas por mudanças geográficas.

Fonte: Adaptado de Souza et al., 2010

Em Santa Catarina, Ceola (2015) caracterizou a riqueza de espécies e encontrou 23 espécies de fungos micorrízicos arbusculares para as regiões Oeste, Planalto, Leste e Sul do Estado. Nesse estudo, *Acaulospora koskei* e *Glomus* sp. foram consideradas cosmopolitas pois ocorreram em $\geq 66\%$ das áreas amostradas; outras como são *Dentisctata heterogama* e *Acaulospora morrowiae*, que ocorreram entre 34% e 65% das áreas amostradas foram consideradas espécies frequentes. As demais espécies foram classificadas como ocasionais ou mesmo raras (ocorrem em $\leq 33\%$ das áreas amostradas).

Convém ressaltar, seja para os estudos em nível de Brasil ou de Estado, que a ausência de registro não implica na ausência de determinada espécie em certo ambiente. Problemas de ordem metodológica na amostragem (número de amostras, tamanho e período de amostragem, por exemplo) podem interferir no recolhimento dos esporos e sua detecção nos levantamentos (SOUZA et al., 2010).

Além de conhecer a estrutura das comunidades, se faz necessário avançar também no conhecimento sobre os mecanismos de diversificação e ecologia dos FMAs e conseqüentemente da sua relação com os indivíduos com quem realizam associação. Esse avanço depende de esforços científicos nessas linhas de pesquisa, e também da execução de experimentos em condições controladas, da continuidade dos estudos de populações autóctones a campo e desenvolvimento de protocolos de transformações desses fungos (SOUZA; SILVA; BERBARA, 2008).

2.2 REPRODUÇÃO E GERMINAÇÃO DE FMAS

Os glomeromicetos reproduzem-se principalmente de forma assexuada por clonagem e seus esporos, denominados de glomerosporos (GOTO; MAIA, 2006), constituem a principal

via de propagação dos FMAs e estão entre os de maior tamanho do Reino Fungi (22 a 1050 μm) (SOUZA et al., 2010)

Os esporos são considerados bons indicadores de processos ecológicos e da influência antrópica sobre as comunidades de FMAs, já que suas presenças nos ambientes indicam uma colonização radicular eficaz, embora não se façam presentes durante todo o ciclo de vida do fungo (SOUZA, SILVA & BERBARA, 2008).

Stürmer & Siqueira (2008) e Maia, Silva & Goto (2010), apresentam os tipos de formação de glomerosporos descritos até o momento:

- Glomoide – apresenta formação do glomerosporo na porção terminal ou intercalar de uma hifa, é comum no gênero *Glomus*, mas encontrado também nos gêneros *Ambispora*, *Archaeospora*, *Diversispora*, *Pacispora* e *Paraglomus*;

- Radial-glomoide – formação do glomerosporos a partir da porção terminal de uma hifa, mas de modo radial, a partir de um complexo de hifas centrais, ocorre também em espécies de *Glomus*;

- Gigasporoide – os esporos são formados terminalmente em uma hifa bulbo esporógena dos gêneros *Gigaspora*, *Racocetra*, *Cetraspora*, *Fuscutata*, *Dentiscutata*, *Quatunica* e *Scutellospora*;

- Acaulosporoide – presentes nos gêneros *Acaulospora*, *Ambispora*, *Aschaeospora* e *Otosporora*, são formados lateralmente na hifa (no pescoço) que se conecta ao saculo esporífero terminal, o que deixa uma cicatriz na superfície do esporo;

- Entrofosporóide – glomerosporo se forma dentro da hifa que conecta o sáculo esporífero, o que deixa duas cicatrizes na superfície da parede do esporo, típico dos gêneros *Entrophospora*, *Kuklospora* e *Intraspora*.

Embora exista uma caracterização dos grupos, baseada nos esporos, estudos recentes realizados por Azevedo & Souza (2007), evidenciam a existência de dimorfismo em espécie de

Glomus, com formação diferenciada de tamanhos de glomerosporos a partir do mesmo isolado. No Gênero *Ambispora* também já se identificou o dimorfismo de algumas espécies que apresentam formação globoide e acaulosporoide (MAIA; SILVA; GOTO, 2010). Essa característica foi explicada por Azevedo & Souza (2007) como uma estratégia conservacionista que possivelmente, confere maior adaptabilidade à espécie.

Se, os glomerosporos são as estruturas fundamentais para o início do ciclo de vida dos FMAs, a germinação e o crescimento das hifas constituem as principais etapas no processo de estabelecimento da simbiose e de sobrevivência desses fungos, conhecidos por serem simbiossiontes obrigatórios (MAIA; SILVA; GOTO, 2010).

Estudos iniciais sobre a germinação de glomerosporos datam da década de 50 do século passado, realizados por Godfrey (1957) e Barbara Mosse (1959), ambos se referindo ao processo de germinação da espécie de *Endogone* (MAIA; SILVA; GOTO, 2010). Em 1985, Siqueira et al. realizaram uma revisão bibliográfica focada em dados de descrição e discussão sobre o processo germinativo dos esporos de FMAs e no estudo em questão, indicaram que a germinação acontecia por via de três processos principais: compartimentos periféricos; através da parede do glomerosporo e ainda por recrescimento da hifa de sustentação, essa última ocorrendo no gênero *Glomus*. Estudos posteriores avançaram na investigação desses aspectos para os Glomeromycota, não sendo, no entanto, conclusiva para todos os aspectos e bem defasada em alguns gêneros (MAIA; SILVA; GOTO, 2010).

Os glomerosporos constituem unidades biológicas em estado de dormência que precisam ser ativadas para dar início aos processos metabólicos que induzem a germinação e crescimento subsequente. O período de duração da fase de dormência depende de cada espécie de FMA (MAIA; SILVA; GOTO, 2010), assim como os mecanismos que induzem a

formação e crescimento do tubo germinativo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Juge et al. (2002) observaram que a estocagem dos esporos em baixas temperaturas é um dos fatores que pode contribuir para a quebra da dormência, entretanto, os mecanismos de ativação desses processos não estão completamente elucidados. Em 1983, Siqueira propôs que após absorver águas e/ou nutrientes durante o processo de extração de esporos do solo, por via úmida, estes teriam seu volume aumentado até 40%, provocando modificações nas membranas e ativando enzimas proteolíticas até então inativas no esporo, desencadeando processos bioquímicos que induzem a germinação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A etapa de germinação pode ocorrer sem a presença de um hospedeiro e inicia-se logo após a embebição e prossegue até o esgotamento das reservas nutricionais dos esporos. Na etapa inicial, após a quebra da dormência, ocorre a síntese de ácidos nucléicos e proteínas essenciais que dão suporte a formação e crescimento do tubo germinativo, que pode atingir vários centímetros, seguida da formação de ramificações e agrupamentos de células, indicando um micélio inicial (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MAIA, SILVA; GOTO, 2010). Após certo período de crescimento, há um recuo do citoplasma e o micélio cessa seu desenvolvimento quando não encontra um hospedeiro, entrando em dormência novamente, caracterizando seu biotrofismo obrigatório (MAIA, SILVA; GOTO, 2010).

Os principais eventos bioquímicos e fenotípicos dos esporos e crescimento micelial dos FMAs, em escala de tempo, de 0 aos 30 dias são apresentados no Tabela 3.

Os principais fatores que influenciam a velocidade e taxa final de germinação compreendem: pH, temperatura, umidade, luminosidade e radiação, concentração de CO₂ e oxigênio, teores de nutrientes, presença de microrganismos, composição do substrato e ação de poluentes.

Tabela 3 - Eventos bioquímicos e fenotípicos da germinação de esporos de 0 a 30 dias

Tempo (min)	Eventos
0	Embebição e aumento de volume
15 minutos	Início da síntese de RNA e proteínas
35 minutos	Síntese de proteínas e carboidratos neutros
45 minutos	Síntese de aminoácidos, ATP e ácidos graxos
5 horas	Síntese de lipídeos
13 horas	Síntese de polissacarídeos;
29 horas	Síntese de DNA não detectada
3-4 dias	Primórdios do tubo germinativo;
5-7 dias	Emergência do tubo germinativo
7-20 dias	Crescimento e ramificação;
20-30 dias	Paralisação do crescimento e nova dormência

Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2006.

O pH ótimo para a germinação e crescimento *in vitro*, em geral situa-se entre 6,0 e 7,0 para a maioria das espécies de FMAs. Algumas espécies como *Funelliformis caledonicum* germinam em condições de acidez (pH <5,5) e outras como *F. mosseae* só são capazes de formar o tubo germinativo em condições de pH >5,0 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Em solos ácidos, o Al na sua forma trivalente (Al³⁺), pode diminuir as taxas de germinação, do crescimento do tubo germinativo e afetar etapas iniciais do estabelecimento da simbiose. A magnitude desses efeitos, entretanto, depende da tolerância das espécies e isolados (MAIA, SILVA; GOTO, 2010). Em estudos de Clark (1997) esporos de *Gigaspora albida*, *Gi. gigantea* e *Gi. margarita* demonstraram alta tolerância a solo em alta saturação de Al (100%) e obtiveram taxas de germinação > 60% enquanto que a germinação de esporos de *R. clarus* e de três isolados de *C. etunicatum* foi profundamente afetada ≤ 3%. A presença de Al não inibiu o crescimento de hifas de isolados de *Gi. gigantea* (304 mm de hifas) e *Gi. margarita* (197 mm), reduziu o crescimento de hifas de *Gi. albida* (46 mm) e *R. clarus* (3 mm) e inibiu o crescimento micelial de *C. etunicatum* (0 mm).

Klugh-Stewart & Cumming (2009) notaram diferenças entre a germinação de esporos e o crescimento de hifas de *A. morrowiae*, *G. claroideum*, *R. clarus*, *C. etunicatum*, *P. brasilianum* e *D. heterogama*, em solo com saturação por Al (100%). A germinação e crescimento de hifas decresceram por conta da saturação com Al em relação ao ambiente não saturado (0% de Al), exceto para *D. heterogama* que teve um incremento em termos de germinação. Entretanto, essas respostas não influenciaram a colonização, em curto prazo, sugerindo que Al pode não ser um impedimento para a formação da associação micorrízica.

As concentrações de N no solo haviam sido relatadas como tendo pouco ou nenhum efeito sobre a germinação de esporos (DANIELS; TRAPPE, 1980), com relação ao P, quando adicionado em baixas quantidades, favorece a germinação e o crescimento assimbiótico de FMAs (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os efeitos consorciados de N e P no solo sobre a germinação de esporos foi avaliada por Bressan (2001). Nesse estudo realizado em meio agar-água (0,8%), a germinação dos esporos de *C. etunicatum* em meios com baixo nível de P (2 mg/L) foi diminuída pela adição de doses crescentes de N (5, 10 e 50 mg/L) em relação ao meio de controle, e em meios com baixo nível de N (5 mg/L) a adição de doses de P estimulou a (2, 10 e 20 mg/L) a germinação dos esporos. Indicando que a interação entre P e N afeta diferentemente a germinação de esporos.

Outro fator relevante na germinação dos esporos é a temperatura. Estudo clássico realizado por Tommerup (1983b) e Siqueira et al. (1985) já indicavam diferenças entre as espécies em que a temperatura tem intervalo propício para a germinação.

Tommerup (1983b) avaliando diferentes temperaturas e tempos de germinação, encontrou germinação máxima foi alcançada após 5 dias, com temperatura entre 25-30 °C para esporos de *S. calospora*, 7 dias para *F. caledonium* entre 20 e

25 °C e 16 dias para *A. laevis* à 20 °C. Siqueira et al. (1985) observaram que temperaturas entre 18 e 25°C são ótimas para a germinação de *G. versiforme* e de que temperaturas abaixo de 15°C ou acima de 35°C prejudicam o desenvolvimento assimbiótico de *Gi. gigantea*. As diferenças entre temperaturas podem, contudo, refletir a disparidade no ambiente a partir do qual os fungos foram isolados.

Estudos em nível de Brasil têm utilizado temperaturas próximas de 28°C (± 2 °C) e encontrado bons resultados na germinação de esporos (MAIA; YANO-MELO, 2001; CARDOSO; NAVARRO; NOGUEIRA, 2002; SOARES et al., 2009). Quanto à ação de poluentes, destacaremos no tópico a seguir os possíveis efeitos de metais e agrotóxico sobre a germinação e crescimento do tubo germinativo.

2.3 POLUENTES NO SOLO E OS FMAS

O solo é o receptáculo final de grande parte dos resíduos do planeta. As principais fontes de contaminação do solo decorrem do uso de agroquímicos, deposições de rejeitos urbanos e industriais, vazamentos e derramamentos de poluentes diversos (SIQUEIRA et al., 1994). Essas deposições podem ser acidentais ou realizadas em operações planejadas, com vistas a explorar a capacidade degradadora do solo (MARQUES, 2011). Nesse cenário, a atividade biológica do solo tem grande importância no processo de degradação, ciclagem e recuperação do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Com ocorrência generalizada em solos contaminados (STÜRMER; SIQUEIRA, 2008), os estudos sobre a ecologia de FMAs em sistemas tropicais poluídos não são muito abundantes. Quando existentes esses estudos indicam, geralmente, uma influência negativa dos compostos sobre os fungos, seja na colonização micorrízica ou sobre as etapas que

precedem a colonização radicular (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006).

Os efeitos da contaminação pelos compostos orgânicos Antraceno (hidrocarboneto aromático, produto básico para muitos corantes, inseticidas, conservantes, entre outros) e Creosoto (biocida para os agentes causadores da deterioração da madeira) em FMAs indicaram a sensibilidade destes fungos nas concentrações dos compostos testadas (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 g kg⁻¹ solo de antraceno e 0; 0,5; 1; 2 e 3 g kg⁻¹ solo de creosoto) e inibiram em 90% a colonização radicular de *Brachiaria brizantha* e *Pueraria phaseoloides* em solo infestado com *C. etunicatum* (PAULA, SIQUEIRA & SOARES, 2007).

A sensibilidade do FMAs também foi descrita por Gaspar et al. (2002), que constataram a redução de 50 % na colonização micorrízica do milho por *Glomus geosporum*, isolado de área contaminada com hidrocarbonetos na concentração de 0,1 g kg⁻¹ de fenantreno (hidrocarboneto que fornece a estrutura básica para os esteróides).

Twanabasu et al. (2013) e Twanabasu; Stevens; & Venables (2013) relataram a inibição da germinação e do crescimento de hifas de FMAs ao avaliar o efeito do Triclosan (usado como conservante e antimicrobiano) sobre a germinação de esporos e o crescimento das hifas de *Glomus intraradices*. Testado nas doses de 0,4 e 4,0 mg/L, o Triclosan não causou efeito redutor no tamanho de hifas, mas causou a redução da germinação para 43% na dose mais baixa testada, contra para 86,9% de germinação no controle.

A capacidade de tolerância de algumas espécies de FMAs a poluentes foi constatada por Hassan et al. (2014). Eles examinaram como as comunidades FMAs foram estruturadas dentro da rizosfera de 11 cultivares de salgueiro introduzidas, em solo contaminados e não contaminados com hidrocarbonetos no local de uma antiga plataforma petroquímica. A concentração do contaminante foi a principal

influência sobre a estrutura da comunidade de FMAs com diferentes famílias que dominam em cada nível de contaminantes. As amostras passaram por sequenciamento e os solos mais contaminados foram dominados por três filotipos estreitamente relacionadas com *R. irregularis*, enquanto que estes representaram apenas uma pequena proporção de sequências em solos não contaminados e moderadamente contaminados. Estes resultados corroboram com o fato de que a inoculação com estirpes é importante em tratamentos de fitorremediação.

O impacto de concentrações crescentes de diesel (0,05, 0,1, 0,25, 0,5 e 1%) sobre a germinação de *Rhizophagus irregularis* foi avaliado por Driai et al. (2015). Os resultados mostraram que a taxa de germinação na ausência de contaminantes atingiu 92% após 3 dias de incubação, enquanto que na presença de 0,1, 0,25, 0,5 e 1% de diesel, a redução na germinação foi de 47, 53, 86 e 100%, respectivamente.

Outro trabalho avaliou alterações na densidade e na taxa de colonização dos FMAs em Planossolo Háplico eutrófico em decorrência da adição de lodo de esgoto oriundo da estação de tratamento de resíduos nas doses de (0, 50, 150 e 300 Mg ha⁻¹). A adição do resíduo não afetou a densidade de esporos, mas interferiu e reduziu a colonização radicular em girassol (*Helianthus annuus* L.) uma vez que, todas as doses testadas, embora não tenham diferido estatisticamente entre si, diferiram do tratamento testemunha. Esse resultado indica que alguma substância orgânica ou inorgânica presente no resíduo pode ter provocado a inibição ou retardo na germinação dos esporos de FMAs, afetando diretamente na colonização radicular (GOMES et al., 2007).

No que tange aos metais, a sua origem nos solos pode ser litogênica (onde os metais ocorrem como constituintes de minerais primários em rochas) ou antropogênica (introdução de metais no solo pelo homem). A fonte antropogênica é a principal forma de poluição e os mais altos teores de metais

encontrados na superfície do solo são, normalmente, oriundos dessa fonte (DOMINGUES, 2009). O crescente incremento desses nos diversos ecossistemas terrestres tem sido acompanhado pela preocupação com a disseminação desses elementos, em concentrações que podem comprometer a qualidade dos ecossistemas (SIQUEIRA et al., 1994).

Em termos de quantidade de estudos realizados, os que abordam os efeitos dos metais sobre os FMAs, são maiores do que para outros grupos de poluentes do solo. Esses estudos em geral, demonstram que presença de metais no solo, em concentrações altas, tende a afetar negativamente os FMAs, reduzindo a germinação e crescimento micelial (VIVAS; BAREA; AZCON, 2005; AMIR; JASPER; ABBOTT, 2008), o grau de colonização (WATTS WILLIAMS; PATTI; CAVAGNAR, 2012; YANG et al., 2015; WU et al., 2016) e o processo de esporulação desse grupo de fungos (AMIR et al., 2013; YANG et al., 2015).

Grande parte das pesquisas, entretanto, não é sobre o efeito dos metais sobre a germinação dos esporos (GONZALEZ-GUERRERO et al, 2008; CORNEJO et al., 2013; SCHNEIDER et al, 2013) e sim no efeito dos FMAs sobre o crescimento das plantas em locais contaminados. Os relatos envolvendo o hospedeiro destacam efeitos como: maior crescimento e biomassa vegetal em solos contaminados com Zn e Pb (OGAR; SOBCZYK; TURNAU, 2015), contaminados com Cd e Zn e Pb (REDON; BÉGUIRISTAIN; LEYVAL, 2009), com Arsênio (As) (LENG et al., 2010), com As, Cu, Pb, e Zn (NEAGOE et al., 2014).

Os estudos apontam ainda a imobilização e transformação de Cromo (Cr) por FMAs em raízes cultivadas (WU et al. 2015); a influência na tolerância a níquel (Ni) em plantas (AMIR; JASPER; ABBOTT, 2008), aumento da concentração de P na parte aérea de plantas endêmicas de solos ultramáficos (AMIR et al., 2013), a retenção de metais (Cu, Cd, Zn e Pb) em micélio de fungos micorrízicos arbusculares

(CABRAL et al., 2010) e os efeitos dos FMAs na aquisição de P, crescimento das plantas e na redução da fitotoxicidade de Cd (JIANG et al., 2016).

Gadd et al. (2001) citam que, embora alguns aspectos do ciclo de vida dos FMAs sejam diretamente afetados pela presença de metais, estes possuem propriedades que permitem a tolerância e a diminuição da toxicidade a essas substâncias tais como: a formação da ligação metal-proteína, o transporte ativo, a compartimentação intracelular além da capacidade de alguns constituintes da parede celular de adsorver metais

À exemplo do que ocorre com os metais, os efeitos dos agrotóxicos sobre os FMAs, ainda são pouco estudados, as pesquisas nessa linha geralmente dão ênfase nos efeitos sobre a simbiose ou em parâmetros observados nos hospedeiros do que especificamente em parâmetros da fase assimiótica desses fungos. Na sequência, serão apresentados alguns estudos que avaliam o efeito de alguns agrotóxicos sobre as diversas fases do ciclo de vida dos FMAs.

Malty, Siqueira & Moreira (2006) pesquisaram os efeitos do Glifosato sobre as espécies *Gi. margarita*, *C. etunicatum* e *D. heterogama* em concentrações crescentes do herbicida (0 a 454 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a micorrização da soja e observaram diferentes comportamentos de sensibilidade: a adição do glifosato estimulou a na germinação de esporos de *Gi. margarita* (até a concentração 111,75 μM), enquanto que a germinação dos esporos de *D. heterogama* e *C. etunicatum* sofreram inibição linear com o aumento das concentrações. Para as três espécies houve inibição do crescimento do tubo germinativo dos esporos.

Druille et al. (2013) também investigaram os efeitos da aplicação de glifosato nos esporos de FMAs e na viabilidade de colonização da raiz. Testaram: (1) duas espécies de plantas (*Paspalum dilatatum* e *Lotus tenuis*), (2) doses de glifosato, em três níveis (0 L ha^{-1} , 0,8 L ha^{-1} e 3 L ha^{-1}), e (3) e aplicação em no solo (via direta) e folhagem da planta (via indireta). A

viabilidade dos esporos foi reduzida já na menor dose glifosato, quando este foi aplicado sobre o solo e a colonização radicular total para ambas as espécies foi semelhante e diminuiu em ambas as formas de aplicação do glifosato.

O impacto do herbicida Nicosulfuron sobre a estrutura de comunidade nativa de FMAs (região de campo, na Sérvia) e potencial de colonização micorrízica foi testado em duas etapas por Karpouzas et al. (2014): (1) exposição extrema pela aplicação repetida de uma gama de doses (x0, X10, X100, X1000 a dose recomendada) e (2) em cenários de exposição realistas (x0, x1, x2, x5 a dose recomendada no campo). Nas doses extremas de x100 e x1000, houve significativa redução da biomassa vegetal, da colonização micorrízica e da riqueza fúngica (determinada por DGGE), coincidindo com a acumulação progressiva de concentrações do herbicida no solo. Em contraste, nenhum efeito os FMAS foram observadas naquelas doses de cenário de exposição realista.

Os herbicidas Prometrin e o Acetocloro foram testados por Li et al. (2013) nas doses de 0,1, 1 e 10 mg L⁻¹ e os autores não identificaram nenhum impacto significativo sobre a germinação de esporos *C. etunicatum* na presença de Acetocloro em todas as três concentrações testadas, enquanto que uma significativa redução foi observada com Prometrin apenas na concentração mais elevada. Entretanto, ambos os herbicidas exerceram efeitos negativos sobre a simbiose micorrízica no crescente das concentrações e Prometrin se mostrou mais tóxico do que o acetocloro.

As comunidades de FMAS também podem ser ameaçadas pela aplicação de fungicidas, usados para o controle de fungos patogênicos. Buysens; Dupré De Boulois & Declerck (2015) investigaram em condições , o impacto da Azoxistrobina (um fungicida de amplo espectro sistêmico), Flutolanil (um fungicida para Basidiomycota sistêmico-específico) e Pencicuron (um fungicida de contato específico para *Rhizoctonia*) - em suas respectivas formulações: Amistar,

Monarch e Monceren - sobre o crescimento e desenvolvimento do FMA *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833. Os resultados demonstraram que Azoxistrobina, em valores-limite para o controle de *R. solani*, não afetou a germinação de esporos e colonização das raízes de batata por *R. irregularis*, enquanto o desenvolvimento de micélio e a produção de esporos extrarradiculares foi reduzida em 10 vezes. Flutolanil não afetou a germinação de esporos ou desenvolvimento extraradical, mas diminuiu a colonização radicular e formação de arbúsculos. No caso do Pencicuron não se observou efeitos sobre a germinação de esporos e desenvolvimento intra ou extraradical de *R. irregularis*.

Campos et al. 2015, procuraram indicar, dentre alguns fungicidas químicos recomendados para o controle das doenças em feijoeiro, quais seriam mais adequados considerando-se os fungos micorrízicos arbusculares nativos como bioindicadores. Para isso, avaliaram o efeito de sete tratamentos sobre a colonização micorrízica, o número de esporos viáveis, teores foliares de N, P e K, massa seca da raiz e da parte aérea de feijão. Os tratamentos foram: água (controle), azoxistrobina (120 g ha^{-1}), piraclostrobina (75 g ha^{-1}), tebuconazol + trifloxistrobina ($0,7 \text{ L ha}^{-1}$), trifloxistrobina (225 g ha^{-1}), óxido cuproso ($1,5 \text{ Kg ha}^{-1}$) e mancozebe ($2,5 \text{ Kg ha}^{-1}$). Azoxistrobina, tebuconazol + trifloxistrobina e trifloxistrobina não causaram diferença significativa na colonização de FMAs nativos, na quantidade de esporos no solo nem nos teores de N, P e K foliar em relação ao controle. Piraclostrobina, óxido cuproso e mancozebe inibiram a colonização micorrízica em referência ao controle. Assim sendo, a azoxistrobina, tebuconazol + trifloxistrobina ou trifloxistrobina são as opções mais indicadas no controle das doenças do feijoeiro sem comprometer a preservação dos FMAs nativos.

2.4 ECOTOXICOLOGIA

Estudos sobre os efeitos de substâncias adicionadas ao solo sobre os organismos terrestres são complexos devido a gama de fatores edafoclimáticos relacionados (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). A ecotoxicologia surgiu, como uma ferramenta de avaliação e quantificação desses efeitos.

De um modo geral, os testes de toxicidade proporcionam uma estimativa da concentração da substância testada que é capaz de provocar a morte (organismos da fauna) ou não germinação (FMAs e plantas) de 50% da população exposta (CL_{50} e CI_{50} , respectivamente) (OLIVEIRA, 2013). Outra possibilidade é o cálculo da concentração maior em que não se observa efeito adverso significativamente em relação ao controle denominada CENO (do inglês: no observed effects concentration – NOEC) e da menor concentração do agente tóxico, que causa efeito deletério estatisticamente significativo na população observada, denominada (CEO) (do inglês: lowest observed effects concentration - LOEC) (WALKER et al., 2001).

Tais informações, embora gerem controvérsias na comunidade científica, pois são considerados um método não muito sensível que produz resultados ambíguos e não fornece intervalos de confiança de suas estimativas (MURADO; PRIETO, 2013), ainda servem como uma forma válida de quantificação de toxicidade, podendo variar conforme o elemento tóxico e a espécie exposta (AN et al., 2004).

O termo ecotoxicologia foi proposto em 1969, pelo toxicologista francês René Truhaut, como um ramo da toxicologia que estuda os efeitos dos produtos químicos e antropogênicos sobre os ecossistemas em diferentes níveis de organização biológica, a partir do nível molecular e celular a todo o ecossistema (BHAT, 2013). É, portanto, uma mistura de dois diferentes tipos de pesquisa: (1) a pesquisa sobre as interações das substâncias químicas tóxicas com organismos

vivos individuais (toxicologia) e (2) a pesquisa sobre o ambiente natural (ecologia) (CARDOSO; ALVES, 2012).

Inicialmente a ecotoxicologia desenvolveu-se para os ecossistemas aquáticos. A ecotoxicologia terrestre é mais recente e tem sido definida como o subcampo da ecotoxicologia que se utiliza de testes para estudar, avaliar e quantificar os efeitos das substâncias tóxicas sobre a funcionalidade e diversidade em plantas e animais (GARCIA, 2004).

Até 1995, existiam dois métodos ecotoxicológicos internacionalmente aceitos para organismos do solo: um teste usando minhocas em solos artificiais (OCDE, 1984a) e outro utilizando a avaliação plantas (OCDE, 1984b). Desde então, uma ampla variedade de bioensaios ou testes ecotoxicológicos, com solos e organismos padronizados surgiram aumentando consideravelmente o banco de dados em ecotoxicologia terrestre (GOMEZ-EYLES et al., 2009 apud CARDOSO; ALVES, 2012). Esses bioensaios, além de avaliar parâmetros relevantes têm a característica de serem rápidos, simples e replicáveis (CARDOSO; ALVES, 2012).

A maioria dos estudos ecotoxicológicos para organismos do solo são baseados em invertebrados não-alvo, com foco no uso de minhocas (OCDE, 2004; ISO, 1998a), colêmbolos (ISO, 1999) e enquitreídeos (ISO, 2004) como bioindicadores. A utilização destes grupos tornou-se padrão, porque eles são amplamente distribuídos pelos ecossistemas, desempenham papéis ecológicos relevantes, vivem em contato permanente com solos, reproduzem rapidamente ainda são facilmente mantidos em laboratório (RÖMBKE; BAUER; MARSCHNER, 1996; OEHHA; 2009).

Outras espécies de invertebrados que têm demonstrado potencial como indicadores de qualidade do solo e potencial uso em testes ecotoxicológicos e incluem aranhas (MAZZIA et al., 2015), ácaros (CHELINHO et al., 2013), besouros (KROMP, 1999), formigas (LOBRY DE BRUYN, 1999;

HAYASAKA, 2015), isópodas (HAYASAKA, 2015), dentre outros.

Os microrganismos também podem oferecer informações importantes e que podem ajudar na interpretação dos efeitos atribuídos às perturbações no solo (BOSSIO et al., 2005). Geralmente, testes usando organismos microbianos medem a funcionalidade da comunidade microbiana como os testes de transformação de nitrogênio (OCDE, 2000a) e carbono (OCDE, 200b). De certa forma, isso contrasta com os estudos em que os parâmetros avaliados incluem letalidade/sobrevivência ou sucesso reprodutivos de organismos individuais ou sobrevivência (OEHHA; 2009) além do que, nesses testes, o fato de não haver qualquer caracterização da microbiota edáfica, pode incorrer em variações consideráveis dos resultados obtidos mesmo em condições padronizadas de laboratório ou para um mesmo tipo de solo (BASILE, 2008).

É sabido que a grande maioria das espécies de microrganismos do solo ainda é desconhecida, no entanto, dentre as já descritas, muitas possuem suas funções ambientais bem conhecidas. Nesse âmbito, os FMAS surgem como opções interessantes, uma vez que, são componentes principais da biomassa do solo (VAN-GROENIGEN et al. 2010), relevantes para o ecossistema terrestre, apresentam especificidade funcional e podem ser utilizados para estudos ecotoxicológicos (BASILE, 2008).

A avaliação de FMAs possui um protocolo ISO específico (ISO/TS 10832:2009) que permite estimar a sensibilidade da germinação de esporos para *Funneliformis mosseae*, em substratos contaminados. O referido protocolo usa nitrato de cádmio como substância de referência e prevê procedimentos para outros tipos de poluentes. No cenário nacional, não se pratica a utilização de FMAS nas avaliações de risco ambiental de poluentes e não existe nenhuma

regulamentação que norteie a avaliação da sensibilidade desses organismos.

A utilização de metodologia padronizada para testes ecotoxicológicos seja para microrganismos como os FMAs ou para outros grupos de organismo contribui para padronizar os procedimentos dando maior segurança e confiabilidade aos resultados obtidos.

As principais organizações que atuam no sentido de normatização de metodologias são a OCDE (Organization for Economic Cooperation and Development), USEPA (United States Environmental Protection Agency) e a ISO (International Organization for Standardization). Nacionalmente, as normas utilizadas são aquelas publicadas pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

As normas ISO são desenvolvidas nos seus comitês técnicos (ISO/TC), organizadas em bases temáticas com representantes dos seus membros e aprovadas mediante votação entre os seus membros (ISO, 2014). A participação brasileira nos trabalhos de normalização da ISO é efetuada através da ABNT. A página da ISO contém informações sobre o programa de trabalho dos ISO/TC (são mais de 200), as normas ISO em vigor, a estrutura da organização, informações sobre o processo de normalização internacional e links para diversas organizações correlatas.

3 HIPÓTESES

1- O protocolo ISO/TS 10832:2009 desenvolvido para teste ecotoxicológico para previsão efeitos sobre FMAs pode ser aplicado utilizando espécies de FMAs oriundas de solos tropicais e subtropicais;

2 - Outros parâmetros da fase assimbiótica dos FMAs, além do percentual de germinação de esporos, podem ser incorporados ao protocolo ISO/TS 10832:2009;

3 - Para os isolados/espécies testados, fatores como temperatura, tempo de exposição ao poluente e substrato utilizado poderão afetar os parâmetros testados (germinação, crescimento do tubo germinativo e crescimento total de hifas) e conseqüentemente, será necessário propor alterações no protocolo ISO/TS 10832:2009;

4 - Os isolados testados apresentam sensibilidade à presença de Nitrato de Cádmio [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$] e Clorpirifós, dependendo da dose e dos fatores ambientais envolvidos.

4 OBJETIVO GERAL

Validar o protocolo ISO/TS 10832:2009 para testes de germinação de esporos com isolados de FMAs oriundos de solos tropicais e subtropicais, com base na sensibilidade a metais e agrotóxicos e determinar se outros parâmetros de crescimento assimbiótico (tamanho do tubo germinativo; comprimento total de hifas) podem ser utilizados como indicadores de sensibilidade dos isolados de FMAs.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Selecionar isolados de espécies FMAs de ampla ocorrência em solos tropicais e subtropicais brasileiros, com base na sensibilidade da germinação dos seus esporos, para uso em testes ecotoxicológicos como indicado no protocolo ISO/TS 10832:2009 (Experimento 1);

2 - Determinar quais as condições ideais de condução dos testes com base no protocolo ISO/TS 10832:2009 (temperatura, período de incubação, teor de umidade e substrato) (Experimento 2);

3 - Avaliar outros parâmetros da fase assimbiótica dos isolados testados (tamanho do tubo germinativo e comprimento total de hifas) quanto à sensibilidade e possibilidade de uso juntamente com a germinação para avaliar os efeitos de poluentes no solo (Experimento 3);

4 - Validar o Protocolo ISO/TS 10832:2009 com os isolados selecionados, considerando os parâmetros avaliados e as alterações realizadas, para Nitrato de Cádmio [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$] e Clorpirifós (Experimento 3);

5 - Propor a incorporação das alterações realizadas ao protocolo ISO/TS 10832:2009.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

Três experimentos foram realizados no laboratório de Ecologia do Solo da UDESC/CAV para adaptação e validação do protocolo ISO/TS 10832:2009 para testes de germinação de esporos com isolados de FMAs oriundos de solos tropicais.

Em todos os experimentos os isolados fúngicos utilizados eram provenientes da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota – CICG (<http://www.furb.br/cicg/>). Informações acerca da localidade de origem dos isolados, bem como ano de estabelecimento da cultura estão disponíveis na Tabela 4. Os isolados inicialmente foram estabelecidos com *Sorghum bicolor*, em cones de 300 mL em substrato composto por solo:areia:argila expandida (1:1:1). Posteriormente, após purificação, os inóculos foram multiplicado em vasos de 1,5 Kg, com *Brachiaria brizantha*, em substrato composto de solo:areia quartzosa (1:1).

Foram testadas culturas puras de:

- *Acaulospora colombiana* (Spain & Schenck) Kaonongbua, Morton & Bever, isolado SCT115A;
- *A. koskei* (Błaszkowski), isolados SCT049C e SCT048A);
- *A. morrowiae* (Spain & Schenck), isolados SCT400B, SCT056A e SCT063A;
- *Claroideoglosum etunicatum* (Becker & Gerd.) Walker & Schuessler, isolado SCT101A;
- *Gigaspora albida* (Schenck & Smith), isolado SCT200A;
- *Gi. margarita* (Becker & Hall), isolado SCT077A;
- *Rizhophagus clarus* (Nicolson & Schenck) Walker & Schuessler, isolado SCT720A ou RJ 102A.

Os isolados testados permaneceram armazenados à 4 °C até a sua utilização. Esta temperatura é considerada ideal para manter a infectividade do inóculo por períodos prolongados.

Tabela 4 - Localidade e ano de estabelecimento das culturas dos isolados testados.

Espécie/ Código do isolado*	Localidade	Ano
<i>Acaulospora colombiana</i> SCT115A	Mina do Apartado, Lauro Muller - SC.	2003
<i>Acaulospora koskei</i> SCT048A	Campo Nativo, em Otacilio Costa, SC. (projeto SISBIOTA**)	2011
<i>Acaulospora koskei</i> SCT049C	Mata de Eucalipto - Otacílio Costa, SC. (projeto SISBIOTA)	2011
<i>Acaulospora morrowiae</i> SCT056A	Campo Nativo - Santa Teresinha do Salto, SC. (projeto SISBIOTA)	2012
<i>Acaulospora morrowiae</i> SCT063A	Campo Nativo - São Miguel do Oeste, SC. (projeto SISBIOTA)	2012
<i>Acaulospora morrowiae</i> SCT400B	Campo Nativo - Campo Belo do Sul, SC. (projeto SISBIOTA- área CN1)	2005
<i>Claroideoglossum etunicatum</i> SCT101A	Pomar de macieira - Caçador, SC.	1998
<i>Gigaspora albida</i> SCT200A	Dunas marítimas - praia do Santinho, Florianópolis, SC.	2005
<i>Gigaspora margarita</i> SCT077A	Integração Lavoura Pecuária - Chapecó, SC. (projeto SISBIOTA)	2012
<i>Rizhophagus clarus</i> SCT720A	Pastagem - Navegantes, SC.	2007
<i>Rizhophagus clarus</i> RJN102A	Isolado obtido via CNPAB-UFLA - Flórida, USA.	***

*Isolados oriundos de Ambiente méxico, clima subtropical, exceto *Rizhophagus clarus* RJN102A, cuja informação não estava disponível;

** SISBIOTA - Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade: Biodiversidade de Organismos Edáficos e Atributos Físico-químicos como Indicadores da Qualidade do Solo em Sistemas de Manejo do Estado de Santa Catarina. Informações disponíveis em: <http://biotasc.com/site/>.

*** Ano de estabelecimento de cultura não disponível.

Fonte: Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota – CICG (<http://www.furb.br/cicg/>).

Para cada isolado/espécie testada nos experimentos, os esporos utilizados foram extraídos de culturas puras pelo método de peneiragem úmida (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) seguido por centrifugação em gradiente de sacarose (20% e 60%). Esporos com paredes intactas foram coletados (esporos vazios e esmagados foram eliminados) e depositados sobre papel filtro ligeiramente umidificado. Após, com o auxílio de pinça apropriada os esporos foram transferidos para membranas de nitrocelulose (diâmetro 47 milímetros, porosidade de 0,45 μm , brancas, quadriculadas, com grade de 3 mm), previamente umidificadas com água destilada.

Em seguida, os esporos foram distribuídos pelos esquadros da grade na membrana, totalizando 30 esporos por membrana. A membrana contendo os esporos foi coberta com outra membrana, previamente umedecida, formando o chamado “sanduíche de esporos” que foi transferido para placas de Petri de plástico estéreis, diâmetro 9 cm, entre duas camadas do substrato testado (Figura 1). Cada placa de Petri contendo o substrato teste e o sanduíche de esporos constituiu uma unidade experimental (UE).

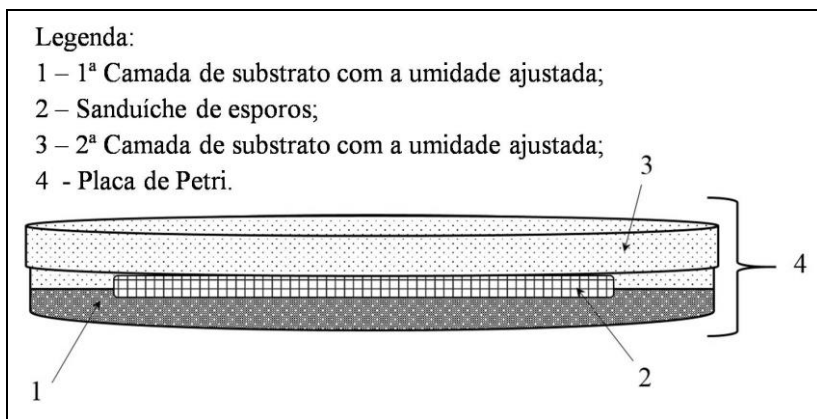
Os substratos utilizados nos ensaios foram previamente preparados e tiveram sua umidade ajustada. Cada uma das unidades experimentais recebeu uma primeira camada (cerca de 40 g) do substrato, o sanduíche de esporos foi colocado por cima desta camada e coberto com uma segunda camada (cerca de 40 g) do mesmo substrato.

As placas de Petri foram seladas com filme de plástico e incubadas em câmaras de germinação tipo B.O.D. com temperatura de controlada (especificada na sequência, para cada um dos experimentos) e ausência de luminosidade.

Após o período de avaliação adotado em cada experimento, as unidades experimentais foram desmontadas e os sanduíches contendo os esporos retirados das placas. O Protocolo ISO 10832:2009, prevê a colocação dos sanduíches de esporos em Trypan blue a 0,05% (0,5 g em 50 mL de HCl a

1%, 450 mL de H₂O, 500 mL de glicerol) por 15 minutos para coloração. Tal procedimento não foi adotado, pois o mesmo gerava perdas de esporos dos “sandwiches” e sua ausência não comprometia a visualização da germinação. Após abertos, os sanduíches de esporos foram avaliados em microscópio estereoscópico com aumento de até 80 vezes e fotografados utilizando Software de Imagem AxioVision 4.8© (ZEISS, 2009)

Figura 1 – Esquema da montagem das unidades experimentais nos experimentos de germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares.



Fonte: Produção da autora, 2016.

O número total de esporos recuperados e o número de esporos germinados foram contados para cada espécie, tempo de avaliação e réplicas. A percentagem de esporos germinados versus o número de esporos recuperados foi calculada ($[\frac{x \cdot 100}{n}]$, onde x é o número de esporos germinados e n o número de esporos recuperados).

Para ser contabilizado como esporo germinado, o comprimento das hifas após a germinação deveria ser, pelo menos, 5 vezes maior do que o diâmetro do esporo.

Os resultados foram considerados válidos quando: (1) o número médio de esporos recuperados foi igual ou maior a 25, no final do ensaio; (2) a porcentagem média de germinação de esporos para o controle foi igual ou maior do que 75%, no final do ensaio.

Para todas as unidades experimentais, em adição ao parâmetro germinação, foram avaliados também a formação do tubo germinativo e o crescimento de hifas. Estes dois últimos parâmetros constituem etapas importantes do processo de germinação e não são considerados no Protocolo ISO.

O tamanho do tubo germinativo e a avaliação do crescimento total de hifas foram mensurados em micrômetros. As medições foram realizadas através de microscópio estereoscópico e do Software de imagem AxioVision 4.8© (ZEISS, 2009).

6.1 EXPERIMENTO 1 - SELEÇÃO PRELIMINAR DE ESPÉCIES/ISOLADOS DE FMAS COM BASE NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS

Este experimento foi realizado com o objetivo de selecionar isolados de espécies de FMAs, de ampla ocorrência em solos tropicais e subtropicais brasileiros, com base na sensibilidade da germinação dos seus esporos, para uso em testes ecotoxicológicos. Para isso, foram testados os seguintes tratamentos:

1. Espécies/isolados de FMAs: *Acaulospora colombiana* (isolado SCT115A); *A. koskei* (SCT049C e SCT048A); *A. morrowiae* (SCT400B, SCT056A e SCT063A); *Claroideoglossum etunicatum* (SCT101A); *Gigaspora albida* (SCT200A); *Gi. margarita* (SCT077A); *Rizhophagus clarus* (SCT720A);
2. Tempos de incubação: adotou-se dois tempos de incubação das unidades experimentais (7 e 14 dias);

3. Temperatura de incubação: 24 °C (temperatura indicada no Protocolo ISO 10832).

4. Substrato utilizado: Areia não contaminada – >99 % de sílica, pH de 6,6 a 7,5, tamanho de partícula de 0,8 mm a 1,6 mm, lavadas três vezes com água destilada (pH >6) e depois seca ao ar; pH final >6 (ISO, 2005). Além do pH, foi determinada inicialmente a capacidade de retenção de água – CRA (ISO, 1998b) do substrato para posterior ajuste de umidade. Na montagem dos ensaios a areia teve sua umidade ajustada para 90% da CRA (ISO, 2009). Os dados de análise química desse substrato constam na Tabela 4.

A condução e avaliação foram realizadas como descrito anteriormente e delineamento completamente casualizado, com três repetições para cada tratamento.

Dos dez isolados testados, 5 foram selecionados para dar andamento ao projeto. Os isolados/espécies selecionados foram os que apresentaram os maiores percentuais de germinação e estão descritos no tópico abaixo.

6.2 EXPERIMENTO 2 - ADAPTAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO PROTOCOLO PARA AS ESPÉCIES/ISOLADOS SELECIONADOS

Este experimento foi realizado com o objetivo de selecionar isolados de espécies FMAs para uso em testes ecotoxicológicos testando tempos e temperaturas de incubação. Foram testados:

1. Espécies/isolados de FMAs: *A. koskei* SCT049C; *C. etunicatum* SCT101A; *Gi. albida* SCT200A; *Gi. margarita* SCT077A e *R. clarus* RJ 102A. Com problemas de contaminação na produção, o isolado SCT720A de *R. clarus*, utilizado no Experimento 1 foi substituído pelo isolado RJ 102A neste Experimento;

2. Tempos de incubação: adotou-se dois tempos de incubação das unidades experimentais (14 e 28 dias);
3. Temperatura de incubação: adotaram-se duas temperaturas de incubação das unidades experimentais (24 e 28 °C);
4. Substratos utilizados:
 - Areia não contaminada – >99 % de sílica, pH de 6,6 a 7,5, tamanho de partícula de 0,8 mm a 1,6 mm, lavadas três vezes com água destilada (pH >6) e depois seca ao ar; pH final >6 (ISO, 2009) e umidade ajustada para 90% da CRA;
 - Solo Artificial (OCDE, 1984a) não contaminado: 10% de turfa, 20% argila branca – caulim, 70% de areia fina e pH ajustado para 6,0 (\pm 0,5) por adição de carbonato de cálcio. Teor total de umidade ajustado para 60% da CRA. Os dados de análise química desse substrato e do SAT constam na Tabela 4;
 - Solo Artificial Tropical (SAT (GARCIA, 2004) - não contaminado: 10% de pó de fibra de coco triturada, 20% argila branca – caulim, 70% de areia fina e pH ajustado para 6,0 (\pm 0,5) também por adição de carbonato de cálcio. Teor total de umidade ajustado para 50% da CRA.

Tabela 5 - Características químicas dos substratos utilizados.

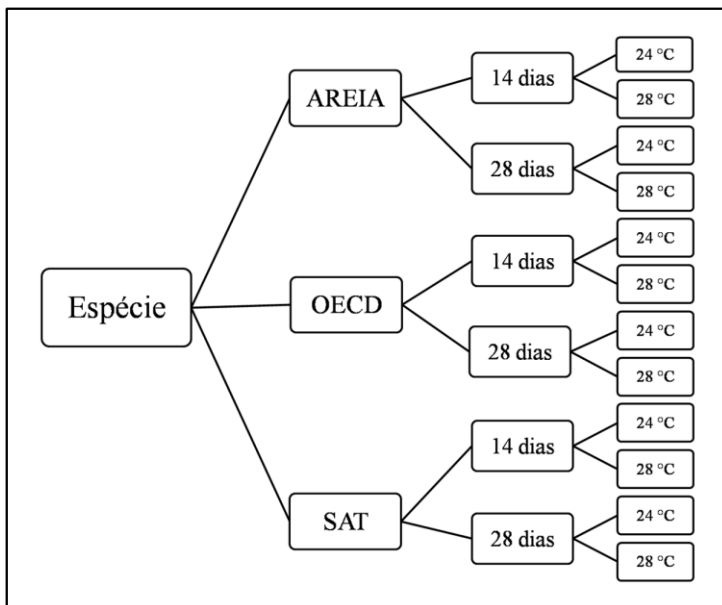
Parâmetros	AREIA	OCDE	SAT
pH (água)	5,9	5,7	6,08
pH SMP	7,4	6,6	6,81
CTC efetiva (cmol _c /dm ³)	2,19	7,15	5,58
Matéria Orgânica (mg/dm ³)	0,3	1,6	5,9
Carbono Orgânico Total (mg/dm ³)	0,17	0,93	-
Al (cmol _c /dm ³)	0,0	0,0	0,0
Ca (cmol _c /dm ³)	1,15	5,31	3,69
Mg (cmol _c /dm ³)	0,13	0,90	0,52
K (cmol _c /dm ³)	354	368	563
Na (cmol _c /dm ³)	1,0	1,0	0,0
P (mg/dm ³)	1,5	0,8	17,6
Cu (mg/dm ³)	0,6	0,5	0,8
Fe (mg/dm ³)	116,6	53,9	0,0
Zn (mg/dm ³)	0,3	0,9	2,12
Teor de Argila (%)	14	21	23

Fonte: Laboratório de Análise de Solos – LAS, UDESC/CAV, 2015.

A montagem das unidades experimentais procedeu conforme já descrito, exceto para a quantidade de SAT utilizada. Por se tratar de um substrato mais volumoso, foram utilizadas duas camadas de 30 g, totalizando 60 g de SAT por unidade experimental (Figura 2). O Experimento seguiu delineamento completamente casualizado, com três repetições. Procedimentos para desmontagem das unidades experimentais, parâmetros avaliados e os critérios de validação também seguiram a metodologia já descrita.

As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA Fatorial 3x2x2), seguido de Teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o Software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

Figura 2 – Condições de temperatura e períodos de avaliação adotados para cada espécie e substrato testados no experimento 2.



OCDE - Solo Artificial segundo OCDE, 1984; SAT - Solo Artificial Tropical (GARCIA, 2004).

Fonte: Produção da autora, 2016.

6.3 EXPERIMENTO 3 - TESTE DE SENSIBILIDADE DE *Gi. albida* E *Gi. margarita* À CD E CLORPIRIFÓS

Este experimento foi realizado objetivando validar o Protocolo ISO/TS 10832:2009 com os isolados selecionados e alterações realizadas para Nitrato de Cádmio [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$] e Clorpirifós além de avaliar outros parâmetros da fase assimbiótica dos isolados testados (tamanho do tubo germinativo e comprimento total de hifas) quanto à sensibilidade e possibilidade de uso juntamente com a germinação para avaliar os efeitos de poluentes no solo.

Foram testados:

1. Espécies/isolados de FMAs: *Gi. albida* SCT200A e *Gi. margarita* isolado SCT077A.
2. Tempos de incubação: 14 dias;
3. Temperatura de incubação: 28 °C;
4. Substratos utilizados: Areia e SAT

Os substratos foram contaminados em laboratório com Nitrato de Cádmio [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$] e Clorpirifós (agrotóxico do grupo dos organofosforados).

A utilização do Nitrato de Cádmio justifica-se por ser esta a substância de referencia utilizada pelo Protocolo ISO testado.

Já o inseticida Clorpirifós, incluso em 18 produtos comerciais, é utilizado em dosagens que podem variar de 100 a 150 ml ha⁻¹. É o segundo ingrediente ativo mais presente entre as marcas comerciais de inseticidas (IBAMA, 2010). É aplicado principalmente para o combate da lagarta-enroladeira (*Bonagota salubricola*) e tem aplicação foliar para as culturas de algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, pastagens, soja, sorgo, tomate e trigo. Pode ser utilizado na cultura da banana (saco para proteção do cacho), para aplicação no solo para as culturas de batata e milho e, ainda, para o controle de formigas na forma de isca granulada sem indicação

de cultura (MAPA, 2013). Além disso, existem registros da utilização do inseticida para o tratamento de sementes (BUENO et al., 2010; VANIN et al., 2011 & SILVA et al., 2013).

A aplicação do agrotóxico sobre as plantas, diretamente no solo ou via tratamento de sementes, podem causar efeitos além daqueles esperados para os organismos alvos, afetando indiretamente os demais componentes edáficos. A fração que atinge o solo sofre interações químicas com esses componentes, que determinarão a sua dissipação ou persistência no ambiente, assim como seu impacto no ecossistema (MOREIRA & SIQUEIRA, 2010).

Cada uma das espécies foi testada nos dois substratos, em oito doses crescentes (0; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 e 20 mg kg⁻¹) dos dois contaminantes. Cada tratamento constituiu de seis repetições. Procedimentos de montagem, desmontagem e avaliação foram conforme descrição já realizada anteriormente. Dados brutos foram transformados previamente para $\arcsen(x/100)^{1/2}$, em que x é a percentagem de germinação. A transformação dos dados percentuais é prevista no protocolo e foi realizada seguindo tal orientação.

Inicialmente os dados foram processados pelo programa Software PriProbit® 1.63 (SAKUMA, 1998), para estabelecer os valores de CI₅₀ (concentração de inibição de 50% da população).

O efeito da contaminação nos parâmetros foi avaliado por meio de análise de variância (ANOVA One-way) seguida pelo ensaio de Dunnett ($p < 0,05$), utilizando o Software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

Não havendo a possibilidade do cálculo do CI₅₀, foram estimados os valores de CENO (concentração máxima em que não se observa efeito adverso) e CEO (concentração mínima a partir da qual se observa danos à população) para cada um dos ensaios realizados.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 EXPERIMENTO 1

O protocolo ISO/TS 10832:2009 prevê como critério de validação, o percentual de 75% de germinação no substrato controle. Aos 7 dias de incubação nenhum dos isolados fúngicos testados atingiu o percentual de germinação requerido para validação do teste (Tabela 5). Os isolados *A. colombiana* SCT115A, *A. morrowiae* SCT056A, SCT063A e SCT400B, *A. koskei* SCT048A e *C. etunicatum* SCT101A tiveram germinação inferior a 10%. Os isolados *A. koskei* SCT049C e *R. clarus* SCT720A apresentaram germinação de 20%. Os isolados do gênero *Gigaspora* foram os que mais se aproximaram do percentual de validação, com destaque para *Gi. albida* com 67,4% de germinação.

Tabela 6 - Percentuais de germinação e desvio padrão (DP) dos isolados fúngicos testados no Experimento 1, após 7 e 14 dias de incubação.

Isolado	7 dias		14 dias	
	% germinação	DP	% germinação	DP
<i>A. colombiana</i> SCT115A	0	0	1	2,
<i>A. morrowiae</i> SCT056A	0	0	6	6
<i>A. morrowiae</i> SCT063A	3	3	2	4
<i>A. morrowiae</i> SCT400B	0	0	1	2
<i>A. koskei</i> SCT048A	0	0	7	3
<i>A. koskei</i> SCT049C	20	5	16	8
<i>C. etunicatum</i> SCT101A	6	6	0	0
<i>Gi. albida</i> SCT200A	67	46	33	11
<i>Gi. margarita</i> SCT077A	55	30	87*	8
<i>R. clarus</i> SCT720A	20	18	6	9

* média de germinação suficientes para validação do teste ISO

Fonte: Produção da autora, 2016.

Aos 14 dias, os isolados *A. colombiana* SCT115A, *A. morrowiae* SCT056A, SCT063A e SCT400B, *A. koskei* SCT048A e *C. etunicatum* SCT101A continuaram apresentando germinação <10% e *R. clarus* SCT720A decresceu de 20 para 6% de germinação. *A. koskei* e *Gi. albida* apresentaram germinação de 16 e 33%, respectivamente. Apenas *Gi. margarita* (87,3% de germinação) apresentou média de germinação superior ao necessário para a validação de um teste ecotoxicológico com FMA (ISO, 2009).

Baixas taxas de germinação de algumas espécies de FMAs podem ser influenciadas por vários fatores, entre eles o pH, a temperatura, a umidade e luminosidade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Considerando que o pH do substrato utilizado foi > 6 (ISO, 2009) (pH inicial da areia = 6,4; pH final entre 6,0 e 7,2), as baixas taxas de germinação dos isolados de *Acaulospora* podem ser explicadas, uma vez que esse gênero é mais comum em solos de pH mais ácido (CLARK, 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SOUZA et al., 2010).

Entretanto, a questão do pH não pode ser considerada como um fator isolado uma vez que valores de pH entre 6,0 e 7,0 são considerados ideais para a maioria das espécies (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

Outros fatores, além do pH, podem estar associados à reduzida germinação de *C. etunicatum* e *R. clarus*, uma vez que essas espécies são mais adaptadas a pHs mais elevados, (MAIA; SILVA; GOTO, 2010).

Estudos com germinação de esporos de FMAs, de ocorrência em solos brasileiros, foram conduzidos com temperaturas e tempo de incubação superiores aos adotados neste experimento (24 °C e 14 dias) (SIQUEIRA; HUBBELL; MAHMUD, 1984; MAIA; YANO-MELO, 2001; CARDOSO; NAVARRO; NOGUEIRA, 2002; SOARES et al., 2009; DRIAI et al., 2015). Alguns ainda testaram a variação da germinação com relação ao substrato utilizado (MAIA; YANO-MELO, 2001), indicando que as taxas de germinação

aqui encontradas podem ser resultado da interferência de fatores múltiplos.

Maia & Yano-Melo (2001), avaliaram a germinação de *Gi. albida*, em areia estéril e àgar-água 1% diferentes substratos, com avaliação da germinação em 7 e 28 dias à 28°C. Eles observaram efeito negativo da areia como substrato que ocasionou redução de 40% em relação a germinação em àgar ao utilizar areia esterilizada. A esse respeito, a areia nem sempre é um bom substrato e é um dos fatores importantes a serem considerados na realização de testes ecotoxicológicos com FMAS.

Outra variação em relação às condições de condução do experimento a ser questionada é a temperatura de incubação dos testes. Cardoso, Navarro & Nogueira (2002) avaliaram a germinação de esporos de *A. appendicula* Spain (Sieverding & Schenck), *A. morrowiae*, *D. heterogama* Nicol. & Gerd. (Walker & Sanders), *Gi. margarita*, *Glomus macrocarpum* (Tul & Tul. var. *macrocarpum*) e *C. etunicatum*, sob doses crescentes de Mn solúvel por um período de 30 dias à temperatura de 30°C. Nesse estudo os isolados do gênero *Acaulospora* tiveram germinação entre 40 e 65% no substrato controle, percentual esse, superior aos encontrados aqui, indicando que os isolados utilizados podem ser mais adaptados à temperaturas mais altas.

Soares et al. (2009), por sua vez, avaliaram o efeito, de bactérias promotoras de crescimento sobre a germinação de esporos de *C. etunicatum*, *Gi. albida* e *D. heterogama* e posteriormente o efeito da co-inoculação destes microrganismos na fase de aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro. Os testes foram incubados à 28 °C (± 2 °C) e os autores incluíram mais uma variável: o período/tempo de incubação dos ensaios. As avaliações da germinação foram realizadas aos 21 e 28 dias de incubação e os isolados obtiveram as maiores taxas de germinação quando avaliadas aos 28 dias, inclusive no tratamento controle. Esse

tempo de incubação é superior aquele adotado para o experimento e pode ser um dos fatores da baixa germinação da maioria dos isolados testados.

Esses trabalhos apontaram que, dentre os possíveis fatores que possivelmente tenham afetado a germinação dos esporos no Experimento 1, a temperatura e o tempo de incubação dos testes, deveriam ser considerados de forma individual e/ou conjunta em testes posteriores. Para algumas espécies, como foi o caso de *Gi. albida* (MAIA; YANO-MELO, 2001) os substratos utilizados também foram fatores de interferência e deveriam ser testados em ensaios posteriores.

Outro fator a ser considerado em casos de baixa germinação de esporos de FMAs é o período de dormência, característica comum de algumas espécies. Nesse período, a ausência de germinação pode ocorrer mesmo em condições ideais para tal (MAIA; SILVA; GOTO, 2010). O período de duração dessa fase é variável entre as espécies de FMAs e já foi descrito para representantes de *Acaulospora* (TOMMERUP, 1987), *Gigasporaceae* (SOUZA et al., 2005) e *Glomus* (TOMMERUP, 1983).

A partir dos dados de germinação e considerações apresentadas, foram delimitados os substratos, os tempos de avaliação, as temperaturas e quais seriam os isolados fúngicos testados no experimento subsequente (Experimento 2).

Com base nos percentuais de germinação foram selecionados os isolados: *A. koskei* SCT049C, *C. etunicatum* SCT 101A, *Gi. albida* SCT200A, *Gi. margarita* SCT077A e *R. clarus* SCT720A (substituído posteriormente pelo isolado RJ102A).

Como substrato optou-se pela continuação do uso da utilização da areia, mas incluiu-se o uso do solo artificial OCDE (indicado no protocolo ISO) e do SAT, que tem sido utilizado em substituição ao solo OCDE em testes ecotoxicológicos para outros organismos no Brasil. Manteve-se a temperatura e o tempo de incubação propostos pelo

protocolo (24 °C, durante 14 dias) e inclui-se temperatura de 28 °C e 28 dias de incubação como variáveis adicionais a serem testadas.

7.2 EXPERIMENTO 2

Na tabela 7 são apresentados os resultados de germinação de esporos para as espécies/isolados testados.

Somente as espécies/isolados *A. koskei* SCT049C, *Gi. albida* SCT200A, *Gi. margarita* SCT077A e *R. clarus* RJ102A apresentaram valores de germinação dentro do parâmetro de validação de testes da ISO ($\geq 75\%$).

O isolado de *C. etunicatum* não atingiu percentuais de germinação suficientes para validação de teste em nenhum dos substratos ou tempos de avaliação testados embora para o substrato OCDE, aos 28 dias de avaliação na temperatura de 28 °C tenha chegado muito próximo (73,1 %).

Em trabalho que avaliou o efeito de Mn na germinação de esporos de *C. etunicatum* além de outras espécies de FMAs encontraram germinação de cerca de apenas 20 % mesmo no tratamento sem adição de Mn. Cardoso, Navarro & Nogueira (2002), ao avaliarem o efeito de Al sobre a germinação e o crescimento de hifas de espécies de FMAs, obtiveram valores de germinação para *C. etunicatum* de 33,5% no tratamento controle com 0% de saturação por Al. Bressan (2001) testou a influência de doses de consorciadas de N e P na germinação e colonização radicular de *Anthylis vulneraria* sub sp. Sampaiana (Fabaceae) encontrou percentuais de germinação similares aos apresentados para essa espécie (35%) em tratamento controle (água-agar). Percentuais relativamente baixos de germinação pode ser uma característica da espécie, uma vez que apresentou um comportamento similar nos experimentos realizados nesse estudo e, em alguns tratamentos, superior aquilo que a literatura apresenta.

Tabela 7 - Percentagem de germinação (% Germ) de isolados de Fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) nos substratos areia, OCDE e SAT, aos 14 e 28 dias de incubação, nas temperaturas de 24 e 28 °C.

Isolado	Substrato	14 dias						28 dias					
		24 °C		28 °C		24 °C		28 °C		24 °C		28 °C	
		% Germ	DP CV	% Germ	DP CV	% Germ	DP CV	% Germ	DP CV	% Germ	DP CV	% Germ	DP CV
<i>A. koskei</i> SCT049C	AREIA	6	2 38	96*	5 5	29	13 44	90*	9 10				
	OCDE	44	3 6	32	17 54	66	8 13	67	12 18				
	SAT	8	4 48	3	2 87	15	11 73	29	11 38				
<i>C. etunicatum</i> SCT101A	AREIA	17	16 95	6	2 38	9	3 30	11	4 31				
	OCDE	21	1 7	46	3 8	51	10 20	73	3 5				
	SAT	20	3 14	8	8 97	21	4 22	17	6 34				
<i>Gi. albida</i> SCT200A	AREIA	33	18 56	99*	2 2	62	6 10	97*	4 5				
	OCDE	70	9 13	94*	2 2	70	11 15	98*	2 2				
	SAT	56	5 10	96*	6 7	71	8 11	97*	5 5				
<i>Gi. margarita</i> SCT077A	AREIA	36	5 3	40	29 73	21	4 17	25	6 25				
	OCDE	75*	2 2	70	13 19	80*	13 16	90*	8 9				
	SAT	40	5 11	72	15 21	28	8 27	77*	10 13				
<i>R. clarus</i>	AREIA	42	8 19	99*	2 2	76*	8 11	***	***				
	OCDE	42	14 33	93*	7 7	79*	3 4	***	***				
	SAT	21	7 32	91*	4 5	34	6 18	***	***				

Os valores representam as médias de três repetições; * médias de germinação suficientes para validação do teste ISO;

** germinação não determinada.

Fonte: Produção da autora, 2016.

Estas espécies/isolados cujos testes foram validos tiveram seus dados submetidos a analise de variância (Tabela 8). No presente estudo, observou-se uma variação, para cada isolado, nos fatores (temperatura, tipo de substrato ou tempo de incubação) envolvidos na germinação.

Tabela 8 - Valores de germinação (%) por espécie de FMA e tratamentos que obtiveram validação de teste, segundo Protocolo ISO 10832:2009.

Substrato	14 dias		28 dias	
	24 °C	28°C	24 °C	28°C
<i>A. koskei</i> SCT049C				
AREIA	6 s/v	96 A	29 s/v	90 A
OCDE	44 s/v	32 s/v	66 s/v	67 s/v
SAT	8 s/v	3 s/v	15 s/v	29 s/v
<i>Gi. albida</i> SCT200A				
AREIA	33 s/v	99 Aa	62 s/v	97 Aa
OCDE	70 s/v	94 Aa	70 s/v	98 Aa
SAT	56 s/v	96 Aa	71 s/v	97 Aa
<i>Gi. margarita</i> SCT077A				
AREIA	36 s/v	40 s/v	21 s/v	25 s/v
OCDE	75 A	70 s/v	80 A	90 Aa
SAT	40 s/v	72 s/v	28 s/v	77a
<i>R. clarus</i> RJ102A				
AREIA	42 s/v	99 Aa	76 Ba	**
OCDE	42 s/v	93 Aa	79 Ba	**
SAT	21 s/v	91a	34 s/v	**

s/v – tratamento sem validação de acordo com o protocolo ISO/TS 10832:2009; *Médias seguidas por letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada espécie, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Fonte: Produção da autora, 2016.

A. koskei SCT049C teve ensaios validados tanto para 14 quanto 28 dias de incubação, mas apenas para a temperatura de em 28 °C e no substrato areia. As médias dos tratamentos

validados não diferiram entre si, quanto ao período de incubação, indicando que para este isolado, efeitos na germinação foram estimulados pela temperatura de incubação (28 °C foi mais eficiente) e pelo substrato.

Para o isolado *Gi. albida* SCT200A houve validação em de tratamentos aos 14 e 28 dias de incubação, nos três substratos avaliados, mas apenas para a temperatura de 28 °C. Para esse isolado, a temperatura de 24 °C não obteve validação para nenhum tratamento. As médias dos tratamentos validados não diferiram estatisticamente nem entre os substratos, nem entre os períodos de avaliação (14 e 28 dias), indicando novamente para o efeito apenas da temperatura de incubação na germinação dos esporos. Assim como ocorreu para *A. koskei*, esses resultados, se analisados individualmente justificam a realização de ensaios por períodos mais curtos de incubação (14 dias) a temperatura de 28 °C.

Aos 14 dias de avaliação os resultados de germinação para *Gi. margarita* SCT077A foram validados para substrato OCDE quando incubados a 24°C e também para os tratamentos com 28 dias de incubação nas duas temperaturas avaliadas (24°C e 28 °C). As médias desses tratamentos não tiveram diferença significativa quando comparadas entre si. Em SAT, para o mesmo isolado, houve validação para o tratamento de 28 dias de incubação a 28°C. A comparação das médias dos tratamentos validados em OCDE e SAT, não tiveram diferenças significativas. Para esse isolado, não houve efeito do tempo nem da temperatura de incubação. Substratos OCDE e SAT tiveram o mesmo comportamento, sendo, contudo, mais eficientes que a areia, que não teve nenhum tratamento validado.

O isolado *R. clarus* RJ102A obteve resultados para atingir validação aos 14 dias de incubação a 28°C para os três substratos e também para os 28 dias de incubação à 24 °C para os substratos areia e OCDE, sendo que para os últimos dois tratamentos não houve diferença estatística significativa. No

entanto, quando comparados os períodos de incubação, observou-se que a germinação foi maior aos 14 dias de incubação à 28 °C do que aos 28 dias à 24°C, corroborando com os resultados de *A. koskei* e *Gi. albida* quanto a melhor temperatura de incubação (28 °C) e justificando também a adoção do período mais curto de incubação. As unidades experimentais para os tratamentos aos 28 dias de incubação à 28 °C ficaram comprometidas e os dados de germinação para esses tratamentos nos três substratos não puderam ser avaliados.

Conforme já discutido no item 7.1, estudos envolvendo germinação de FMAs foram realizados com tempos de incubação superiores aos 14 dias indicados no Protocolo ISO (CARDOSO, NAVARRO; NOGUEIRA, 2002; SOARES et al., 2009) e por isso, essa variação foi incluída para avaliação.

No entanto, se analisado para o conjunto das espécies, observamos que o fator ‘tempos de incubação’ não causou efeito nos percentuais de germinação para três das espécies testadas (*A. koskei*, *Gi. albida* e *Gi. margarita*) e que tiveram tratamentos validados. Essa diferença só foi observada para *R. clarus* e indicou que os percentuais de germinação para 14 dias de incubação foram superiores aqueles obtidos em 28 dias. Assim sendo, a partir dos resultados obtidos, não se justifica a adoção de um tempo de avaliação superior aquele proposto pelo protocolo ISO 10832:2009.

Quando comparamos as temperaturas de incubação observamos que essa variável causou efeito sobre a germinação de *A. koskei*, *Gi. albida* e *R. clarus* e não teve efeito sobre a germinação de *Gi. margarita* (Tabela 8).

Testes que avaliaram a germinação de FMAs com temperatura de incubação a 28 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$) foram realizados com sucesso por diversos pesquisadores (SIQUEIRA; HUBBELL; MAHMUD, 1984; MAIA; YANO-MELO, 2001; CARDOSO; NAVARRO; NOGUEIRA, 2002; SOARES et al., 2009; DRIAI et al., 2015). A temperatura de 28 °C também é

utilizada para a avaliação de outros parâmetros microbianos como a determinação da respiração basal do solo (C-CO₂) (JENKINSON; POWLSON, 1976).

As diferenças na germinação de esporos entre as espécies e gêneros estão frequentemente relacionadas com o ambiente de onde os fungos foram isolados (CLARK, 1997; SOUZA et al., 2010). Cada isolado proveniente de um ambiente específico representa um “ecotipo” adaptado a características peculiares do solo (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010). Logo, se consideramos as condições de temperatura dos locais de onde provieram os isolados testados podemos explicar a maior germinação à 28°C do que à 24°C.

Os isolados aqui testados foram isolados de regiões com clima subtropical (clima predominantemente do tipo Cfa, com verões quentes e com temperaturas médias anuais nunca superiores a 20°C e temperatura mínima do mês mais frio nunca menor que 0 °C) e tropical (predominantemente do tipo Aw, com estação seca de inverno e temperatura média todos os meses do ano >18 °C) (ALVARES et al., 2013). Essas temperaturas médias são superiores aquelas encontradas no continente Europeu que apresenta clima predominantemente temperado (temperaturas médias anuais acima de 10 °C nos meses quentes e entre -3° e 18 °C, nos meses frios) e de onde o isolado/espécie referência do protocolo foi isolado (NERY, 2011).

A temperatura do solo está muito relacionada à radiação que chega a uma determinada superfície, dependendo da latitude, da época do ano, da hora do dia e da exposição (PINHEIRO et al., 2002). Consequentemente, solos de regiões com temperatura médias anuais maiores, como é o caso das regiões de tropicais e subtropicais, terão temperaturas mais altas em relação aqueles solos de regiões clima temperado (PEREIRA; ANGELOCCI; SENTELHAS, 2002; PINHEIRO et al., 2002).

Desse modo, a adoção de temperaturas mais altas para a realização de testes ecotoxicológicos com isolados de FMAs de origem em solos tropicais e subtropicais do que aquela proposta pelo Protocolo ISO é justificada, uma vez que representam condição mais próxima dos locais de origem dos isolados.

No que tange aos substratos avaliados, a areia não apresentou regularidade na germinação dos isolados fúngicos. Isso fica evidente se compararmos, por exemplo, a ótima germinação de *Gi. margarita* no Experimento 1 (87,3%) e a taxa de germinação baixa (40,4 %) submetidas as mesmas condições de incubação (14 dias, à 24°C). Situação que se repetiu com *A. koskei*, que não teve percentual suficiente para validação no Experimento 1 e nesse, nas mesmas condições teve percentual >90%. Cardoso, Navarro & Nogueira (2002) também utilizaram areia como substrato para germinação. Os autores, no entanto, submeteram a areia a tratamento com HCl a 5 % por 24 h e posterior autoclavagem enquanto que nesse estudo ela foi apenas peneirada em tamanho de partícula adequada, lavada e seca ao ar, conforme a proposta do protocolo ISO. Este, aliás, adverte que a areia pode constituir um substrato nem sempre eficiente e que a sua eficiência deve ser previamente testada.

Por se tratar de um substrato inerte e com teores de nutrientes extremamente baixos, a areia evidencia a capacidade de germinação dos esporos a partir da sua reserva energética (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010). Nesse caso, a baixa germinação de alguns dos isolados testados pode refletir a falta de adaptação destas espécie/isolados ao substrato.

Em relação aos outros dois substratos avaliados, os resultados mostraram que das cinco espécies testadas, três delas conseguiram validação para pelo menos um tratamento em solo OCDE e SAT. Quando tratados estatisticamente, as médias dos resultados para OCDE e SAT não diferiram estatisticamente, indicando a eficiência de ambos e a

possibilidade de uso do SAT em substituição ao solo OCDE também para ensaios com FMAs (Tabela 8).

O solo artificial OCDE (OCDE, 1984a), é utilizado como padrão para validação de teste ecotoxicológicos na Europa. A elaboração desse solo artificial utiliza a turfa como fonte de matéria orgânica. Esse material, contudo, não é tão comum de fácil aquisição no Brasil. O Solo Artificial Tropical - SAT foi elaborado por pesquisadores brasileiros (GARCIA, 2004) e mantém as mesmas proporções de constituintes, mas substitui a fonte de matéria orgânica do solo artificial europeu por fibra de coco triturada. O SAT é amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos no país, contudo não existem registros da sua utilização em testes envolvendo FMAs.

Pensando na eficiência dos dois substratos nesse tipo de teste, a opção pelo uso de um ou outro deve considerar outras questões: (1) padronização de substratos utilizados como padrão em testes ecotoxicológicos no Brasil e (2) facilidade de aquisição de matéria orgânica que pode consistir um fator limitante para a elaboração do solo artificial. Nesse sentido, optar pelo uso do SAT torna a execução dos testes ecotoxicológicos com FMAs mais viáveis.

Analisando o conjunto dos fatores avaliados e as considerações feitas definiu-se que os ensaios posteriores (Experimento 3) utilizariam o SAT como substrato padrão e que, embora a areia não tenha se mostrado um substrato confiável na germinação, ela continuaria sendo testada uma vez que sua composição química é distinta daquela encontrada em SAT e OCDE.

Como um tempo de avaliação superior ao proposto pelo protocolo não se justificou, manteve-se para o Experimento 3 a avaliação após 14 dias de incubação e com base nos melhores resultados, a temperatura de incubação para os testes de sensibilidade será de 28 °C.

As espécies *Gi. albida* e *R. clarus* foram selecionadas com base na maior quantidade de tratamentos validados e *Gi.*

margarita pela soma do desempenho neste (Experimento 2) e no experimento anterior (Experimento 1). No entanto, não houve disponibilidade de esporos do isolado *R. clarus* no momento de realização do Experimento 3, o que impediu que a sensibilidade do isolado fosse avaliada.

7.3 EXPERIMENTO 3

7.3.1 Cádmiio

Areia

O teste em areia contaminada com Cd para *Gi. margarita* não foi validado (<75% germinação no controle).

Quando testada para *Gi. albida*, o teste atingiu percentual de germinação suficiente para validação mas, não foi possível o cálculo do CI₅₀ (dose que causa 50% de inibição da germinação) sendo esse valor, maior do que a concentração mais alta testada (CI₅₀ > 20 mg kg⁻¹ de Cd) (Figura 3).

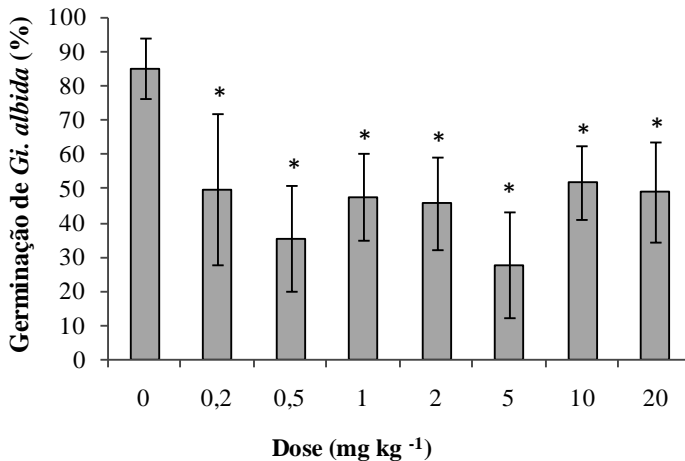
As médias das concentrações testadas, foram significativamente diferentes do controle por Dunnett (p <0,05) e isso permitiu estimar as doses CENO (<0,2 mg kg⁻¹) e CEO (0,2 mg kg⁻¹) (Tabela 9).

Para esse teste contaminante, nesse substrato, o tamanho do tubo germinativo (TG) foi significativamente menor do que o controle nas doses 1, 2, e 5 mg kg⁻¹ de Cd (CENO = 1 mg kg⁻¹ e CEO = 1 mg kg⁻¹) (Tabela 9). O comprimento total de hifas (HF) não diferiu do controle em nenhuma das doses testadas (CENO = 20 mg kg⁻¹; CEO = >20 mg kg⁻¹) (Tabela 9).

As questões envolvendo a variabilidade dos dados envolvendo a germinação em areia já foram discutidas e os resultados desse experimento corroboram com a ideia de que se

deve ter cautela na utilização como substrato único para o controle e a sua eficiência deve ser previamente checada.

Figura 3 - Porcentagem de germinação de esporos de *Gi. albida* em areia contaminada com doses crescentes de Cd.



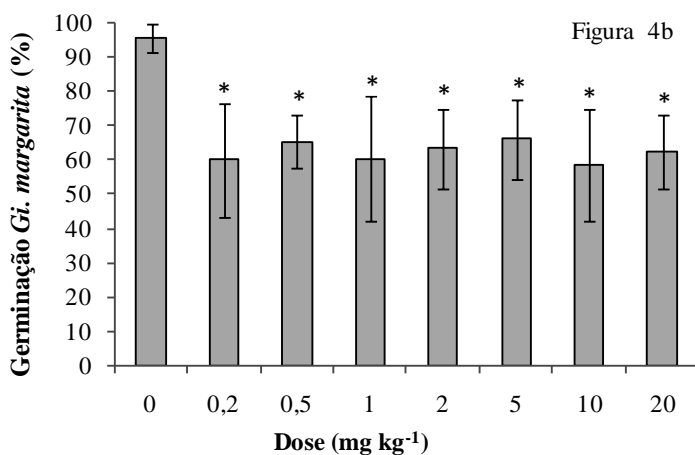
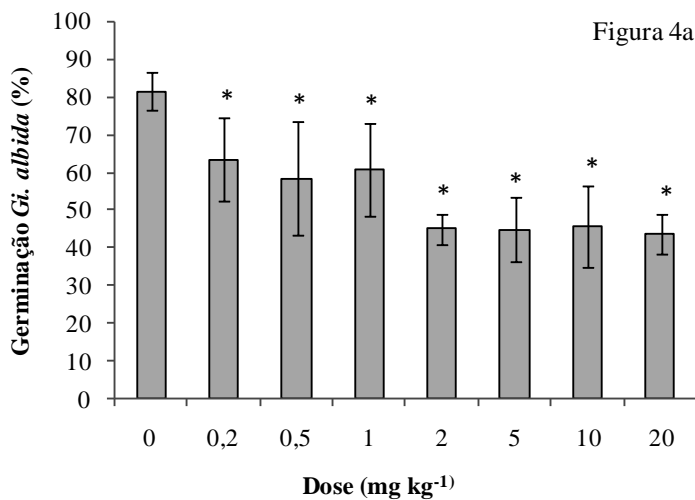
Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett.

Fonte: Produção da autora, 2016.

Solo Artificial Tropical - SAT

Para o substrato SAT, contaminado com Cd, tanto para *Gi. albida* quanto para *Gi. margarita* não foi possível calcular a CI_{50} ($CI_{50} > 20 \text{ mg kg}^{-1}$). Houve, no entanto, diferença estatística significativa (Dunnett a 95%) da germinação entre os controles e as doses testadas para ambas as espécies (Figuras 4a e 4b). Houve sensibilidade, ou seja, uma redução na germinação, mas não em 50% da população. A dose CENO ($< 0,2 \text{ mg kg}^{-1}$) e CEO ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$) estimada foi a mesma para as duas espécies (Tabela 9).

Figura 4 - Porcentagem de germinação de *Gi. albida* (4a) e *Gi. margarita* (4b) em SAT contaminado com doses crescentes de Cd.



Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Fonte: Produção da autora, 2016.

Os resultados apontam que para encontrar a dose que causa o efeito na inibição da germinação em 50% da população para esse contaminante e para essas duas espécies, é necessário a utilização de doses maiores do que as testadas nesse experimento.

Os outros dois parâmetros avaliados (TG e HF) não diferiram estatisticamente do controle para nenhuma espécie, não sendo afetados pela adição de Cd mesmo na dose mais alta testada (20 mg kg^{-1}), apontando para a ausência de sensibilidade desses parâmetros, para esses isolados ao Cd. As doses CENO e CEO foram iguais para os dois parâmetros e para ambas as espécies (CENO = 20 mg kg^{-1} ; CEO = $>20 \text{ mg kg}^{-1}$) (Tabela 9).

O cádmio (Cd) é um elemento presente naturalmente solo em quantidades traço. Não possui função biológica conhecida e é considerado um dos metais mais perigosos no ambiente, pois, mesmo em concentrações relativamente baixas, pode afetar seres humanos e outros seres vivos (AN, 2004).

Efeitos diretos do Cd e de outros metais sobre os FMAs vêm sendo estudados e demonstram que, sua presença no solo, em concentrações altas tendem a afetar negativamente os fungos, reduzindo a germinação e crescimento micelial (VIVAS, BAREA; AZCON, 2005; AMIR; JASPER; ABBOTT, 2008), o grau de colonização (WATTS WILLIAMS; PATTI; CAVAGNAR, 2012; YANG et al., 2015; WU et al., 2016), além de reduzir a esporulação desse grupo de fungos (AMIR et al., 2013; YANG et al., 2015).

Notadamente, os esforços científicos em estudos sobre FMAs concentraram-se em sua capacidade de fornecer a planta hospedeira nutrientes em solos com déficit de nutrientes ou sobre o crescimento das plantas em locais contaminados (NANDA, ABRAHAM, 2013).

Em 2008 Soares & Siqueira avaliaram os efeitos da inoculação de FMAs incluindo *Gi. albida* e de doses crescentes de P (25, 100 e $400 \mu\text{g P g}^{-1}$ solo) na tolerância de *Brachiaria*

decumbens a metais pesados (Cd, Cu e Pb). Um dos resultados foi inibição de 50 % da biomassa da parte aérea. Concentrações de metais do solo que inibem a biomassa por 1,8 a 2,0 vezes mais elevada em plantas inoculadas em comparação as não inoculadas, confirmando os benefícios para plantas micorrizadas em crescerem em solo contaminado por esses metais.

Janoušková & Vosátka (2005) avaliaram os efeitos de Cd sobre o crescimento de raízes de plantas micorrizadas (de *Daucus carota*) e no micélio extraradicular de *Gi. margarita* em doses crescentes de Cd (0, 2 e 4 mg L⁻¹) e não encontraram diferenças significativas para as doses testadas em nenhuma das variáveis em relação ao controle.

Outros relatos envolvendo o hospedeiro destacam efeitos como o maior crescimento e biomassa vegetal em solos contaminados com Cd, Zn, Pb e As (REDON; BÉGUIRISTAIN; LEYVAL, 2009; LENG et al, 2010; NEAGOE et al., 2014; OGAR; SOBCZYK; TURNAU, 2015) e apontam ainda, a ação de retenção de metais (Cu, Cd, Zn e Pb) em micélio de fungos micorrízicos arbusculares (CABRAL et al, 2010) e efeitos dos FMAs na redução da fitotoxicidade de Cd (JIANG et al., 2016). De modo geral, esses autores enfatizam a capacidade dos FMAs em serem tolerantes aos metais e sua capacidade em afetar positivamente o hospedeiro na presença de certas doses desses contaminantes.

A existência de mecanismos de tolerância pode explicar a baixa sensibilidade da germinação dos isolados de *Gi. albida* e *Gi. margarita* para o Cd encontrado nos testes realizados, assim como para os parâmetros TG e HF, que foram ainda menos sensíveis do que a germinação. Os mecanismos de tolerância atuam em ambas as fases do ciclo de vida dos FMAs e incluem: a retenção de poluentes nos esporos e micélio assimbiótico, a produção de agentes quelantes, retenção nas vesículas e arbúsculos, além da compartimentalização dos poluentes em vacúolos nas raízes micorrizadas, retenção nas

paredes celulares e a produção de glomalina pelo micélio extrarradicular (CABRAL et al. 2015).

Os resultados indicam para um potencial de adaptação desses fungos às concentrações Cd nos substratos testados, entretanto, nenhuma generalização é possível, uma vez que diferentes isolados dentro de uma espécie podem mostrar respostas distintas ao mesmo contaminante (WEISSENHORN; LEYVAL; BERTHELIN, 1993; GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010).

Embora já se tenha o conhecimento sobre alguns dos mecanismos de tolerância dos FMAS, a compreensão de como os fungos e plantas interagem em simbiose para neutralizar a toxicidade do metal ainda dependem de estudos com isolados oriundos de locais contaminados e não contaminados e que naturalmente apresentem diferenças em sua sensibilidade para os metais (MEHARG, 2003).

7 3.2 Clorpirifós

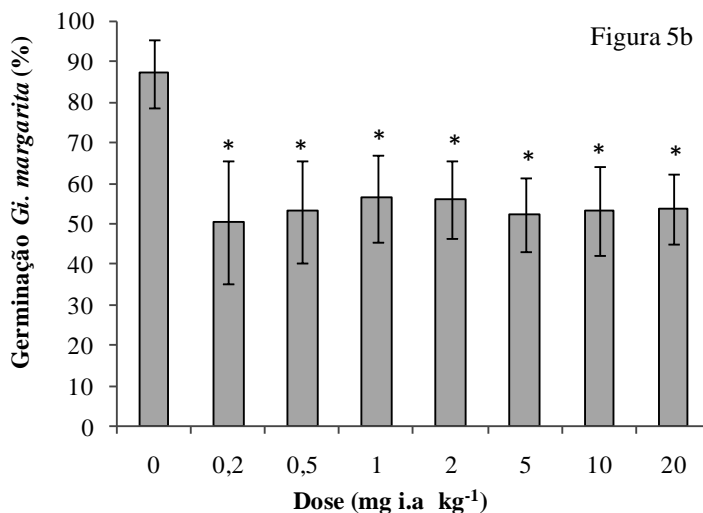
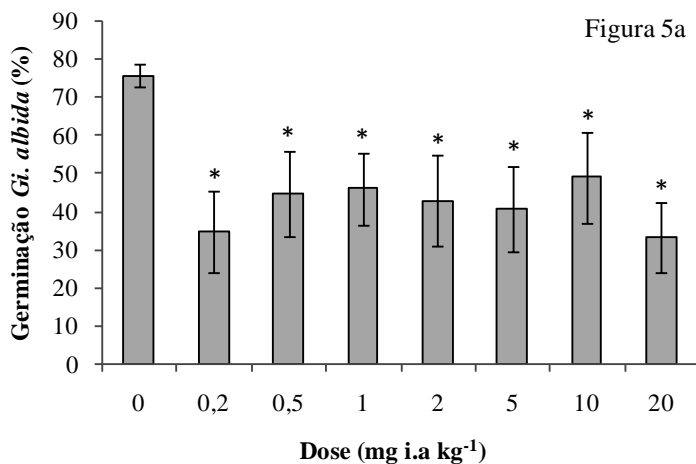
Areia

Os testes com contaminação por Clorpirifós em areia, não obtiveram percentual de germinação suficiente no controle para validação do teste. Novamente a areia se mostrou um substrato variável e não confiável para a realização desse tipo de teste.

SAT

Assim como ocorreu com a contaminação com Cd, os resultados da contaminação de SAT com Clorpirifós também não permitiram calcular a CI_{50} para nenhuma das espécies testadas ($CI_{50} > 20$ mg i.a. kg^{-1}). Entretanto, houve diferença estatística significativa (Dunnett a 95%) da germinação entre

Figura 5 - Porcentagem de germinação de *Gi. albida* (5a) e *Gi. margarita* (5b) em SAT contaminado com doses crescentes de Clorpirifós.



Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($p < 0,05$).

Fonte: Produção da autora, 2016.

os controles e as doses testadas tanto para *Gi. albida* (Figura 5a) quanto para *Gi. margarita* (Figura 5b). As doses CENO e CEO observadas foram idênticas para as duas espécies (CENO = $<0,2 \text{ mg i.a. kg}^{-1}$; CEO = $0,2 \text{ mg i.a kg}^{-1}$) (Tabela 9).

O efeito de agrotóxicos do grupo dos organofosforados, ao qual pertence o Clorpirifós, sobre os FMAs é limitado e assim como ocorre para os metais, consideram a eficiência do fungo submetido ao contaminante sobre algum parâmetro do hospedeiro (WANG et al., 2011).

Contudo, os microrganismos são considerados importantes agentes de degradação de agrotóxicos no solo e em função da sua presença ubíqua atuam como um indicador ambientalmente muito relevante de poluição (VAN BEELEN; DOELMAN, 1997; GIOVANNETTI et al, 2006). O fato dos FMAs poderem ou não acelerar o processo de degradação de pesticidas organofosforados em solo, entretanto, ainda não é um tema esclarecido pela comunidade científica (WANG et al., 2011).

O Clorpirifós age por contato e ingestão e assim como os demais inseticidas do grupo organofosforado tem efeitos na acetilcolinesterase, interferindo na transmissão dos impulsos nervosos, levando os insetos à paralisia e morte. Como os fungos não possuem sistema nervoso pode-se inferir que doses que causem efeito nesse grupo de organismos sejam bem superiores àquelas que causam efeito nos demais organismos do solo. Essas doses são, ao menos, superiores as testadas nesse experimento.

Se, para os isolados testados, o agrotóxico não causou inibição em 50% da germinação, quando presentes em algumas quantidades e condições edáficas os agrotóxicos podem causar efeitos deletérios e até mesmo a eliminação de outros organismos com os quais os FMAs estabelecem algum tipo de interação e isso pode acarretar efeitos em longo prazo (OEHHA, 2009). Frequentemente, um composto tóxico que pode causar efeitos agudos modestos, causa altos efeitos

crônicos que podem ser tão nocivos como um composto com uma toxicidade aguda elevada GIOVANNETTI et al., 2006.

O efeito do Clorpirifós já foi descrito para outros organismos do solo, tais como minhocas (SANTOS et al., 2012; MORCILLO et al., 2013; CARNIEL, 2015), colêmbolos e enquitreídeos (SANTOS et al., 2012; CARNIEL, 2015). Esses estão entre os organismos da fauna estabelecem relações diretas e indiretas com os FMAs no solo (TORDOFF; BODDY; JONES, 2008; KORADE; FULEKAR, 2009; OEHHA, 2009) e por isso, além de conhecer os efeitos dos agrotóxicos sobre os fungos é importante, em um estágio mais avançado das avaliações de risco de poluentes, ampliar o conhecimento dos efeitos ao nível das relações entre os organismos edáficos (CHELINHO et al., 2013).

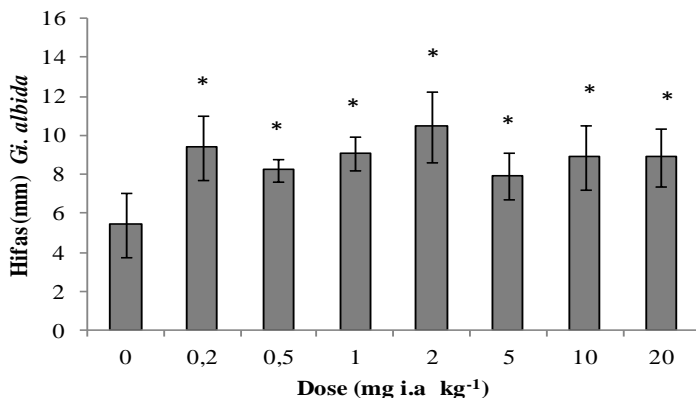
Em relação aos demais parâmetros avaliados, para o isolado *Gi. albida*, TG não apresentou diferença estatística significativa para nenhuma dose em relação ao controle (Dunnett 95%) (CENO = 20 mg i.a. kg⁻¹; CEO = >20 mg i.a. kg⁻¹).

Já o comprimento de HF, desse mesmo isolado, apresentou para todas as doses testadas diferença estatística significativa, entretanto, essa diferença indicou que na presença do contaminante o comprimento de HF foi maior do que o controle (Figura 6). Para esse parâmetro, doses de até 20 mg i.a. kg⁻¹ parecem estimular o crescimento do micélio assimbiótico. As doses CENO (20 mg i.a. kg⁻¹) e CEO (>20 mg i.a. kg⁻¹) foram estimadas, uma vez que segundo o conceito adotado referem-se a efeitos deletérios.

Em geral, aplicação de inseticidas não apresenta efeito inibitório sobre os FMAs (GIOVANNETTI et al., 2006). Considerando a variação de sensibilidade entre e intra espécies, para alguns isolados a presença de quantidades ou concentrações de determinadas substâncias podem favorecer a germinação, o crescimento micelial, a colonização micorrízica

e a esporulação desses fungos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SOUZA et al, 2010).

Figura 6 - Comprimento de hifas (mm) de *Gi. albida* em SAT contaminado com doses crescentes de Clorpirifós



Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($p < 0,05$).

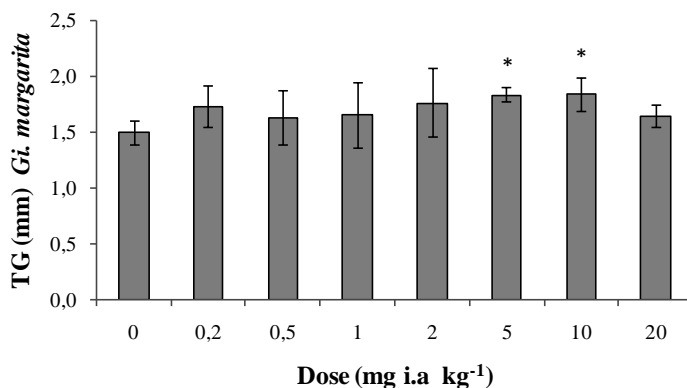
Fonte: Produção da autora, 2016.

Para o parâmetro TG, do isolado *Gi. margarita*, a adição de Clorpirifós não provocou diferenças com o controle até a dose de 2 mg i.a. kg⁻¹ (Figura 7). Houve incremento do tamanho de TG nas duas doses seguintes (5 e 10 mg i.a. kg⁻¹) voltando a reduzir e a não diferir do controle na última dose testada. As doses CENO (20 mg i.a. kg⁻¹) e CEO (>20 mg i.a. kg⁻¹) foram estimadas considerando a ausência de efeitos negativos desse contaminante sobre o parâmetro avaliado (Tabela 9).

Para o parâmetro HF, do isolado *Gi. margarita*, também houve uma diferença positiva em relação ao controle nas doses de 0,2; 0,5; 1 e 2 mg i.a. kg⁻¹ de clorpirifós. Até a dose de 2 mg i.a. kg⁻¹ o comprimento de HF aparentemente foi estimulado

pela presença do contaminante (Figura 8). A partir da dose seguinte (5 mg i.a. kg⁻¹) não houve diferença estatística e as médias se igualaram ao controle, indicando a redução do estímulo ao crescimento de HF (CENO = 20 mg i.a. kg⁻¹; CEO = >20 mg i.a. kg⁻¹) (Tabela 9).

Figura 7 - Comprimento do tubo germinativo (mm) de *Gi. margarita* em SAT contaminado com doses crescentes de Clorpirifós.



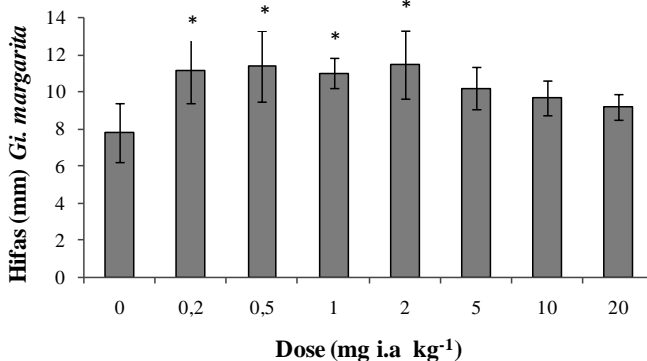
Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($p < 0,05$).

Fonte: Produção da autora, 2016.

Na história evolutiva dos FMAs, várias estratégias de sobrevivência supostamente, permitiram a esses organismos superar a sua condição de biotrofismo obrigatório (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010). Dentre elas estão: (1) a ampla gama de hospedeiros que aumenta a possibilidade de esporos germinados individualmente entrarem em contato e colonizar as raízes do hospedeiro e (2) a produção e diferenciação do seu micélio assimbiótico como resposta ao reconhecimento dos sinais moleculares do hospedeiro e à

alterações na composição química do ambiente (GIOVANNETTI; SBRANA, 1998; KOSUTA et al, 2003; GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010).

Figura 8 - Comprimento do tubo germinativo (mm) de *Gi. margarita* em SAT contaminado com doses crescentes de Clorpirifós.



Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($p < 0,05$).

Fonte: Produção da autora, 2016.

Na história evolutiva dos FMAs, várias estratégias de sobrevivência supostamente, permitiram a esses organismos superar a sua condição de biotrofismo obrigatório (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010). Dentre elas estão: (1) a ampla gama de hospedeiros que aumenta a possibilidade de esporos germinados individualmente entrarem em contato e colonizar as raízes do hospedeiro e (2) a produção e diferenciação do seu micélio assimbiótico como resposta ao reconhecimento dos sinais moleculares do hospedeiro e à alterações na composição química do ambiente (GIOVANNETTI; SBRANA, 1998; KOSUTA et al, 2003; GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010).

Logo, o estímulo ao crescimento do HF para *Gi. albida*, e de TG e HF para *Gi. margarita*, causado por algumas doses de clorpirifós, pode ser explicada e representar um mecanismo estratégico desses fungos para garantir sua permanência no ambiente, uma vez que considerando as distancias entre simbioses e hospedeiros no solo, propágulos com maior capacidade de crescimento são capazes de superar distâncias consideráveis e geralmente obtêm níveis de infecção alta (BOWEN, 1994).

No que tange a viabilidade de utilização dos parâmetros TG e HF como indicadores da sensibilidade de FMAs aos poluentes considera-se que: (1) mostraram-se pouco sensíveis e com comportamento variável frente as doses testadas de CD e clorpirifós; (2) avaliação desses parâmetros exige ainda a existência de equipamento de microscopia específico (microscópio estereoscópico com câmera de imagem de boa resolução acoplado) e isso poderia constituir um fator limitante para a realização desses testes e (3) a avaliação destas variáveis exige um tempo muito maior do executor/manipulador do teste em relação à avaliação da germinação, contrariando as premissas de facilidade de execução e rapidez na obtenção dos resultados para esse tipo de teste.

Por fim, é importante salientar que o este tipo de estudo avalia a resposta dos FMAs sem a interferência de outros componentes do ecossistema solo e são importantes para o estabelecimento de curvas de sensibilidade das espécies, que requerem uma quantidade considerável de dados (GIOVANNETTI et al., 2006). Entretanto, como em condições naturais, interações extremamente complexas ocorrem entre os FMAs, plantas hospedeiras, agrotóxicos e demais fatores bióticos e abióticos, é necessário saber mais sobre o efeito de agrotóxicos e contaminantes diversos sobre organismos não-alvo do solo em todos os níveis possíveis: células, população, população genética e interações (GIOVANNETTI et al., 2006).

Tabela 9 - Resultados compilados de CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado) estimados para germinação, tamanho do tubo germinativo e comprimento de hifas nos testes de sensibilidade de *Gi. albida* e *Gi. margarita* à Cd e Clorpirifós.

Isolado	Contaminante	Parâmetro					
		Germinação		TG		HF	
		CENO	CEO	CENO	CEO	CENO	CEO
AREIA							
<i>Gi. albida</i>	Cd (mg kg ⁻¹)	<0,2	0,2	0,5	1	20	>20
	Clorpirifós (mg i.a. kg ⁻¹)	—	—	—	—	—	—
<i>Gi. margarita</i>	Cd (mg kg ⁻¹)	—	—	—	—	—	—
	Clorpirifós (mg i.a. kg ⁻¹)	—	—	—	—	—	—
SAT							
<i>Gi. albida</i>	Cd (mg kg ⁻¹)	<0,2	0,2	20	>20	20	>20
	Clorpirifós (mg i.a. kg ⁻¹)	<0,2	0,2	20	>20	20	>20
<i>Gi. margarita</i>	Cd (mg kg ⁻¹)	<0,2	0,2	20	>20	20	>20
	Clorpirifós (mg i.a. kg ⁻¹)	<0,2	0,2	20	>20	20	>20

Linha contendo travessão (—) se referem a ensaios não validados (média de germinação <75%);

Fonte: Produção da autora, 2016.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os isolados de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) testados nos Experimentos 1 e 2, três deles tiveram destaque: *Gi. albida* SCT200A, *Gi. margarita* SCT077A e *R. clarus* RJ102A. Estes apresentaram taxas de germinação superiores aqueles exigidos para validação do protocolo ISO e tiveram regularidade de germinação numa gama maior de substratos.

Para o fator ‘tempo de incubação’ os resultados mostraram que a avaliação das unidades experimentais em um período superior a 14 dias não se justifica e, se deve manter, para a avaliação da sensibilidade da germinação de FMAs oriundos de solos tropicais e subtropicais o tempo de incubação, proposto pelo Protocolo ISO.

A temperatura de incubação de 28 °C possibilitou maiores taxas de germinação dos isolados testados em relação à temperatura de 24°C, indicando uma adaptação maior dos isolados a temperaturas mais elevadas. Sugere-se que os estudos futuros que avaliem a sensibilidade da germinação de FMAs isolados de solos tropicais e subtropicais adotem 28 °C como temperatura de incubação.

O substrato areia é muito variável para testar a germinação de esporos de FMAs e, se utilizado como substrato padrão, a sua eficiência deve ser previamente confirmada. Já a utilização do solo artificial tropical – SAT em substituição ao solo OCDE como substrato padrão/controlado é viável e mais eficiente.

Em relação aos outros parâmetros avaliados além da germinação, constatou-se que não houve efeito deletério para o tamanho do tubo germinativo (TG) e comprimento total de hifas (HF) para *Gi. albida* SCT200A e *Gi. margarita* SCT077A com as doses testadas de Cd e Clorpirifós. Além de pouco sensíveis, a avaliação destas variáveis exige infraestrutura básica e demanda de um tempo muito maior para

a obtenção dos resultados, o que pode consistir um fator limitante.

A germinação de *Gi. albida* SCT200A e de *Gi. margarita* SCT077A se mostrou pouco sensível aos contaminantes Cd e Clorpirifós nas doses testadas. Isso aponta a possibilidade de utilização desses isolados para fins de inoculação em plantas para recuperação de áreas contaminadas com Cd e, indica a possibilidade de utilização com plantas em locais onde ocorre a aplicação de Clorpirifós até a dose de 20 mg i.a. kg⁻¹.

Ensaio complementares com doses distintas das testadas devem ser realizados para *Gi. albida* e *Gi. margarita*. A utilização de isolados diferentes para essas mesmas espécies contribuirão para a avaliação das diferenças intra-espécies na sensibilidade aos contaminantes.

Indica-se também, a realização de testes de sensibilidade com o isolado *R. clarus* RJ102A para os contaminantes testados, uma vez que, nesse estudo e por motivos já apresentados a espécie não foi avaliada.

O estabelecimento de uma curva de sensibilidade aos contaminantes é necessário para poder sugerir o uso de uma espécie como referência para a realização de testes ecotoxicológicos. Por isso, uma proposta de adaptação do uso do Protocolo ISO/TS 10832:2009, carece ainda de informações e ensaios adicionais com outras espécies de FMAs.

REFERÊNCIAS

ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift.**, v. 22, n. 6, dez. 2013.

AMIR, H. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. **Mycorrhiza**, v. 23, p. 585-595, 2013.

AMIR, H.; JASPER, D. A.; ABBOTT, L. K. Tolerance and induction of tolerance to Ni of arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils. **Mycorrhiza**, v. 19, p.1-6, 2008.

AN, Y. J. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. **Environ. Pollut.**, v.127, p. 21-26. 2004.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores Biológicos de Qualidade do Solo. **Biosci. J.**, v. 23, n. 3, p. 66-75, jul-set, 2007.

ARAÚJO, F. DOS S. **Potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares em seis sistemas de uso do solo, na região nordeste do semi-árido do Brasil.** 2008. 50p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) — Universidade Federal de Campina Grande, Patos: 2008.

AZEVEDO, G; SOUZA, F. Crescimento, ontogenia e dinâmica de esporulação de uma estirpe dismórfica de fungo micorrízico arbuscular (Glomerycota) do gênero *Glomus* em cultivo . In: **Congresso Brasileiro de Micologia**, v. 5. Recife: UFPE, 2007.

BASILE, A. G. **Desenvolvimento de teste ecotoxicológico com o fungo *Alternaria cassiae*: toxicidade aguda de agrotóxicos e avaliação de risco ambiental.** 2008. 54p.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, 2008.

BHAT, S. Ecotoxicology & Impact on Biodiversity. **J. Pharmacogn. Phytochem.**, v. 2, n. 2, p.1-19, 2013.

BENTIVENGA, S. P. et al. Cellular organization in germ tube tips of *Gigaspora* and its phylogenetic implications. **Mycologia**, v.105, n. 5, p. 1087-99, 2013.

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. Fungos Micorrízicos arbusculares: Muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S (Ed). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Soc. Bras. de Ciência do Solo, 2006.

BINGHAM, M. A., SIMARD, S. W. Mycorrhizal networks affect ectomycorrhizal fungal community similarity between conspecific trees and seedlings. **Mycorrhiza**, v. 22, n. 4, p. 317-326, 2012.

BOWEN, G. D. The ecology of ectomycorrhiza formation and functioning. **Plant Soil**, v.159, n.1 p.61-67, 1994.

BRESSAN, W. The interactive effect of phosphorus and nitrogen on "*in vitro*" spore germination of *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann, root growth and mycorrhizal colonization. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p. 276-280, 2001.

BOSSIO, D. A. et al. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of western Kenya. **Microb. Ecol.**, v. 49, n.1, p. 50-62, jan. 2005.

BUENO, A. F. Efeito do tratamento de sementes com inseticidas no controle de pragas iniciais e na qualidade fisiológica das sementes em girassol. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.1, p.49-56, 2010.

BUYSENS, C.; DUPRÉ DE BOULOIS, H.; DECLERCK, S. Do fungicides used to control *Rhizoctonia solani* impact the non-target arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*? **Mycorrhiza**, v. 25, p.277-88, mai. 2015.

CABRAL, L. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. **World J. Microbiol. Biotechnol.**v. 31, p. 1655-1664, 2015.

CABRAL, L. et al. Retenção de metais pesados em micélio de fungos micorrízicos arbusculares. **Quím. Nova**, v. 33, n. 1, p. 25-29, 2010.

CAMPOS, A. A. B. et al. Selection of fungicides aiming preservation of the indigenous arbuscular mycorrhizal fungi in the common bean cultivation. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.** v.19, n.9, 2015.

CARDOSO, E. J. B. N.; ALVES, P. R. L. Soil Ecotoxicology. In: BEGUM, G (Ed). **Ecotoxicology**. [S. l.]: InTech, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/ecotoxicology/soil-ecotoxicology>>.

CARDOSO, E. J. B. N.; NAVARRO, R. B.; NOGUEIRA, M. A. Manganês e germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 26, p.795-799, 2002.

CARNIEL, L. S. C. **Avaliação do risco ecológico de Mancozebe e Clorpirifós para representantes da macro e mesofauna do solo e eficiência de leitos biológicos de descarte**. 2015. 140 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2015.

CEOLA, G. **Fungos micorrízicos arbusculares na recuperação de áreas mineradas no Município de Lauro Müller, Sul de Santa Catarina**. 2010. 96p. Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo) — Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2010.

CHELINHO, S. et al. Soil microarthropod community testing: a new approach to increase the ecological relevance of effect data for pesticide risk assessment. **Appl. Soil Ecol.**, v. 83, p. 200-209, 2013.

CHU, E. Y. Micorrizas. In: **Sistema de produção da Pimenteira-do-Reino**. Embrapa: Sistemas de Produção 01. Versão Eletrônica, dez. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/micorrizas.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

CLARK, R. B. Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. **Plant Soil**, v.192, p.15-22, 1997.

COM - Comissão das Comunidades Europeias. **Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the Economic and Social Committee and the Committee of the regions: Towards a thematic strategy for soil protection**. COM: Bruxelas, 2002.

CORNEJO, P. et al. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. **Soil Biol. Biochem.**, v.57, p. 925-928, 2013.

DANIELS, B. A.; TRAPPE, J. M. Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **Phytopathology**, v. 58, p. 900-908, 1980.

DINIZ, A.; FRAGA, H. Poluição dos Solos: Riscos e Consequências. **Rev. Fac. Ciênc. Tecnol.**, v. 97, p. 106, 2005. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10284/208>. Acesso em: 20 dez. 2015.

DOMINGUES, T. C. G. **Teor de metais pesados em solo contaminado com resíduo de sucata metálica, em função de sua acidificação**. 2009. 86p. Dissertação (Mestrado em agricultura tropical e subtropical) — Instituto Agrônômico, Campinas, 2009.

DRIAI, S. et al. Is the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* able to fulfil its life cycle in the presence of diesel pollution? **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 105, p.58-65, 2015.

DRUILLE, M. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate. **Appl. Soil Ecol.**, v. 72, p. 143–149, 2013.

EGERTON-WARBURTON, L.M., QUEREJETA, J.I., ALLEN, M.F. Common mycorrhizal networks provide a potential pathway for the transfer of hydraulically lifted water between plants. **J. Exp. Bot.**, v. 58, p.1473-1483, 2007.

GADD, G. M. et al. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 204, p.311-316, 2001.

GARCIA, M. V. B. Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical

regions. **Ecology and Development Series**; Zentrum für 17
Entwicklungs for schung: University of Bonn, 2004.

GASPAR, M.L. et al. Effect of phenanthrene and *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots. **Mycorrhiza**, v.12, p. 55-59, 2002.

GERDEMANN, J. Y. I. & NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v. 46, p.235-244, 1963.

GIOVANNETTI, M. et al. Mycorrhizal fungi in ecotoxicological studies: soil impact of fungicides, insecticides and herbicides. **Prevention Today**, v. 2, n. 1-2, p. 47-62, 2006.

GIOVANNETTI, M.; AVIO, L.; SBRANA, C. Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth: hysiological and genetic aspects. In: KOLTAI, H.; KAPULNIK, Y. (Eds.) **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. Springer Science: Netherlands, 2010.

GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C. Meeting a nonhost: the behaviour of arbuscular mycorrhizal symbionts. **Mycorrhiza**, v. 8, p. 123–130, 1998.

GOMES, F. W. F. et al. Efeitos da aplicação de um resíduo industrial orgânico nos fungos micorrízicos arbusculares. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. 23-28 de setembro, Caxambu/MG, 2007.

GONZALEZ-GUERRERO, M. et al. Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Can. J. Microbiol.**, v. 54, n. 2, p. 103-110, 2008.

GOTO, B. T.; MAIA, L. C. Glomerospores: a new denomination for the spores of Glomerycota, a group molecularly distinct from the Zygomycota. **Mycotaxon**, v. 96, p.129-132, 2006.

HASSAN, S. E. Contrasting the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi from hydrocarbon-contaminated and uncontaminated soils following willow (*Salix* spp. L.) planting. **PLoS ONE**, v. 9, p. e102838, 2014.

HAYASAKA, D. et al. Different acute toxicity of fipronil baits on invasive *Linepithema humile* supercolonies and some non-target ground arthropods. **Ecotoxicology**, v. 24, p. 1221-1228, ago. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA.
Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil. Brasília: Ibama, 2010, 84p.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO – 10390**: Soil quality – Determination of pH. Genève, Switzerland, 2005.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO – 10832**: Soil quality – Effects of pollutants on mycorrhizal fungi – Spore germination test. Genève, Switzerland, 2009.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO-11267**: Soil quality – Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants, Genève, Switzerland, 1999.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO-11268-2**: Soil quality – Effects of pollutants on earth-worms

(*Eisenia fetida*) (Part 2: Method for the determination of effects on reproduction), Genève, Switzerland, 1998a.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO – 11274**: Soil quality – Determination of the water-retention characteristic — Laboratory methods. Genève, Switzerland, 1998b.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO-16387**: Soil quality – Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) - Determination of effects on reproduction and survival, Genève, Switzerland, 2004

ISO - International Organization for Standardization. **Structure and governance**. 2014. Disponível em: http://www.iso.org/iso/home/about/about_governance.htm. Acesso em: jul. 2014.

JANOUSHKOVÁ, M.; VOSÁTKA, M. Response to cadmium of *Daucus carota* hairy roots dual cultures with *Glomus intraradices* or *Gigaspora margarita*. **Mycorrhiza**, v. 15, p. 217–224, 2005.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil - V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biol. Biochem.**, v. 8, p. 209-213, 1976.

JUGE, C. et al. Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 16, p.371-379, 2006.

JIANG, Q. Y. et al. Effect of *Funneliformis mosseae* on the growth, cadmium accumulation and antioxidant activities of *Solanum nigrum*. **Appl. Soil Ecol.**, v. 98, p. 112–120, 2016.

KARPOUZAS, D.G. et al. Effects of nicosulfuron on the abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi used

as indicators of pesticide soil microbial toxicity. **Ecol. Indic.**, v. 39, p. 44–53, 2014.

KLAUBERG-FILHO, O. **Ecologia e atividade de fungos micorrízicos arbusculares em solo poluído com metais pesados**. 1999. 161p. Tese (Doutorado em Agronomia) — Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

KLUGH-STEWART, K.; CUMMING, J. R. Organic acid exudation by mycorrhizal *Andropogon virginicus* (L. broomsedge) roots in response to aluminum. **Soil Biol. Biochem.**, v. 41, p. 367–373, 2009.

KORADE, D. L.; FULEKAR, M. H. Rhizosphere remediation of chlorpyrifos in mycorrhizospheric soil using ryegrass. **J. Hazard. Mater.**, v. 172, p. 1344–1350, 2009.

KOSUTA, S. et al. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Mendicago trunculata*. **Plant Physiology**, v. 131, p. 952-962, 2003.

KROMP, B. Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. **Agric. Ecosyst. Environ.** v. 74, p. 187-228, 1999.

LERAT, S. et al. 14C transfer between the spring ephemeral *Erythronium americanum* and sugar maple saplings via arbuscular mycorrhizal fungi in natural stands. **Oecologia**, v. 132, p. 181-187, 2002.

LI, X. et al. Effects of prometryn and acetochlor on arbuscular mycorrhizal fungi and symbiotic system . **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 57, p. 122-128, 2013.

LOBRY DE BRUYN, L. A. Ants as bioindicators of soil function in rural environments. **Agric. Ecosyst. Environ.**, vol. 74, p. 425-441, jun.1999.

LOUARN, J. et al. Reduced Germination of *Orobancha cumana* Seeds in the presence of arbuscular mycorrhizal fungi or their exudates. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p.e49273, nov. 2012.

MAIA, L. C.; SILVA, F. S. B.; GOTO, B. T. Estrutura, ultraestrutura e germinação de glomerosporos. In: SIQUEIRA, J. O. et al., eds. **Micorrizas: 30 Anos de Pesquisa no Brasil**. 1 ed. Lavras: UFLA. 2010.

MAIA, L. C.; YANO-MELO, A. M. Germination and germ tube growth of the arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora albida* in different substrates. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p 281-285, 2001.

MALTY, J. S.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesqu. Agropecu. Bras.**, Brasília, v. 41, n. 2, fev. 2006.

MAZZIA, C. et al. The impact of management strategies in apple orchards on the structural and functional diversity of epigeal spiders. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 3, p. 616-625, abr. 2015.

MARQUES, R. F. P. V. **Impactos ambientais da disposição de resíduos sólidos urbanos no solo e na água superficial em três municípios de Minas Gerais**. 2011. 95p. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos em Sistemas Agrícolas) — Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Lista de agrotóxicos cadastrados autorizados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 03/2016.

MEHARG, A. A. The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. **Mycol. Res.**, v.107, p. 1253–1265, 2003.

MORCILLO, M. S. et al. Avoidance behaviour response and esterase inhibition in the earthworm, *Lumbricus terrestris*, after exposure to chlorpyrifos. **Ecotoxicology**, 22:597-607, 2013.

MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. Ed. Lavras: UFLA, 2006.

MURADO, M. A.; PRIETO, M. A. NOEC and LOEC as merely concessive expedients: two unambiguous alternatives and some criteria to maximize the efficiency of dose-response experimental designs. **Sci Total Environ**, v. 1, p.461-462:576-86, 2013.

NANDA, S.; ABRAHAM, J. Remediation of heavy metal contaminated soil. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 12, p. 3099-3109, 2013. Doi: 10.5897/AJB12.720

NARDOCCI, A. C. Avaliação de Risco em Toxicologia Ambiental. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C. (Org.) **Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

NARA, K. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. **New Phytol.**, v. 169, p. e178, 2006.

NEAGOE, A. et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on *Agrostis capillaris* grown on amended mine tailing substrate at pot, lysimeter, and field plot scales. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 21, p. 6859–6876, 2014.

NERY, J. T. dinâmica climática da região sul do Brasil. **Rev. Bras. Climatol.** [S.l.], v. 1, mai. 2011.

OCDE - Organisation for Economic Cooperation and Development. **OCDE - Guideline for Testing of Chemicals No. 207.** Earthworm Acute Toxicity Test, Paris, 1984a.

OCDE - Organisation for Economic Cooperation and Development. **OCDE - Guideline for Testing of Chemicals No. 208.** Terrestrial Plants, Growth Test, Paris, 1984b.

OCDE - Organization Economic Cooperation and Development. **OCDE - Guidelines for the testing of chemicals No. 216.** Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test. 2000a.

OCDE - Organization Economic Cooperation and Development. **OCDE - Guidelines for the testing of chemicals No. 217.** Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test., 2000b.

OCDE - Organization of Economic Cooperation and Development. **OCDE - Guideline for Testing of Chemicals No. 222.** Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida / andrei*), Paris, 2004.

OEHHA. Office of Environmental Health Hazard Assessment. **Soil toxicity and bioassessment test methods for ecological risk assessment**. Califórnia, 2009.

OGAR, A.; SOBCZYK, Ł.; TURNAU, K. The effect of combined microbes on plant tolerance to Zn-Pb contaminations. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 22, p. 19142-56, 2015.

OLIVEIRA, V. H. **Concentração de base e risco ecotoxicológico de cádmio em solos**. 2013. 100p. Dissertação (Mestrado Agricultura Tropical e Subtropical) — Instituto Agronômico, Campinas, 2013.

ÖPIK, M. et al. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. **J. Ecol.**, v. 94, p. 778–790, 2006.

PAULA, A. M. DE; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrízica pelo *Glomus etunicatum*. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 31, p. 805-811, 2007.

PEREIRA, A. R.; ANGELOCCI, L. R.; SENTELHAS, P. C. **Agrometeorologia: fundamentos e aplicações práticas**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária Ltda., 2002.

PINHEIRO, F. M. A. et al. Influência da cobertura plástica na geotemperatura de áreas cultivadas na Amazônia Oriental. **XII Congresso Brasileiro de Meteorologia**, Foz de Iguaçu-PR, p.2537, 2002.

REDON, P. O.; BÉGUIRISTAIN, T.; LEYVAL, C. Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multimetallic (Cd, Zn,

Pb) contaminated agricultural soil. **Mycorrhiza**, v.19, p.187-195, 2009.

RODRIGUES, S.; DUARTE, A. C. Poluição do Solo: revisão generalista dos principais problemas. In: CASTRO, A; DUARTE, A; SANTOS, T. (Eds). **O ambiente e a saúde**. Lisboa: Instituto Piaget, 2003.

RÖMBKE, J., BAUER, C. ; MARSCHNER, A. Hazard Assessment of Chemicals in Soil. Proposed Ecotoxicological Test Strategy. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, Vol. 3, p. 78-82, 1996.

SANTOS, M. J. G. et al. Pesticide application to agricultural fields: effects the reproduction and avoidance behaviour of *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*. **Ecotoxicology**, 21:2113–2122, 2012.

SAKUMA, M. Probit analysis of preference data. **Appl. Entomol. Zool.**, 33:339-347, 1998.

SCHNEIDER, J. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in arsenic-contaminated areas in Brazil. **J. Hazard. Mater.**, v. 262, p. 1105–1115, 2013.

SCHOONMAKER, A. L. et al. Tree proximity, soil pathways and common mycorrhizal networks: their influence on utilization of redistributed water by understory seedlings. **Oecologia**, v. 154, p. 455-466, 2007.

SILVA, A. L. et al. Ação de inseticidas sobre o percevejo-castanho-da-raiz *Scaptocoris castanea* Perty (Hemiptera: Cydnidae) e seu efeito no desenvolvimento e na produtividade da cultura do milho. **BioAssay**, v.8, n.6, 2013.

SILVEIRA, A. P. D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.). **Microbiologia do Solo**. Campinas: Soc. Bras. Ciência Solo, p.258-282. 1992.

SIMARD, S. W. et al. Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modeling. **Fungal Biol. Rev.**, v. 26, n. 1, p. 39-60, abr. 2012.

SIQUEIRA, J. O. et al. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. **Documento 45**. Brasília: Embrapa Soja, 1994.

SIQUEIRA, J. O. et al. Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Can. J. Microbiol.**, 1985.

SIQUEIRA, J. O.; HUBBELL, D. H.; MAHMUD, A. W. Effect of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Soil**, v. 76, p. 115-124, 1984.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Fundamentos da Toxicologia Ambiental. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de toxicologia ambiental**: conceitos e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

SISINNO, C. L. S.; SÁFADI, R. S. Controle de qualidade dos resultados de toxicologia ambiental. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de toxicologia ambiental**: conceitos e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

SMITH. S. E.; READ, D. J. **Micorrhizal Symbiosis**. London: Academic Press, 1997.

SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biol. Fertil. Soils**, v. 44, p. 833–841.

SOARES, S. A. G. et al. Efeito de bactérias na germinação de fungos micorrízicos arbusculares e co-inoculação em mudas de abacaxizeiro. **Rev. Caatinga**, v.22, n.2, p.31-38, abr/jun 2009.

SONG, Y. Y. et al. Interplant communication of tomato plants through underground common mycorrhizal networks. **PLoS One**, v. 5, p.e13324, oct. 2010.

SOUZA, F. A. et al. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares, sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUEIRA, J. O. et al., Eds. **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: UFLA. 2010.

SOUZA, F. A. et al. Life history strategies in Gigasporaceae: insight from monoxenic culture. In: DECLERK, S; STRULLU, D. G.; FORTIN J. A. *In Vitro* Culture of Mychorrhizas. **Soil Biology**, v. 4, p. 73-91, 2005.

SOUZA, F. A.; SILVA, I. C. L.; BERBARA, R. L. L. Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008.

SOUZA, V. C. et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, v. 10, p. 612-618, 2006.
Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v10n3/v10n3a11.pdf>>. Acessado em: 13 dez. 2015.

STATSOFT. **STATISTICA 7.0 (data analysis software system)**. [s.l]. 2004. Disponível em <<http://www.statsoft.com>> Acesso em: abr. 2014

STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Ecossistemas Brasileiros. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Eds.). **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008.

TESTE, F. P. et al. Access to mycorrhizal networks and tree roots: importance for seedling survival and resource transfer. **Ecology**, v. 90, p. 2808-2822, 2009.

TWANABASU, B. R. et al. Triclosan inhibits arbuscular mycorrhizal colonization in threewetland plants. **Sci. Total Environ.** v. 447, p. 450–457, 2013.

TWANABASU, B. R; STEVENS K. J; VENABLES, B. J. The effects of triclosan on spore germination and hyphal growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Sci. Total Environ.**, v. 454–455, p. 51–60, jun. 2013.

TOMMERUP, I. C. Spore Dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 81, p.37-45, 1983.

TOMMERUP, I. C. Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. **Trans. Br. Mycol. Soc**, v. 81, p. 381-387, 1983b.

TOMMERUP, I. C. Physiology and ecology of VAM spore germination and dormancy in soil. In: SYLVIA, D.M.; HUNG,

L.L. & GRAHAM, S. H., eds. **Proceedings of the 7TH NACOM**. Gainesville, 1987. p.175-177.

TORDOFF, G. M.; BODDY, L.; JONES, H. H. Species-specific impacts of collembola grazing on fungal foraging ecology. **Soil Biol. Biochem.**, v. 40, p. 434–442, 2008.

VAN BEELEN, P.; DOELMAN, P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. **Chemosphere**, v. 34, n. 3, p. 455-499, 1997.

VAN-GROENIGEN, K. J. et al. Abundance, production and stabilization of microbial biomass under conventional and reduced tillage. **Soil Biol. Biochem.**, v. 42, p.48–55, 2010.

VANIN, A. et al. Tratamento de sementes de sorgo com inseticidas. **Rev. Bras. Semen.**, v. 33, n.2, p. 299-309, 2011.

VIVAS, A.; BAREA, J. M.; AZCÓN, R. *Brevibacillus brevis* isolated from cadmium - or zinc - contaminated soils improves *in vitro* spore germination and growth of *Glomus mosseae* under high Cd or Zn concentrations. **Microb. Ecol.**, v. 49, p. 416–424, 2005.

WALKER, C. H. et al. **Principles of Ecotoxicology**. 2 ed. T&F STM, London. 2001. p. 309.

WANG, F. Y. et al. Dynamics of phoxim residues in green onion and soil as influenced by arbuscular mycorrhizal fungi. **J. Hazard. Mater.**, v. 185, p. 112–116, 2011.

WATTS-WILLIAMS, S. J.; PATTI, A. F.; CAVAGNAR, T. R. Arbuscular mycorrhizas are beneficial under both deficient

and toxic soil zinc conditions. **Plant Soil**, v. 371, n. 1 p. 299-312, 2013.

WEISSENHORN, I; LEYVAL, C; BERTHELIN, J. Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. **Plant Soil**, v. 157, p. 247-256, 1993.

WU, Z. et al. Mycorrhizal inoculation affects Pb and Cd accumulation and translocation in pakchoi (*Brassica chinensis* L.). **Pedosphere**, v.26, n. 1, p. 13–26, 2016.

WU, S. et al. Transformation and immobilization of chromium by arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by sem-eds, tem-eds, and xafs. **Environ. Sci. Technol.**, v. 49, p.14036–14047, nov. 2015.

YANG, Y. et al. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Robinia pseudoacacia* in uncontaminated and heavy metal contaminated soils. **Soil Biol. Biochem.**, v. 86, p. 146–158, jul. 2015.

ZEISS, CARL. Micro Imaging GmbH. **AxioVision 4.8**. Göttingen, Deutschland, 2009.