



**UDESC**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

TESE DE DOUTORADO

**MÉTODOS ECOTOXICOLÓGICOS  
NA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE  
AGROTÓXICOS SOBRE FUNGOS  
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

**GILVANI CARLA MALLMANN**

**LAGES - SC, 2020**

**GILVANI CARLA MALLMANN**

**MÉTODOS ECOTOXICOLÓGICOS NA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE  
AGROTÓXICOS SOBRE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciência do Solo do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência do Solo.

Orientador: Dr. Osmar Klauberg Filho

**Lages, SC**

**2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Mallmann, Gilvani Carla  
Métodos ecotoxicológicos na avaliação do efeito de agrotóxicos  
sobre fungos micorrízicos arbusculares / Gilvani Carla Mallmann. --  
2020.  
178 p.

Orientador: Osmar Klauberg Filho  
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação  
em Ciência do Solo, Lages, 2020.

1. Efeito de agrotóxicos. 2. FMA. 3. Germinação de esporos. 4.  
Simbiose micorrízica. I. Klauberg Filho, Osmar . II. Universidade do  
Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. III. Título.

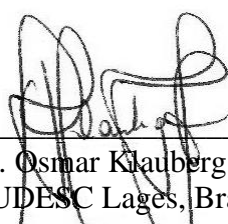
**GILVANI CARLA MALLMANN**

**MÉTODOS ECOTOXICOLÓGICOS NA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE  
AGROTÓXICOS SOBRE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciência do Solo do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência do Solo.

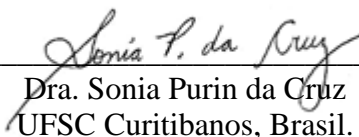
**Banca Examinadora:**

Orientador/Presidente:



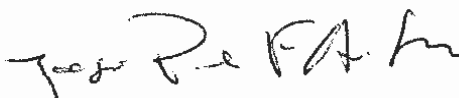
Dr. Osmar Klauberg Filho  
UDESC Lages, Brasil.

Membro externo:



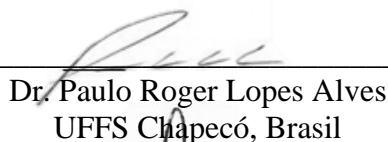
Dra. Sonia Purin da Cruz  
UFSC Curitibanos, Brasil.

Membro externo:



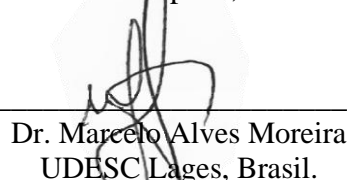
Dr. José Paulo Filipe Afonso de Sousa  
Universidade de Coimbra, Portugal.

Membro externo:



Dr. Paulo Roger Lopes Alves  
UFFS Chapecó, Brasil

Membro interno:



Dr. Marcelo Alves Moreira  
UDESC Lages, Brasil.

**Lages, 18 de fevereiro de 2020.**



## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por ser meu suporte, exemplo e inspiração desde sempre e para sempre. Você e o 'Mano' tiveram papel fundamental pra que esse doutorado acontecesse.

Ao Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho, pelo apoio intelectual e acadêmico, mas também pessoal durante esses 6 anos de caminhada. Sou grata por me permitir desenvolver um trabalho que me é tão caro.

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

À Prof<sup>a</sup> Sonia Purin da Cruz pelo suporte científico, técnico e material, mas também pelo incentivo pessoal e pelas hospedagens solidárias sempre muito acolhedoras.

Aos colegas do laboratório de Ecologia do Solo, atuais e egressos, por tornarem as muitas (muitas, mesmo) horas de trabalho mais alegres. Obrigada pelas horas em que abriram mão das próprias demandas, sem pestanejar para me ajudarem com as minhas. Obrigada pelo apoio, incentivo, exemplo e amizade de cada um (a). Obrigada pelos mates, pelos jantares e pelos bares. Vocês me proporcionaram experiências e histórias incríveis, registras em memórias muito especiais.

À Camila, Elston, Gustavo, Julia, Rafaela, Vanessa e Sr e Sra Carniel (Tiago e Letícia) por terem sido a melhor das equipes de campo que eu poderia querer pra uma coleta de TME e a todos os colegas e bolsistas que contribuíram na desmontagem desse experimento. À Letícia, Julia, Camila e Thuanne por terem sido suporte, cada uma a sua maneira, nos meses finais do doutorado.

Aos bolsistas queridos, Mariana, Giovana, Gabriel, Willy, que me acompanharam ao longo desse processo e cujo suporte e apoio nas atividades, foi inestimável. Você me orgulham e foi muito bom poder acompanhar o crescimento e a evolução de vocês. Aos demais bolsistas que trabalharam firme no período final das atividades. Vocês fizeram A diferença.

Aos amigos queridos de tantos (e de poucos) anos, que entenderam as minhas ausências e que sempre apoiaram as minhas decisões.

Aos colegas de outros laboratórios pelos tantos empréstimos de materiais e equipamentos, provando que a coletividade realmente faz diferença.

Ao Projeto de extensão Solo na Escola, da UDESC Lages e ao grupo de pessoas que faz esse projeto acontecer, muito obrigada por todas as experiências pessoais e intelectuais que vão além da academia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade do doutorado, aos professores e equipe técnica que fazem esse programa de excelência acontecer. À UDESC/PROMOP pelo apoio financeiro e disponibilização da bolsa ao longo de todo o período de doutoramento.

A todos aqueles que, de alguma forma, tornaram possível esse trabalho acontecer.

Meu mais sincero, OBRIGADA!

*"O ambiente é o que somos em nós mesmos.  
Nós e o ambiente somos dois processos  
diferentes; nós somos o ambiente e o ambiente  
somos nós."*

Jiddu Krishnamurti





## RESUMO

MALLMANN, Gilvani Carla. **Métodos ecotoxicológicos na avaliação do efeito de agrotóxicos sobre fungos micorrízicos arbusculares**. 2020. 178p. Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Lages, 2020.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) constiuem um grupo de organismos que estabelecem simbiose do tipo mutualista com a maioria das espécies de plantas, estão associados à diversas funções ecossistêmicas e são considerados um grupo-chave importante na avaliação do risco de poluentes no solo. O objetivo geral deste trabalho foi ampliar o número de informações existentes sobre os protocolos ecotoxicológicos já existentes para a fase pré-simbiótica, além de desenvolver e validar método de avaliação para a fase simbiótica do ciclo de vida dos FMAs, visando contribuir para o uso dos desses fungos na análise de risco ecológico de agrotóxicos no solo. Em ensaios de nível inferior (*lower-tier*), realizados em substrato artificial, não foi observada a existência de estabilidade da resposta da germinação de esporos ao longo de três gerações de cultivo dos isolados *Gigaspora albida* SCT200A e *Rhizophagus clarus* RJN102A e nem a existência de um padrão de resposta da germinação entre isolados de diferentes procedências geográficas dessas mesmas espécies quando testados com os fungicidas Clorotalonil, Mancozebe e Metalaxil-M (nas concentrações de 0, 10, 25, 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup>) e o ácido bórico (0, 100, 250, 500, 750 e 1000 mg kg<sup>-1</sup>). Para esses resultados determinou-se valores de concentração de inibição - CI (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) e, a partir dos valores de CI<sub>10</sub> estabelecidos e do cálculo das PEC<sub>inicial</sub> para Clorotalonil (1,98 mg kg<sup>-1</sup>), Mancozebe (3 mg kg<sup>-1</sup>) e para Metalaxil - M (0,16 mg kg<sup>-1</sup>), foi possível apontar que o Clorotalonil oferece potencial risco para a germinação de isolados de *G. albida*. Em avaliações do efeito de agrotóxicos sobre características da simbiose micorrízica realizada em sistema *in vitro*, envolvendo FMA da espécie *R. clarus* e raízes transformadas de chicória (*Cichorium intybus* L.) sob aplicação de concentrações crescentes de Clorotalonil (0; 0,5; 1; 1,5; 3; 6; 12 e 24 mg kg<sup>-1</sup>) em meio de cultura, indicaram efeito do fungicida sobre o percentual de colonização total, permitindo a determinação de CI<sub>20</sub> (4,6 mg kg<sup>-1</sup>) e CI<sub>10</sub> (2,4 mg kg<sup>-1</sup>). Os resultados indicaram ausência de efeitos para o percentual de colonização por arbúsculos e vesículas, produção de esporos e comprimento micelial extrarradicular total (CMET) nesse mesmo sistema de avaliação. Avaliações de características da simbiose realizadas em experimentos *in vivo*, com inoculação de esporos de *G. albida* e *R. clarus* em soja e braquiária, sob concentrações crescentes de Clorotalonil (0; 12; 18; 24; 36; 48 e 72 mg kg<sup>-1</sup>) em substrato artificial, apontaram para efeito do fungicida sobre todas as variáveis avaliadas (colonização total e arbuscular; número de esporos e CMET). Determinaram-se os valores de CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>, para todas as variáveis e, das CI<sub>10</sub> estabelecidas mais o cálculo da PEC<sub>inicial</sub>, identificou-se potencial risco da presença do Clorotalonil no ambiente para colonização total e CMET no experimento e número de esporos. Resultados do experimento de semi-campo (do tipo *Terrestrial Model Ecosystem*), coletado em Cambissolo e que avaliou o efeito da aplicação de concentrações crescentes de Clorotalonil (0, 375, 750, 1500, 3000, 7500 e 15000 g ha<sup>-1</sup>), sobre características da simbiose micorrízica estabelecidas com as raízes de plantas de soja, não apresentaram efeitos para variáveis relacionadas à colonização dessas raízes (colonização total, por arbúsculos esporos e vesículas). Já o número de esporos e CMET foram afetados pelas aplicações de Clorotalonil em doses menores do que a de recomendação para a cultura (1500 g ha<sup>-1</sup> do ingrediente ativo).

**Palavras-chave:** Efeito de agrotóxicos. FMA. Germinação de esporos. Simbiose micorrízica.



## ABSTRACT

MALLMANN, Gilvani Carla. **Ecotoxicological methods to evaluate the effect of pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi**. 2020. 178p. PhD Thesis in Soil Science. Santa Catarina State University (UDESC). Graduate in Soil Sciences Program. Lages, 2020.

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are a group of organisms that establish symbiosis of the mutualistic type, with most plant species, are associated with several ecosystem functions and are considered an important key group in the assessment of the risk of pollutants in the soil. The aim of this study was to expand the information on already existing ecotoxicological protocols for the pre-symbiotic phase, in addition to developing and validating an evaluation method for the symbiotic phase of the FMAs life cycle, aiming to contribute to the use of these fungi in the analysis of ecological risk of pesticides in the soil. In lower-tier assays no stability in spore germination response was observed over three generations of cultivation of *Gigaspora albida* SCT200A and *Rhizophagus clarus* RJN102A isolates, or the existence of a germination response pattern between isolates of the same species, but with different geographical origins when tested with the fungicides Chlorothalonil, Mancozeb and Metalaxyl-M (at concentrations of 0, 10, 25, 50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>) and boric acid (0, 100, 250, 500, 750 and 1000 mg kg<sup>-1</sup>). For these results, the inhibition concentration values - IC (IC<sub>50</sub>, IC<sub>20</sub> and IC<sub>10</sub>) were determined and, based on the established of IC<sub>10</sub> values and the PEC<sub>initial</sub> calculation for Chlorothalonil (1,98 mg kg<sup>-1</sup>), Mancozeb (3 mg kg<sup>-1</sup>) and Metalaxyl-M (0,16 mg kg<sup>-1</sup>), it was possible to point out that just Chlorothalonil offers a potential risk for the germination of *G. albida* isolates. Assessments of the effect of pesticides on aspects of mycorrhizal symbiosis performed in an *in vitro* system, involving *R. clarus* AMF and transformed chicory roots (*Cichorium intybus* L.) under application of increasing concentrations of Chlorothalonil (0, 0.5, 1, 1.5, 3, 6, 12 and 24 mg kg<sup>-1</sup>), indicated the effect of the fungicide on the percentage of total root colonization, allowed the determination of IC<sub>20</sub> (4.6 mg kg<sup>-1</sup>) and IC<sub>10</sub> (2.4 mg kg<sup>-1</sup>). Even, in this data set, results indicated non-significant effects for the percentage of colonization by arbuscules and vesicles, spore production and extraradical hyphal length. The evaluations of symbiosis characteristics performed in *in vivo* experiments, with inoculation of *G. albida* and *R. clarus* spores in soybean and brachiaria, under application of increasing concentrations of Chlorothalonil (0; 12; 18; 24; 36; 48 and 72 mg kg<sup>-1</sup>), pointed to the effect of the fungicide for all the variables evaluated (total and arbuscular colonization; number of spores and extraradical hyphal length). The values of IC<sub>50</sub>, IC<sub>20</sub> and IC<sub>10</sub> were determined for all variables and from IC<sub>10</sub> values plus PEC<sub>initial</sub> calculation, was identified the potential risk of the presence of Chlorothalonil in the environment of total colonization and extraradical hyphal length in experiment 1 and number of spores in experiments 1 and 4. Results of the semi-field experiment (Terrestrial Model Ecosystem type), collected in Cambisol and with evaluation the effect of Chlorothalonil in increasing concentrations (0, 375, 750, 1500, 3000, 7500 and 15000 g ha<sup>-1</sup>) on characteristics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis established with the roots of soybean plants, they did not show effects for variables related to the colonization of these roots (total colonization, arbuscular, spores and vesicles colonization). The number of spores and total extraradical hyphal length were affected by applications of Chlorothalonil in lower concentrations than that recommended for the culture (1500 g ha<sup>-1</sup> of the active ingredient).

**Key words:** Pesticides effect. AMF. Spore germination. Mycorrhizal symbiosis.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Design das unidades experimentais (UE). Distribuição dos esporos nos quadrantes da membrana e formação do "sanduíche de esporos" (A) e montagem das unidades experimentais nos ensaios de germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (B). .....45
- Figura 2 - Montagem (A), manutenção (B) e secagem (C) dos vasos de multiplicação de fungos micorrízicos arbusculares. ....48
- Figura 3 - Percentual de germinação dos esporos de *Gigaspora albida* nas gerações F1 (1ª coluna), F2 (2ª coluna) e F3 (3ª coluna), em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e Ácido Bórico.....53
- Figura 4 – Valores de concentração de inibição de 50 % da germinação (CI<sub>50</sub>) e intervalo de confiança superior (♦) e inferior (●) para as três gerações de *Gigaspora albida* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....54
- Figura 5 - Valores de concentração de inibição de 20 % da germinação (CI<sub>20</sub>) e intervalo de confiança superior (♦) e inferior (●) para as três gerações de *Gigaspora albida* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....54
- Figura 6 - Valores de concentração de inibição de 10 % da germinação (CI<sub>10</sub>) e intervalo de confiança superior (♦) e inferior (●) para as três gerações de *Gigaspora albida* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....55
- Figura 7 - Percentual de germinação dos esporos de *Rhizophagus clarus* nas gerações F1 (1ª coluna), F2 (2ª coluna) e F3 (3ª coluna), testadas em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....56
- Figura 8 - Valores de concentração de inibição de 50 % da germinação (CI<sub>50</sub>) e intervalo de confiança superior (♦) e inferior (●) para as três gerações de *Rhizophagus clarus* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....57
- Figura 9 - Valores de concentração de inibição de 20 % da germinação (CI<sub>20</sub>) e intervalo de confiança superior (♦) e inferior (●) para as três gerações de *Rhizophagus clarus* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....57
- Figura 10 - Valores de concentração de inibição de 10 % da germinação (CI<sub>10</sub>) e intervalo de confiança superior (♦) e inferior (●) para as três gerações de *Rhizophagus clarus* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....58
- Figura 11 - Percentual de germinação de *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus* ao longo de cinco anos de estocagem.....59

### CAPÍTULO 2

- Figura 12 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de *Gigaspora albida*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil.....77
- Figura 13 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de *Gigaspora albida*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Mancozebe. ....78
- Figura 14 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de *Gigaspora albida*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Metalaxil-M.....79

Figura 15 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de <i>Gigaspora albida</i> , em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Ácido bórico.....	79
Figura 16 - Valores de concentração de inibição de 50 % da germinação (CI <sub>50</sub> ) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para os diferentes isolados de <i>Gigaspora albida</i> testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....	80
Figura 17 - Valores de concentração de inibição de 20 % da germinação (CI <sub>20</sub> ) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para os diferentes isolados de <i>Gigaspora albida</i> testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....	80
Figura 18 - Valores de concentração de inibição de 10 % da germinação (CI <sub>10</sub> ) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para os diferentes isolados de <i>Gigaspora albida</i> testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....	81
Figura 19 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de <i>Rhizophagus clarus</i> , em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil.....	82
Figura 20 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de <i>Rhizophagus clarus</i> , em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Mancozebe.....	83
Figura 21 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de <i>Rhizophagus clarus</i> , em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Metalaxil-M.....	83
Figura 22 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de <i>Rhizophagus clarus</i> , em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Ácido bórico.....	84
Figura 23 - Valores de concentração de inibição de 50 % da germinação (CI <sub>50</sub> ) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para os diferentes isolados de <i>Rhizophagus clarus</i> testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....	84
Figura 24 - Valores de concentração de inibição de 20 % da germinação (CI <sub>20</sub> ) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para os diferentes isolados de <i>Rhizophagus clarus</i> testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....	85
Figura 25 - Valores de concentração de inibição de 10 % da germinação (CI <sub>10</sub> ) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para os diferentes isolados de <i>Rhizophagus clarus</i> testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.....	85
Figura 26 - Percentual de germinação dos esporos de <i>Funneliformis mosseae</i> testados em Clorotalonil e ácido bórico.....	86

### **CAPÍTULO 3**

Figura 27 - Esquema de montagem das unidades experimentais do ensaio <i>in vitro</i> , com meio de cultura contaminado com Clorotalonil.....	103
Figura 28 - Percentual de colonização total, colonização por arbúsculos e vesículas das raízes do experimento conduzido <i>in vitro</i> , contaminado com Clorotalonil.....	109
Figura 29 - Número de esporos e comprimento micelial extrarradicular total para cada unidade experimental do experimento conduzido <i>in vitro</i> , contaminado com Clorotalonil.....	109
Figura 30 - Esquema de montagem das unidades experimentais do experimento <i>in vitro</i> 1.	117
Figura 31 - Visão panorâmicas das unidades experimentais do ensaio <i>in vitro</i> para acompanhamento o crescimento das raízes. (A) panorâmica da 1ª semana; (B) panorâmica da 6ª semana; (C) panorâmica da 10ª semana e (D) panorâmica da 14ª semana.....	119

Figura 32 - Estruturas formadas nas unidades experimentais do ensaio *in vitro* 2: (A) Esporo germinado na placa e hifas pré-simbióticas; (B) Formação de pelos radiculares; (C) Hifas crescendo em direção à raiz e (D) Detalhe da hifa pré-simbiótica penetrando a raiz. .... 120

#### CAPÍTULO 4

Figura 33 - Esquema de montagem das unidades experimentais para os experimentos *in vivo* e do sistema de ajuste de umidade adotado. .... 129

Figura 34 - Sistema de ajuste de umidade por capilaridade foi utilizado durante a condução dos experimentos *in vivo*. (A) Posição de inserção do barbante, (B) vista aproximada do barbante + tubete e (C) vista geral do sistema de umidade dos experimentos. .... 130

Figura 35 - Percentual de colonização total das raízes dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil. Experimento 1 – *G. albida* + soja; Experimento 2 – *G. albida* + braquiária; Experimento 3 – *R. clarus* + soja; Experimento 4 – *R. clarus* + braquiária.... 137

Figura 36 - Percentual de colonização por arbúsculos nas raízes dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil. Experimento 1 – *G. albida* + soja; Experimento 2 – *G. albida* + braquiária; Experimento 3 – *R. clarus* + soja; Experimento 4 – *R. clarus* + braquiária. .... 138

Figura 37 - Número de esporos no substrato dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil. Experimento 1 – *G. albida* + soja; Experimento 2 – *G. albida* + braquiária; Experimento 3 – *R. clarus* + soja; Experimento 4 – *R. clarus* + braquiária. ... 140

Figura 38 - Comprimento micelial extrarradicular total (cm g<sup>-1</sup> de substrato) no substrato dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil. Experimento 1 – *G. albida* + soja; Experimento 2 – *G. albida* + braquiária; Experimento 3 – *R. clarus* + soja; Experimento 4 – *R. clarus* + braquiária. .... 141

Figura 39 - Esquema de montagem das unidades experimentais para o experimento prévio 1. (A) Montagem do sanduíche de esporos e semente; (B) Suporte e disposição das unidades experimentais. .... 149

Figura 40 - Esquema de ajuste de umidade por capilaridade para o experimento *in vivo* 4... 151

#### CAPÍTULO 5

Figura 41 – Coleta de TMEs à campo: área da coleta (A); tubo coletor de aço sendo empurrado para o interior do solo pela retroescavadeira (B); remoção do TME de dentro do coletor de aço (C); distância entre os pontos de coleta das amostras indeformadas de solo (D)..... 158

Figura 42 - Linha temporal de intervenções realizadas no experimento de TMEs ao longo da sua condução..... 159

Figura 43 – Coleta e separação das análises químicas por camada (A); eletrodutos reinseridos nos TMEs (B) e preenchidos com areia lavada (C)..... 161

Figura 44 – Equipamento utilizado para desmontagem dos TMEs (A); Amostra indeformada de solo (B) e separação profundidade 0 – 10 cm da amostra indeformada em camadas (C)..... 162

Figura 45 - Percentual de colonização total, colonização por arbúsculos, esporos e vesículas das raízes de soja, em experimento de semi-campo com aplicação de Clorotalonil. .... 166

Figura 46 – Número de esporos entre as camadas 0 – 2,5 cm, 2,5 – 5 cm e de 5 -10 cm dos tratamentos com aplicação de concentrações crescentes de Clorotalonil, em experimento de semi-campo..... 167



Figura 47 – Número de esporos por tratamento, em 50 g de solo das camadas 0 – 2,5, 2,5 – 5 e 5 – 10 cm do experimento de semi-campo com aplicação de concentrações crescentes de Clorotalonil.....	167
Figura 48 - Comprimento micelial extrarradicular total do solo (cm de hifas por g de solo) entre as camadas 0 – 2,5 cm, 2,5 – 5 cm e de 5 – 10 cm dos tratamentos com aplicação de concentrações crescentes de Clorotalonil, em experimento de semi-campo.....	168
Figura 49 - Comprimento micelial extrarradicular total (cm de hifas por g de solo) por tratamento, das camadas 0 – 2,5, 2,5 – 5 e 5 – 10 cm do experimento de semi-campo com aplicação de concentrações crescentes de Clorotalonil. ....	169

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Esquema conceitual da tese.....	33
Quadro 2 - Códigos e informações sobre local e ano de estabelecimento das culturas dos isolados de <i>Gigaspora albida</i> e <i>Rhizophagus clarus</i> testados.....	76



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Características químicas e físicas do Solo Artificial Tropical – SAT utilizado nos ensaios da fase pré-simbiótica. .... 44

Tabela 2 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para o isolado G1 de *Gigaspora albida* e suas gerações (F1, F2 e F3), em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico..... 69

Tabela 3 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para o isolado R1 de *Rhizophagus clarus* e suas gerações (F1, F2 e F3), em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico..... 70

### CAPÍTULO 2

Tabela 4 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para os diferentes isolados de *Gigaspora albida*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico..... 94

Tabela 5 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para os diferentes isolados de *Rhizophagus clarus*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico..... 95

### CAPÍTULO 4

Tabela 6 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para a variável % de colonização total dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil. .... 137

Tabela 7 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para a variável de % de colonização por arbúsculo dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil..... 139

Tabela 8 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para a variável nº de esporos no substrato para os experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil..... 140

Tabela 9 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para a variável de comprimento micelial extrarradicular total no substrato dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil. .... 142

### CAPÍTULO 5

Tabela 10 - Características químicas e físicas do Cambissolo utilizado no experimento de TME. .... 157

Tabela 11 – Tratamentos utilizados no experimento de semi-campo e suas correspondências em quantidade produto comercial, de ingrediente ativo (i. a.) e por kg de solo..... 160

Tabela 12 - Características de cultura, produto aplicado e solo utilizadas para cálculo das PEC<sub>year</sub> e PEC<sub>accumax</sub>. .... 165



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>25</b>
1.1	OBJETIVOS .....	30
1.2	HIPÓTESES.....	31
1.3	ESTRUTURA DA TESE .....	32
	REFERÊNCIAS .....	34
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO 1: MANUTENÇÃO DA RESPOSTA DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>Gigaspora albida</i> E <i>Rhizophagus clarus</i> A FUNGICIDAS AO LONGO DE TRÊS GERAÇÕES DE CULTIVO MONOXÊNICO</b> .....	<b>39</b>
	RESUMO .....	39
	ABSTRACT.....	40
2.1	INTRODUÇÃO .....	41
2.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	43
2.2.1	Metodologia comum aos dois grupos de experimentos.....	43
2.2.2	Grupo de experimentos 1: Estabilidade da resposta da germinação de esporos à fungicidas ao longo de três gerações monoxênicas.....	45
2.2.3	Grupo de experimentos 2: Viabilidade de esporos em diferentes anos de estocagem .....	50
2.3	RESULTADOS.....	52
2.3.2	Estabilidade da resposta da germinação de esporos à fungicidas ao longo de três gerações monoxênicas cultivo .....	52
2.3.3	Viabilidade de esporos em diferentes anos de estocagem.....	58
2.4	DISCUSSÃO .....	59
2.4.2	Estabilidade da resposta da germinação de esporos à fungicidas ao longo de três gerações monoxênicas cultivo .....	59
2.4.3	Viabilidade dos esporos .....	62
2.5	CONCLUSÃO .....	63
	REFERÊNCIAS .....	64
	APÊNDICE A .....	69
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 2: VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE ISOLADOS <i>Gigaspora albida</i> E <i>Rhizophagus clarus</i> A FUNGICIDAS</b> .....	<b>71</b>
	RESUMO .....	71
	ABSTRACT.....	72
3.1	INTRODUÇÃO .....	73
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	74
3.2.1	Metodologia comum aos dois grupos de experimentos.....	75

3.2.2	<b>Grupo de experimentos 1: Variabilidade intraespecífica da resposta da germinação a fungicidas</b>	<b>75</b>
3.2.3	<b>Grupo de experimentos 2: Resposta da germinação de esporos de <i>Funneliformis mosseae</i> a fungicida e a substância de referência</b>	<b>76</b>
3.3	<b>RESULTADOS</b>	<b>77</b>
3.3.1	<b>Variabilidade intraespecífica da resposta da germinação a fungicidas</b>	<b>77</b>
3.3.2	<b>Espécie de referência do protocolo ISO 10832:2009</b>	<b>86</b>
3.4	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>86</b>
3.4.1	<b>Variabilidade intraespecífica da resposta da germinação a fungicidas</b>	<b>86</b>
3.4.2	<b>Espécie de referência do protocolo ISO 10832:2009</b>	<b>88</b>
3.5	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>90</b>
	<b>APÊNDICE B</b>	<b>94</b>
4	<b>CAPÍTULO 3: SISTEMA IN VITRO PLANTA-FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES PARA AVALIAÇÃO DO RISCO DE FUNGICIDAS NA SIMBIOSE</b>	<b>97</b>
	<b>RESUMO</b>	<b>97</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>98</b>
4.1	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>99</b>
4.2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>100</b>
4.2.1	<b>Material biológico</b>	<b>101</b>
4.2.2	<b>Meio de cultivo e substância testada</b>	<b>101</b>
4.2.3	<b>Montagem e desmontagem das unidades experimentais</b>	<b>101</b>
4.2.4	<b>Variáveis simbióticas avaliadas</b>	<b>103</b>
4.2.5	<b>Análise estatística</b>	<b>107</b>
4.3	<b>RESULTADOS</b>	<b>107</b>
4.4	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>110</b>
4.5	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>111</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>112</b>
	<b>APÊNDICE C</b>	<b>116</b>
5	<b>CAPÍTULO 4: SISTEMA IN VIVO PLANTA-FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES PARA AVALIAÇÃO DO RISCO DE FUNGICIDAS NA SIMBIOSE</b>	<b>123</b>
	<b>RESUMO</b>	<b>123</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>124</b>
5.1	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>125</b>
5.2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>126</b>

5.2.1	Material biológico.....	126
5.2.2	Substrato .....	126
5.2.3	Tratamentos com fungicida e substância de referência.....	127
5.2.4	Montagem das unidades experimentais .....	128
5.2.5	Variáveis simbióticas avaliadas .....	131
5.2.6	Análise estatística .....	135
5.3	RESULTADOS.....	136
5.3.1	Percentual de colonização radicular.....	136
5.3.2	Número de esporos no substrato.....	139
5.3.3	Comprimento micelial extrarradicular total no substrato.....	141
5.4	DISCUSSÃO .....	142
5.5	CONCLUSÃO .....	144
	REFERÊNCIAS .....	145
	APÊNDICE D .....	148
6	<b>CAPÍTULO 5: O USO DE MÉTODO DE SEMI-CAMPO PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CLOROTALONIL SOBRE OS FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES .....</b>	<b>153</b>
	RESUMO .....	153
	ABSTRACT.....	154
6.1	INTRODUÇÃO .....	155
6.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	157
6.2.1	Coleta, condução e desmontagem do experimento .....	157
6.2.2	Variáveis avaliadas e análise estatística .....	162
6.2.3	Análise estatística .....	164
6.3	RESULTADOS.....	165
6.4	DISCUSSÃO .....	169
6.5	CONCLUSÃO .....	172
	REFERÊNCIAS .....	173
7	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>177</b>





## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Estudos sobre substâncias adicionadas ao solo e seus efeitos nos organismos terrestres são complexos devido a ampla gama de fatores que se inter-relacionam nesse ecossistema. Atualmente, para realizar a avaliação e quantificação desses efeitos, faz-se uso de metodologias padronizadas e de organismos-chave como bioindicadores. Quando aplicadas, de forma a considerar os efeitos das substâncias nos diferentes níveis de complexidade das relações existentes no solo, essas metodologias compõem o que chamamos de ‘Análise de Risco Ecológico – ARE’.

A ARE compreende um conjunto de métodos de coleta, avaliação, organização e análise de dados ambientais para estimar o risco a que receptores ecológicos (espécies, populações, comunidades) ou ecossistemas estão expostos considerando uma determinada substância (VAN GESTEL, 2012; EFSA, 2017b). É um processo realizado em níveis estruturados, ou *TIERs*. Se uma avaliação preliminar (*lower tier*) indicar potencial risco para determinada substância ou estressor, a avaliação é ampliada (*intermediate e higher tiers*) a fim de determinar o impacto em condições mais realistas do ponto de vista ambiental (FINIZIO; VILLA, 2002; EFSA, 2015, 2017a).

Dois abordagens diferentes são possíveis para uma ARE: a retrospectiva e a prospectiva. A abordagem retrospectiva compreende a avaliação do risco ecológico em ambientes já contaminados e permite estabelecer prioridades para a redução ou remediação dos riscos, além de fornecer subsídios para o gerenciamento desses locais (VAN GESTEL, 2012; EFSA, 2017b). A abordagem prospectiva visa prever impactos futuros do uso de substâncias para os ecossistemas a partir a avaliação dos efeitos tóxicos observados em um número de espécies indicadoras, expostas a diversas concentrações da substância-teste (VAN GESTEL, 2012; NIVA et al., 2016). Essa abordagem tem sido amplamente recomendada para a avaliação do risco de agrotóxicos no solo (EFSA, 2017a, 2017b).

Os subsídios para as tomadas de decisão dentro de uma ARE são fornecidos pela ecotoxicologia, um ramo da toxicologia que estuda os efeitos de substâncias ou estressores sobre os ecossistemas em diferentes níveis de organização biológica. É uma junção de pesquisas sobre o ambiente natural (ecologia) e de pesquisas sobre as interações das substâncias químicas tóxicas com organismos vivos individuais (toxicologia) (CARDOSO; ALVES, 2012; BHAT, 2013). Os organismos mais utilizados em avaliações ecotoxicológicas terrestres, são organismos não-alvo pertencentes a fauna do solo, além de ensaios com germinação de plantas.

Os microrganismos desempenham funções essenciais na manutenção dos ecossistemas e fornecem informações que contribuem efetivamente na interpretação dos efeitos atribuídos às perturbações no solo (BOSSIO et al., 2005), mas até o momento, nenhum grupo-chave de microrganismos foi integrado em esquemas de ARE para organismos do solo. Entretanto, a necessidade de se recomendar os microrganismos como objetivos de proteção nas avaliações do risco de substâncias no solo, com foco em agrotóxicos, já tem sido apontada e discutida (EFSA, 2017a). Para tanto, algumas lacunas ainda precisam ser preenchidas, seja considerando quais seriam os organismos/grupos da microbiota mais adequados para uso nos esquemas de ARE, seja adaptando ou desenvolvendo metodologias aplicáveis, eficientes e padronizáveis capazes de fornecer respostas para os efeitos de substâncias sobre esses organismos, já que protocolos para esses grupo-chave no solo ainda são escassos.

Dentre os diversos grupos de microrganismos do solo, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) constituem um grupo de aproximadamente 333 espécies (AMF PHYLOGENY, 2019) que estabelecem simbiose do tipo mutualista, com a maioria das espécies de plantas. Os FMA pertencem ao Filo Glomeromycota, são simbiontes obrigatórios e só completam seu ciclo de vida quando associados a um hospedeiro. Essa característica permite dividir o ciclo de vida dos FMAs, em duas fases típicas: a fase pré-simbiótica e a simbiótica.

A fase pré-simbiótica consiste da germinação dos esporos, formação do tubo germinativo e da produção/alongamento de um micélio pré-simbiótico (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010; MAIA; SILVA; GOTO, 2010). A germinação pode acontecer mesmo sem a presença de um hospedeiro, utilizando as reservas energéticas próprias dos esporos. No processo de germinação, os esporos inicialmente absorvem água/nutrientes, aumentam de tamanho e passam a sintetizar uma série de compostos necessários para a continuidade do processo (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010; MAIA; SILVA; GOTO, 2010). Sequencialmente, ocorre divisão celular e acúmulo de material onde será formado o tubo germinativo (algumas espécies são capazes de formar vários tubos germinativos), desenvolve-se um micélio inicial de hifas asseptadas, que forma uma rede micelial com extensão variável entre os indivíduos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MAIA; SILVA; GOTO, 2010). Após certo período de crescimento, se não encontra um hospedeiro, esse micélio começa a formar septos na hifa (indicando senescência), o citoplasma recua e seu desenvolvimento cessa (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010; MAIA; SILVA; GOTO, 2010).

A fase simbiótica do ciclo de vida, parte do sucesso da germinação dos esporos (embora a colonização por outras formas de propágulo como fragmentos de raiz colonizado ou hifas extrarradiculares também seja possível), do crescimento do micélio pré-simbiótico e da

“comunicação química” entre simbiote e hospedeiro, que permitem o reconhecimento e promovem alterações no metabolismo de ambos permitindo o início da simbiose (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006; SMITH; READ, 2008; STÜRMER; SIQUEIRA, 2008). As hifas pré-simbióticas crescem em direção a raiz, se modificam formando uma estrutura de infecção chamada apressório, que penetra na epiderme da raiz e a partir daí passam a colonizar o córtex radicular. A colonização pode se dar tanto entre as células corticais quanto intracelularmente. Dentro da célula, entre a parede celular e a membrana plasmática, as hifas podem se diferenciar em arbúsculos (estruturas especializadas nos processos de troca entre os simbioses). Uma vez estabelecida a colonização intrarradicular, as hifas passam a crescer externas a raiz, formando uma rede de micélio extrarradicular, responsável por “explorar” o solo (alcançando ambientes não alcançados pelas raízes), absorvendo nutrientes que são transportados para o micélio intrarradicular e transferidos para o hospedeiro tornando a micorriza funcional (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006; SMITH; READ, 2008; STÜRMER; SIQUEIRA, 2008). Para algumas espécies de FMA, as hifas intrarradiculares podem se diferenciar em estruturas de reserva denominadas vesículas. Uma vez no solo, o micélio extrarradicular, também é responsável pela produção de novos propágulos, diferenciando-se em esporos assexuados. A diferenciação em esporo pode ocorrer nas porções apicais ou intercalares das hifas (nesse caso geralmente formando esporocarpos) (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006). Há o registro ainda de espécies capazes de produzir esporos dentro da raiz (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006; STÜRMER; SIQUEIRA, 2008)

Os FMA atuam como organismos-chave no sistema solo-planta ao contribuir com o crescimento, aporte nutricional e fitossanidade do hospedeiro (VOS et al., 2013; van der HEIJDEN et al., 2015; RAHMAN et al., 2018) e ao estabelecer uma complexa rede de ligação entre raízes dentro de uma comunidade de plantas (RILLIG, 2004; SELOSSE; DUPLESSIS, 2006). Além disso os FMAs estão direta e indiretamente envolvidos na prestação de serviços ambientais como a formação do solo, estabilidade de agregados (PURIN; RILLIG, 2007, RILLIG et al., 2015; DEMENOIS et al., 2018), aumento dos estoques de carbono (JANSA; TRESEDER, 2016; MCGOWAN, 2019), ciclagem de nutrientes (CAVAGNARO et al., 2015) e suporte às cadeias alimentares (ANTUNES; KOYAMA, 2017).

Por serem relevantes para os ecossistemas em que estão inseridos e por apresentarem sensibilidade a presença de poluentes no solo (TWANABASU; STEVENS; VENABLES, 2013), os FMA figuram como grupo-chave importante para avaliar o risco ecológico e periculosidade de substâncias adicionadas ao solo. Essa relevância tem despertado o interesse de agências regulatórias como a EFSA (*European Food Safety Authority* - Autoridade Europeia

para a Segurança Alimentar) que apontou a necessidade de se estabelecer metodologias viáveis e que avaliem o efeito de substâncias sobre as diferentes etapas do ciclo de vida deste grupo de fungos (EFSA, 2017b).

Em âmbito nacional, não existe nenhum protocolo de análise que norteie a avaliação da sensibilidade dos FMAs aos agrotóxicos. Na Europa, uma metodologia padronizada envolvendo esses organismos (Protocolo ISO 10832:2009) foi proposta para avaliação do efeito de metais pesados na fase pré-simbiótica do fungo *Funneliformis mosseae*, entretanto, este protocolo nunca foi testado amplamente nem existem publicações avaliando sua eficiência para outras substâncias. Mais recentemente, este método foi adaptado para uso na avaliação do efeito de agrotóxicos na germinação de esporos dos FMAs *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus* (fase pré-simbiótica do seu ciclo de vida) (MALLMANN, 2016; MALLMANN et al., 2018) e propondo o ácido bórico como substância de referência (MALLMANN et al., 2018), sugerindo, portanto, novas espécies e validando o método para estudos com agrotóxicos.

Estas adaptações, entretanto, não investigaram aspectos referentes à estabilidade da resposta das espécies propostas ao longo de gerações dos indivíduos e nem da variabilidade intraespecífica dessa resposta. Investigar essas questões, é relevante pois a existência de variabilidade genética intraespecífica é natural para esse grupo de fungos do solo e pode implicar em respostas distintas à uma mesma substância adicionada ao solo, por parte de organismos que compartilham o mesmo táxon.

A existência de variabilidade genética dos FMA pode interferir em aspectos referentes a eficiência simbiótica do isolado, pode influenciar na sua adaptação e/ou desenvolvimento de tolerância a fatores abióticos no meio como temperatura, pH, estresses hídricos, concentrações de nutrientes e presença de metais no solo (SIQUEIRA; SAFIR; NAIR, 1991; ALLEN et al., 1995; BURLEIGH; CAVAGNARO; JAKOBSEN, 2002; MUNKVOLD et al., 2004; SMITH; SMITH; JAKOBSEN, 2004; ANGELARD et al., 2010; EHINGER, et al., 2012; JOHNSON et al., 2012; LEE et al., 2013, LENOIR; FONTAINE; SAHRAOUI, 2016). Pouco se sabe, entretanto, sobre como a variabilidade genética natural dos FMA, influencia na sua resposta à presença de agrotóxicos no solo.

Os mecanismos pelos quais os FMA apresentam variabilidade genética ainda não são completamente esclarecidos, mas algumas explicações estão relacionadas ao caráter multinucleado dos esporos e hifas desses organismos. As hifas desses fungos não possuem nenhuma divisão separando material citoplasmático (hifas cenocíticas) e contêm inúmeros núcleos coexistindo numa massa citoplasmática comum. No momento de diferenciação para produzir novos esporos, a hifa "empacota" centenas, de núcleos em um esporo, dependendo da

espécie (VIERA; GLENN, 1990; HOSNY; GIANINAZZI-PEARSON; DULIEU, 1998). Alguns pesquisadores defendem que esses núcleos são geneticamente uniformes e que cada núcleo contém toda a variação de rDNA presente em um esporo (teoria da homocariose) (PAWLOWSKA; TAYLOR, 2004), outros que os núcleos contém diferentes informações genéticas (teoria da heterocariose) (HIJRI; SANDERS, 2005; MARLEAU et al., 2011; NOVAIS et al., 2017). Há ainda uma terceira via, onde núcleos homocariontes e heterocariontes estão presentes em um mesmo esporo, configurando o que os autores sugeriram chamar de "Dicariose" (MASCLAUX et al., 2019)

É fato que a existência de esporos e citoplasmas multinucleados, ligada à possibilidade de hifas de diferentes indivíduos realizarem anastomose contribuem para a existência de variabilidade genética natural dos FMAs (NOVAIS et al., 2017). Estudos evidenciam que a variabilidade genética entre isolados de FMAs, pode existir entre as espécies ao longo de gerações de uma linhagem. Nesse caso, ficou demonstrado que os descendentes de uma linhagem podem ser geneticamente diferentes e expressar fenótipos distintos (ANGELARD et al., 2010; EHINGER, et al., 2012).

Hipóteses incluindo variações a nível de genes ribossomais e às características ambientais de origem dos FMA também foram elaboradas (EHINGER et al, 2012; ANTUNES et al., 2011; JOHNSON et al., 2012; LEE et al., 2013). Para esse último caso, sugere-se que os FMAs podem desenvolver processos de adaptação ao local de origem, adaptando-se a características particulares dos solos, formando o que se denominou de ecótipos (HESLOP-HARRISON; 1964; GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010).

Para um grupo de organismos com distribuição ubíqua como os FMAs a adaptação para a sobrevivência em condições ambientais diversas, advém de os organismos possuírem uma grande plasticidade fisiológica e/ou adaptabilidade genética (HESLOP-HARRISON, 1964). O fato de que as espécies e isolados de FMA podem reagir de modo distinto, dependendo da sua carga genética, das características do hospedeiro e das particularidades de cada interação precisam ser considerados quando se avalia esse grupo de organismos.

No que tange a simbiose micorrízica, o impacto de uma determinada substância pode se dar também sobre os eventos que envolvem essa fase do ciclo de vida dos FMA (etapa imprescindível para o ciclo de vida, já que esses fungos são organismos simbiotes obrigatórios) e estas, também precisam ser investigadas (HAGE-AHMED, ROSNER & STEINKELLN, 2019). Atualmente não existem protocolos padronizados para a avaliação do risco dos agrotóxicos nessa fase do ciclo de vida desses fungos. Enquanto no protocolo da fase pré-simbiótica pode-se avaliar os efeitos sobre a capacidade destes fungos germinarem,

protocolos que envolvam a fase simbiótica permitirão avaliar os efeitos dos agrotóxicos sobre outros eventos inerentes ao ciclo de vida do fungo, como a capacidade de colonizar as raízes, emitir micélio extrarradicular e de formar novos propágulos no solo. São essas, as etapas do ciclo de vida dos FMA que estão diretamente associadas à prestação dos serviços ambientais aos quais os esses fungos estão relacionados.

Em suma, a avaliação do risco sobre os FMAS carece de metodologias seguras, sensíveis e empregáveis em baterias de testes, que contemplem aspectos relevantes das várias etapas do seu ciclo de vida e abordagens que permitam incluir esses métodos nos diferentes níveis de complexidade dos esquemas de análise de risco ecológico de substâncias para o solo. Neste sentido, pretende-se contribuir com o presente trabalho para o desenvolvimento de protocolos ecotoxicológicos padronizados para avaliação dos efeitos de agrotóxicos nas fases pré-simbiótica e simbiótica de espécies de FMAs.

## 1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é contribuir para o uso dos fungos micorrízicos arbusculares na análise de risco ecológico de agrotóxicos no solo e para tanto ampliar o conjunto de informações sobre protocolos ecotoxicológicos já existentes para a fase pré-simbiótica e desenvolver e validar método de avaliação ecotoxicológica para a fase simbiótica do ciclo de vida destes fungos.

As seguintes questões específicas serão verificadas neste estudo referente ao protocolo de ensaio "*lower tier*" que foi adaptado, validado e recomendado para avaliação do risco de agrotóxicos por Mallmann et al. (2018) para a fase pré-simbiótica (germinação de esporos de FMAs):

1. Avaliar a existência de estabilidade da resposta de três gerações dos isolados inicialmente recomendados por Mallmann et al (2018) (*Gigaspora albida* SCT200A e *Rhizophagus clarus* RJN102A) quanto a germinação dos seus esporos é testada para fungicidas usados em larga escala na agricultura (Clorotalonil, Mancozebe e Metalaxil) e substância de referência (ácido bórico);
2. Avaliar a estabilidade da germinação de esporos de *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus* ao longo de 5 anos de estocagem;
3. Verificar a existência de variabilidade intraespecífica da resposta de isolados com diferentes procedências geográficas das espécies recomendadas (*Gigaspora albida* e *Rhizophagus*

*clarus*), quando a germinação dos seus esporos é testada para fungicidas (Clorotalonil, Mancozebe e Metalaxil) e substância de referência (ácido bórico);

4. Avaliar a resposta da espécie *Funneliformis mosseae* (espécie referência do Protocolo 10832:2009) quando testada com o fungicida Clorotalonil, e a substância de referência.

As seguintes questões específicas serão estudadas com intuito de estabelecer e validar um protocolo ecotoxicológico padronizado para avaliar o efeito de fungicidas sobre características da fase simbiótica nas espécies *G. albida* e *R. clarus*, recomendadas inicialmente para a fase pré-simbiótica por Mallmann et al. (2018).

5. Verificar a possibilidade de uso do sistema cultivo *in vitro* de FMAs em raízes modificadas (BECARD; FORTIN, 1988) de chicória (*Cichorium intybus* L.) no estabelecimento de protocolo *lower tier* de avaliação dos efeitos do fungicidas na fase simbiótica;
6. Avaliar a eficiência de um método de inoculação de esporos de *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus* em plantas hospedeiras no estabelecimento de um protocolo *lower tier* padronizado *in vivo* para testar os efeitos tóxicos de fungicidas sobre características da fase simbiótica dessas espécies;
7. Em cada método, seja *in vitro* ou *in vivo*, determinar as características mais importantes da fase simbiótica a serem utilizadas em um protocolo padronizado;
8. Avaliar, em condições de semi-campo (em experimento de mesocosmos do tipo *Terrestrial Model Ecosystems* - TME) os efeitos do fungicida Clorotalonil sobre características importantes da fase simbiótica de populações nativas de FMA.

Os dados obtidos neste estudo permitirão, por fim, recomendar e ampliar o uso das espécies *G. albida* e *R. clarus* em protocolos padronizados para avaliação dos efeitos de agrotóxicos nas fases pré-simbióticas e simbióticas dos fungos micorrízicos arbusculares.

## 1.2 HIPÓTESES

Neste trabalho, as seguintes hipóteses foram testadas:

1. Mantidas as condições padrão de condução dos ensaios (MALLMANN et al., 2018) as espécies de FMA *G. albida* e *R. clarus* apresentam o mesmo comportamento de resposta, para as mesmas substâncias, ao longo de três gerações de cultivo em laboratório;
2. Mantidas as condições padrão de condução dos ensaios (MALLMANN et al., 2018), cinco isolados da mesma espécie de FMA (*G. albida* e *R. clarus*), apresentam o mesmo comportamento de resposta aos agrotóxicos e substância de referência, independente da variabilidade intraespecífica natural nestes fungos;



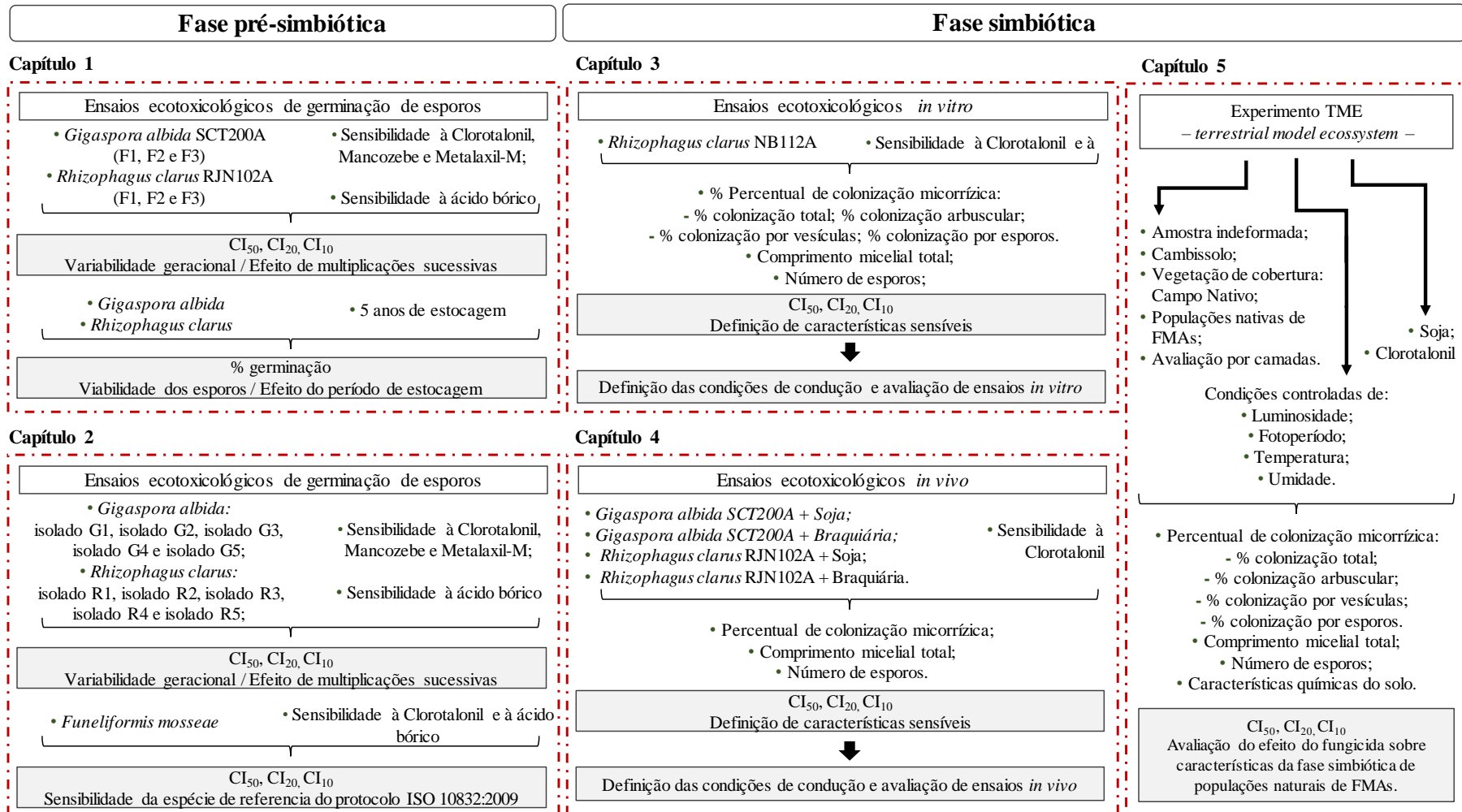
3. Características da fase simbiótica dos fungos testados, tanto em sistemas *in vitro* como *in vivo*, são afetadas pela presença de fungicidas no substrato dependendo da concentração de exposição e são possíveis de uso como indicadores do efeito de substâncias em testes ecotoxicológicos para a fase simbiótica dos FMAs;
4. Aspectos relacionados à colonização da raiz e o crescimento de hifas extrarradiculares constituem as principais características a serem usadas em protocolos ecotoxicológicos padronizados para a testes de efeitos na fase simbiótica;
5. O fungicida Clorotalonil, avaliado em condições de semi-campo (em experimento de mesocosmos do tipo “Terrestrial Model Ecosystems”) causa efeito sobre características da fase simbiótica de populações nativas de FMA e esses resultados ratificam as características avaliadas e resultados obtidos nos protocolos estabelecidos para fase pré-simbiótica e simbiótica.

### 1.3 ESTRUTURA DA TESE

Esta tese apresenta os experimentos desenvolvidos ao longo do doutoramento, seus resultados, discussões gerais e conclusões. O Capítulo I apresenta os ensaios envolvendo a avaliação da existência de estabilidade geracional da resposta de *Gigaspora albida* *Rhizophagus clarus* a fungicidas (Clorotalonil, Mancozebe e Metalaxil) e à uma substância de referência (ácido bórico), com ensaios de verificação da estabilidade da germinação de esporos dessas duas espécies ao longo de 5 anos de estocagem. O Capítulos 2 apresenta os ensaios da avaliação da existência de variabilidade intraespecífica da resposta de isolados de *G. albida* e *R. clarus* com diferentes procedências geográficas, testados para os fungicidas (Clorotalonil, Mancozebe e Metalaxil) e para a substância de referência. Adicionalmente é avaliada a resposta da espécie *Funneliformis mosseae* (espécie referência do Protocolo 10832:2009) ao fungicida Clorotalonil e a substância de referência. Os Capítulos 3 e 4 apresentam, propostas de metodologias que permitem avaliar os efeitos de agrotóxicos sobre características da fase simbiótica de *G. albida* e *R. clarus*, em sistemas *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Por fim, o Capítulo 5 apresenta os resultados do experimento em condições de semi-campo, em mesocosmos do tipo TME, para avaliação dos efeitos do fungicida Clorotalonil sobre aspectos da simbiose micorrízica de populações nativas de FMAs de um Cambissolo Húmico do Sul do Brasil.

O Quadro 1 apresenta um esquema conceitual idealizado de acordo com os objetivos estabelecidos para o estudo.

Quadro 1 - Esquema conceitual da tese.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, E. B. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. **Plant Soil**, v. 170, p. 47-62, 1995. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02183054>

AMF PHYLOGENY. Phylogeny and taxonomy of Glomeromycota ('arbuscular mycorrhizal [AM] and related fungi'), 2019. **Glomeromycota SPECIES LIST**. Disponível em: [http://www.amf-phylogeny.com/amphylo\\_species.html](http://www.amf-phylogeny.com/amphylo_species.html). Acesso em: 20 jan. 2020.

ANGELARD, C et al. Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription. **Curr Biol.**, v. 20, p. 1216–21, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.031>

ANTUNES, P. M.; KOYAMA, A. Mycorrhizas as nutrient and energy pumps of soil food webs: multitrophic interactions and feedbacks. In: JOHNSON, N.C.; GEHRING, C.; JANSA, J. (eds) **Mycorrhizal Mediation of Soil**, Elsevier Inc, Amsterdam, p. 149–173, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804312-7.00009-7>

BECARD, G; FORTIN, J. A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.*, v. 108, p. 211–218, 1988. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb03698.x>

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.

BHAT, S. Ecotoxicology & Impact on Biodiversity. **J Pharmacog Phytochem.**, v. 2, n. 2, p. 1 - 19, 2013. ISSN 2278- 4136, IC Journal nº 8192. Disponível em: <http://www.phytojournal.com/archives/?year=2013&vol=2&issue=2&ArticleId=136>

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. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0209-6>

BURLEIGH, S. H.; CAVAGNARO, T.; JAKOBSEN, I. Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. **J. Exp. Bot.**, v. 53, p. 1593-1601, 2002. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/erf013>

CAVAGNARO, T.R.; BENDER, S.F.; ASGHARI, H.R.; van der HEIJDE, M.G.A. The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. **Trends Plant Sci.**, v. 20, p. 283–290, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.004>

DECLERK, S; STRULLU, D. G; FORTIN, J. A (Eds.). **In Vitro Culture of Mycorrhizas**. Springer: Verlag Berlin Heidelberg, 2005.

DEMENOIS, J. et al. Impact of plant root functional traits and associated mycorrhizas on the aggregate stability of a tropical Ferralsol. **Geoderma.**, v. 312, p. 6–16, 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.09.033>

EHINGER, M.O. et al. Significant genetic and phenotypic changes arising from clonal growth of a single spore of an arbuscular mycorrhizal fungus over multiple generations. **New Phytologist**, v. 196, p. 853-861, 2012. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04278.x>

EFSA - European Food Safety Authority. Guidance Document for predicting environmental concentrations of active substances of plant protection products and transformation products of these active substances in soil. *EFSA Journal*. Pp. 115, 2017a. doi: <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4982>

EFSA - European Food Safety Authority. PPR Panel (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues), OCKLEFORD, C. et al. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. **EFSA J.**, pp 225, 2017b. doi: <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4690>

FINIZIO, A.; VILLA S. Environmental risk assessment for pesticides: A tool for decision making. **Environ. Impact Assess. Rev.**, v. 22, p. 235–248, 2002. doi: [https://doi.org/10.1016/S0195-9255\(02\)00002-1](https://doi.org/10.1016/S0195-9255(02)00002-1)

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.

HAGE-AHMED, K.; ROSNER, K.; STEINKELN, S. Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. **Pest Management Sci.**, v. 75, p. 583-590, 2019. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.5220>

HESLOP-HARRISON, J. Forty Years of Genecology. **Adv. Ecol. Res.**, v. 2, p. 159–247, 1964. doi: [https://doi.org/10.1016/s0065-2504\(08\)60332-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2504(08)60332-3)

HIJRI, M.; SANDERS, I.R. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. **Nature**, v. 33, p. 160-163, 2005. doi: <https://doi.org/10.1038/nature03069>

HOSNY, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; DULIEU, H. Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. **Genome**, v. 41, n. 3, p. 422–428, 2020. doi: <https://10.1139/g98-038>

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

JANSA, J.; TRESEDER, K.K. Mycorrhizas and the carbon cycle. In: JOHNSON, N. C.; GEHRING, C.; JANSA, J. (eds) **Mycorrhizal mediation of soil**. Elsevier Inc, Amsterdam, p. 343–355, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804312-7.00019-X>

JOHNSON, D. et al. The importance of individuals: intraspecific diversity of mycorrhizal plants and fungi in ecosystems. *New Phytologist*, v. 194, p. 614–628, 2012. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04087.x>

LEE, E.H. et al. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Roles in Ecosystems. **Mycobiology**, v. 41, p. 121-125, 2013. doi: <https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.3.121>

LENOIR, I.; FONTAINE, J.; SAHRAOUI, A.L.H. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: a review. **Phytochemistry**, v. 123, p. 4–15. 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.002>

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.

MALLMANN, G.C. **Efeito de poluentes sobre fungos micorrízicos arbusculares: proposta de adaptação e ampliação de uso do protocolo ISO/TS 10832:2009**. 2016. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) — Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2016.

MALLMANN, G.C. et al. Placing arbuscular mycorrhizal fungi on the risk assessment test battery of plant protection products (PPPs). **Ecotoxicology**, v. 27, p. 809–818, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1946-0>

- MASCLAUX, F. G. et al. (2019). Investigating unexplained genetic variation and its expression in the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*: A comparison of whole genome and RAD sequencing data. **PLOS ONE**, v.14, p. 1-20, 2019. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226497>
- MARLEAU, J. et al. Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi. **BMC Evol Biol.**, v. 51, p. 1-11, 2011. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-5113>
- MCGOWAN, A. R. et al. Soil Organic Carbon, Aggregation, and Microbial Community Structure in Annual and Perennial Biofuel Crops. **Agron. J.**, v. 111, p. 128-142, 2019. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj2018.04.0284>
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. Ed. Lavras: UFLA, 2006.
- NOVAIS, C. B. et al. Compatibility and incompatibility in hyphal anastomosis of arbuscular mycorrhizal fungi. **Sci. agric.**, v. 74, n. 5, p. 411-416, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0243>.
- PAWLOWSKA, T. E.; TAYLOR, J. W. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, v. 427, p. 733–737, 2004. doi: <https://doi.org/10.1038/nature02290>
- PURIN, S.; RILLIG, M. C. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. **Pedobiologia**, v. 51, p. 123–130, 2007. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2007.03.002>
- RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. **Ecology Letters**. v. 78, p.740 – 754, 2004. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00620.x>
- RILLIG, M. C et al. Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. **New Phytol.**, v. 205, p. 1385–1388, 2015. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.13045>
- SELOSSE, M.A.; DUPLESSIS, S. More complexity in the mycorrhizal world. **New Phytol.** 172: 600–604, 2006. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01929.x>
- SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. VA-mycorrhizae and mycorrhiza stimulating isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. **Plant Soil**, v. 134, p. 233–242, 1991. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00012041>

SMITH, S. E.; SMITH, F. A.; JAKOBSEN, I. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth and total P uptake. **New Phytol.**, 162:511-24, 2004. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01039.x>

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3 ed. New York: Academic Press, 2008.

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.

RAHMAN, S.F.S.A.; SINGH, E.; PIETERSE, C.M.J.; SCHENK, P.M. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. **Plant Sci.**, v. 267, p. 102-111, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>

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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.036>

VAN DER HEIJDEN, M.G. A. et al. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. **New Phytol.** v. 205, p. 1406 – 1423, 2015. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.13288>

VAN GESTEL, C. A. M. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. **ZooKeys**, v. 176, p. 275–296, 2012. doi: <https://doi.org/10.3897/zookeys.176.2275>

VIERA, A.; GLENN, M. G. DNA content of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungal spores. **Mycologia**, v. 82, n. 2, p. 263–267, 1990. doi: <https://doi.org/10.2307/3759857>

VOS, C. et al. Mycorrhiza-induced resistance against the rootknot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. **Soil Biol Biochem.**, v. 60, p. 45–54, 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soil.bio.2013.01.013>

## 2 CAPÍTULO 1: MANUTENÇÃO DA RESPOSTA DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Gigaspora albida* E *Rhizophagus clarus* A FUNGICIDAS AO LONGO DE TRÊS GERAÇÕES DE CULTIVO

### RESUMO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são organismos obrigatoriamente simbiotes, cujo modo de reprodução não apresenta uma fase sexuada convencional, mas, que apresentam alta variabilidade genotípica e fenotípica. Este estudo propôs-se a avaliar a existência de estabilidade da resposta da germinação em três gerações de isolados das espécies *Gigaspora albida* SCT200A e *Rhizophagus clarus* RJN102A, para os fungicidas Clorotalonil, Mancozebe e Metalaxil-M (nas concentrações de 0, 10, 25, 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup>) e a ácido bórico (0, 100, 250, 500, 750 e 1000 mg kg<sup>-1</sup>), além de avaliar a estabilidade da germinação de esporos dessas espécies ao longo de 5 anos de estocagem. Os resultados apontaram para concentrações de efeito não observado (CENO)  $\leq 10$  mg kg<sup>-1</sup> para as três gerações de *G. albida* e de *R. clarus* em todos os fungicidas testados. Para o ácido bórico, a CENO variou entre  $< 100$  mg kg<sup>-1</sup> e 250 mg kg<sup>-1</sup> entre as duas espécies. Os valores de concentração de inibição (CI) determinados para cada espécie e geração (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>), apontaram para a ausência da estabilidade da sua resposta de germinação em todas as substâncias testadas, mesmo utilizando-se de método padrão de condução dos ensaios. Como complemento aos resultados de CI<sub>10</sub> estabelecidos, para cada espécie, geração e fungicida foram comparados com o valor estimado da Concentração Ambiental Prevista inicial das formulações testadas (originalmente *Predicted Environmental Concentration* – PEC<sub>inicial</sub>) para Clorotalonil (1,98 mg kg<sup>-1</sup>), Mancozebe (3 mg kg<sup>-1</sup>) e Metalaxil – M (0,16 mg kg<sup>-1</sup>) e foi possível apontar que o Clorotalonil oferece potencial risco para a germinação da geração F1 de *G. albida* e o Mancozebe para as gerações F1 e F2 das duas espécies. No que tange a viabilidade dos esporos das espécies testadas, os resultados apontaram tempos diferentes de viabilidade dos esporos. Os esporos de *G. albida* podem permanecer estocados por até 5 anos sem perder viabilidade de germinação, enquanto, para *R. clarus* o tempo de estocagem para manter essa característica diminui para 2 anos.

**Palavras-chave:** Fase pré-simbiótica. *Gigaspora*. *Rhizophagus*. Variabilidade genética. Estocagem de esporos.



## 2 CHAPTER 1: MAINTENANCE OF SPORE GERMINATION RESPONSE OF *Gigaspora albida* AND *Rhizophagus clarus* TO FUNGICIDES IN THREE CULTIVATE GENERATIONS

### ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMFs) are necessarily symbiotic organisms, whose mode of reproduction does not have a conventional sexual phase, but which have high genotypic and phenotypic variability. This study aimed to evaluate the existence of stability of germination response in three generations of *Gigaspora albida* SCT200A and *Rhizophagus clarus* RJN102A species isolates, for the fungicides Chlorothalonil, Mancozeb and Metalaxyl-M (in concentrations of 0, 10, 25, 50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>) and boric acid (0, 100, 250, 500, 750 and 1000 mg kg<sup>-1</sup>) and in addition, to assessing the stability of spore germination of these species over 5 years of storage. The results indicated that the no observed effects concentration (NOEC) is ≤ 10 mg kg<sup>-1</sup> for three generations of *G. albida* and *R. clarus*. For boric acid, NOEC varied between <100 mg kg<sup>-1</sup> and 250 mg kg<sup>-1</sup> for both species. The inhibition concentration values (IC) determined for each species and generation (IC<sub>50</sub>, IC<sub>20</sub> e IC<sub>10</sub>), showed the absence of stability of their germination response in all tested substances, even using the standard method of conduction of the tests. The IC<sub>10</sub> results established for each species, generation and fungicide were compared with the Predicted Environmental Concentration – PEC<sub>initial</sub> to Chlorothalonil (1,98 mg kg<sup>-1</sup>), Mancozeb (3 mg kg<sup>-1</sup>) and Metalaxyl-M (0,16 mg kg<sup>-1</sup>) and it was possible to point out that Chlorothalonil offers potential risk for the germination of the F1 generation of *G. albida* and Mancozebe for the F1 and F2 research of the two species. Regarding the viability of the spores of two tested species, the results showed different times for their spore viability. The spores of *G. albida* can remain stored for 5 years without losing germination viability, while for *R. clarus* the storage time to maintain this characteristic decrease to 2 years.

**Palavras-chave:** Pre-symbiotic phase. *Gigaspora*. *Rhizophagus*. Genetic variability. Spore storage

## 2.1 INTRODUÇÃO

Pertencentes ao Filo Glomeromycota, os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) estabelecem uma das simbioses mais antigas e importantes da natureza (SMITH; READ, 2008; DELAUX et al., 2015). Diferentemente dos demais grupos de fungos formadores de micorrizas os FMA não possuem uma etapa saprofítica e são completamente dependentes da planta e seus fotoassimilados para completar o seu ciclo de vida.

Determinadas etapas do desenvolvimento dos fungos micorrízicos arbusculares FMA, são necessárias para que a simbiose micorrízica se estabeleça e garanta a continuidade dos fungos nos ecossistemas em que estão inseridos (HAGE-AHMED; ROSNER; STEINKELLN, 2019). A fase pré-simbiótica compreende uma das etapas do ciclo de vida desses organismos e inclui eventos da germinação dos esporos (p.ex., alongamento do tubo germinativo e ramificação de hifas infectivas) e de contato com o hospedeiro.

Os esporos dos FMA são denominados glomerosporos, constituem a sua principal via de propagação e estão entre os de maior tamanho do Reino Fungi (22 a 1050  $\mu\text{m}$ ) (GOTO; MAIA, 2006; SOUZA et al., 2010). Sua formação ocorre a partir da diferenciação das hifas fúngicas e se dá de forma distinta dentro dos táxons de Glomeromycota. São apontados quatro modos distintos de formação de glomerosporos: (1) glomoide – formação do glomerosporo na porção terminal de uma hifa não especializada, comum no gênero *Glomus*, mas encontrado também em *Claroideoglomus*, *Diversispora*, *Dominikia*, *Funneliformis*, *Kamienskia*, *Pacispora*, *Paraglomus*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis* e *Septoglosum*; (2) acaulosporoide/entrophosporoide – glomerosporos são formados lateralmente (no pescoço) ou dentro do pescoço de um sáculo esporífero, formado terminalmente em uma hifa, o que deixa uma (ou duas cicatrizes na superfície do esporo, foi relatado para os gêneros *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Entrophospora*, *Otophora*, *Paleospora*, *Sacullospora* e *Tricispora*; (3) gigasporoide – os esporos são formados terminalmente numa hifa bulbo esporógena nos gêneros *Gigaspora*, *Bulbospora*, *Cetraspora*, *Dentiscutata*, *Intraornatospora*, *Paradentiscutata*, *Racocetra* e *Scutellospora*; (4) ambisporoides – esporos formados na extremidade de uma ramificação (pedicelo) originada lateralmente no pescoço de um sáculo esporífero, ocorre em espécies de *Ambispora* (STÜRMER; MORTON, 1999; STÜRMER; SIQUEIRA, 2008; MAIA; SILVA; GOTO, 2010; KAONONGBUA; MORTON; BEVER, 2010; REDECKER et al., 2013; AMF PHYLOGENY, 2019).

Por estarem presentes nos ecossistemas agrícolas, os esporos de FMAs estão expostos, assim como outros organismos do solo, à presença de diversas substâncias químicas, incluindo

agrotóxicos utilizados para controle de pragas e doenças. Interferências em certos estágios do desenvolvimento podem provocar efeitos deletérios no estabelecimento da simbiose micorrízica e permanência destes fungos nos ecossistemas (HAGE-AHMED; ROSNER; STEINKELN, 2019; NOVAIS et al., 2019) e por isso é importante que a magnitude do efeito dos agrotóxicos nos estágios prévios da simbiose seja investigada.

Atualmente, a ecotoxicologia oferece ferramentas que permitem investigar a magnitude do efeito de um determinado agrotóxico sobre organismos do solo. Recentemente, Mallmann et al (2018) propuseram um protocolo modificado e validado para avaliar o efeito de fungicidas sobre a germinação de esporos de FMAs. A modificação do protocolo ISO 10832:2009 para testes com agrotóxicos mostrou-se eficiente em apontar dentro de um conjunto de espécies de FMAs, representativas de solos subtropicais, que *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus* apresentam potencial para uso em testes ecotoxicológicos.

Dando continuidade aos estudo sobre a uso destas espécies de FMAs em protocolos ecotoxicológicos, um aspecto importante sobre os FMA diz respeito ao tipo de reprodução e suas implicações no que tange a variações genética ao longo de gerações. Os FMAs são organismos obrigatoriamente simbiotes, cujo modo de reprodução não apresenta uma fase sexuada convencional. Além disso, eles produzem hifas cenocíticas, que contêm muitos núcleos numa massa citoplasmática comum. Quando há a diferenciação da hifa para a produção de novos esporos, ela empacota centenas, às vezes milhares, de núcleos em um esporo (HOSNY; GIANINAZZI-PEARSON; DULIEU, 1998. Essa característica, ligada à possibilidade de hifas de diferentes organismos realizarem anastomose (capacidade de fundirem-se e nessa fusão trocarem material genético) contribuem para a existência de variabilidade genética em FMAs ao longo de gerações de cultivos (NOVAIS et al., 2017). As pesquisas indicam, inclusive, que esporos 'filhos' de uma linhagem monospórica podem ser geneticamente diferentes e, em consequência, expressar fenótipos distintos (ANGELARD et al., 2010; EHINGER, et al., 2012). Tal variabilidade ao longo de gerações de cultivo poderia afetar a sensibilidade das espécies em termos de resposta a agrotóxicos em ensaios ecotoxicológicos? Esta é uma questão importante a ser respondida, especialmente para as espécies recomendadas por Mallmann et al. (2018), *G. albida* e *R. clarus*.

Outro aspecto importante relacionado a eficiência do teste de germinação de esporos proposto como ensaio para avaliar efeitos sobre a fase pré-simbiótica diz respeito aos efeitos que o tempo de estocagem dos cultivos de *G. albida* e *R. clarus* pode causar à estabilidade da resposta dos seus esporos. Daniels (1978) levantou questionamento sobre a viabilidade dos esporos de *F. mosseae* e testou a sua germinação em esporos de até 1 ano de idade e não

encontrou diferenças no percentual de germinação. O efeito da estocagem de *Glomus clarum* (atual *R. clarus*), também não provocou diferenças na germinação de esporos estocados por 6 meses (LOUIS; LIM, 1988). Mais recentemente, Crossay et al. (2017) utilizaram esporos de *Claroideoglomus etunicatum* estocados por até três anos para verificar a estabilidade de marcadores genéticos e não encontraram diferenças no padrão espectral desses organismos. Para esse estudo, obter essas informações neste sentido torna-se relevante, uma vez que, a recomendação do Protocolo ISO10832:2009 é a de utilizar-se esporos com menos de 5 meses de idade.

Neste capítulo, propôs-se avaliar a existência de estabilidade da resposta de três gerações de isolados das espécies *G. albida* e *R. clarus*, recomendados por Mallmann et al. (2018), testadas com três fungicidas usados em larga escala na agricultura (Clorotalonil, Mancozebe e Metalaxil) e à substância de referência (ácido bórico) e em adição, avaliar a estabilidade da germinação de esporos dessas espécies ao longo de 5 anos de estocagem.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir são descritos dois grupos de experimentos realizados, utilizando o protocolo ecotoxicológico proposto por Mallmann et al. (2018). Estes experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ecologia do Solo, da Universidade do Estado de Santa Catarina e se referem aos efeitos de fungicidas e da substância de referência na fase pré-simbiótica do ciclo de vida dos FMAs.

### 2.2.1 Metodologia comum aos dois grupos de experimentos

#### 2.2.1.1 Substrato

Usou-se como substrato o Solo Artificial Tropical – SAT (GARCIA et al., 2004), sem contaminação, composto por 75% de areia fina, 20% de argila branca (caulim), 5% de fibra de coco triturada (OECD, 2016; Niemeyer, 2018) e pH ajustado para 6,0 ( $\pm 0,5$ ) com carbonato de cálcio. O SAT utilizado foi previamente preparado e sua umidade ajustada em função da sua capacidade de retenção de água (CRA) (ISO, 2012) para 50 % da CRA. A Tabela 1 apresenta características químicas e físicas do SAT.

Tabela 1 – Características químicas e físicas do Solo Artificial Tropical – SAT utilizado nos ensaios da fase pré-simbiótica.

Características	Valores
pH (água)	6,08
pH SMP	6,81
CTC efetiva (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	5,58
Matéria Orgânica (mg dm <sup>-3</sup> )	5,9
Ca (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,69
Mg (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,52
K (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	262
P (mg dm <sup>-3</sup> )	17,6
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	0,8
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	0,7
Teor de Argila (%)	23

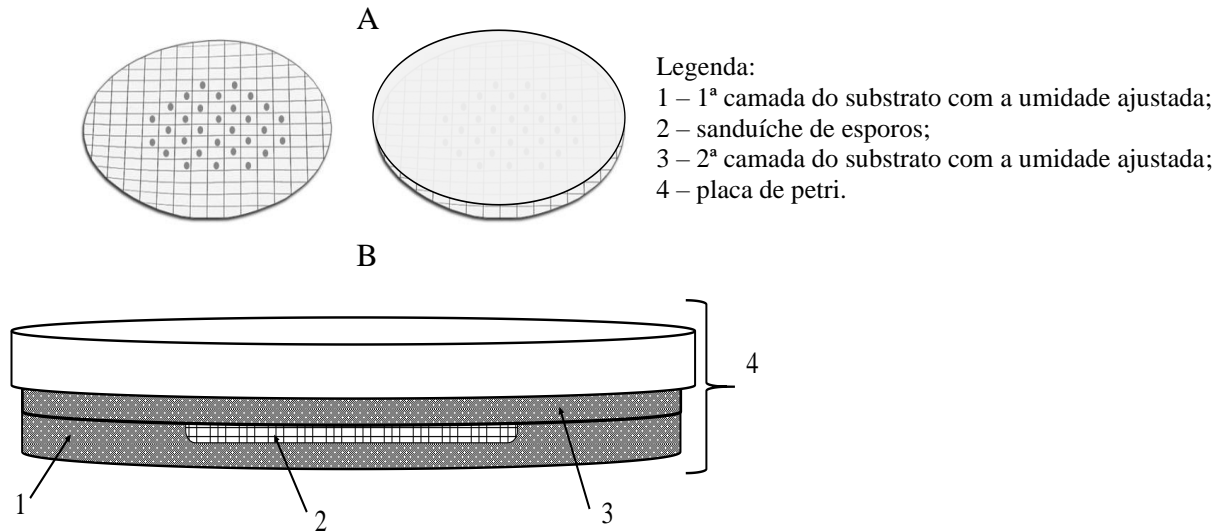
Fonte: Laboratório de Análise de Solos – LAS, UDESC/CAV, 2018.

### 2.2.1.2 Montagem e avaliação das unidades experimentais

Para cada isolado testado, os esporos utilizados foram extraídos do solo-inóculo através do 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 ou esmagados foram eliminados) e depositados sobre papel toalha. Dali, com o auxílio de pinça, os esporos foram transferidos para membranas de nitrato de celulose (diâmetro 47 mm, porosidade de 0,45 µm, brancas, quadriculadas), previamente umedificadas com água destilada e 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”. Depois de montado, o “sanduíche de esporos” era então transferido para placas de Petri, 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). Cada concentração de substância testada era constituída de 6 repetições, totalizando 180 esporos por concentração.

Cada uma das UEs recebeu uma primeira camada (cerca de 40 g) do substrato sobre a qual era depositado o sanduíche de esporos, posteriormente coberto com uma segunda camada (cerca de 40 g) do mesmo substrato. As UEs foram seladas com filme de plástico, tomando-se o cuidado para obter total vedação e incubadas em câmaras de germinação tipo D.B.O (demanda biológica de oxigênio), com temperatura de controlada de 28 °C (± 2 °C) (MALLMANN et al., 2018), em ausência de luminosidade, por 14 dias.

Figura 1 - Design das unidades experimentais (UE). Distribuição dos esporos nos quadrantes da membrana e formação do "sanduíche de esporos" (A) e montagem das unidades experimentais nos ensaios de germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (B).



Fonte: MALLMANN et al., 2018.

Após o período de incubação as UEs foram desmontadas e os sanduíches contendo os esporos retirados das placas. Após abertos os sanduíches, os esporos foram avaliados individualmente, quanto a sua germinação, em microscópio estereoscópico e os dados anotados. Os dados foram considerados válidos quando: (1) no final do ensaio o número médio de esporos recuperados (encontrados no fim do ensaio) fosse igual ou maior a 25; (2) no final do ensaio, para o tratamento controle o percentual médio de germinação de esporos fosse igual ou maior do que 75 % (MALLMANN et al., 2018). 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.

O número total de esporos recuperados e o número de esporos germinados foram contados para cada espécie, tratamento e réplicas. O percentual de esporos germinados *versus* o número de esporos recuperados foi calculado ( $[x.100/n]$ , onde 'x' é o número de esporos germinados e 'n' o número de esporos recuperados).

### 2.2.2 Grupo de experimentos 1: Manutenção da resposta da germinação de esporos a fungicidas e substância de referência ao longo de três gerações de cultivo

Um conjunto de ensaios foi realizado para avaliar a estabilidade da resposta da germinação de esporos de três gerações de cultivo monoxênico (cultura contendo apenas a o

isolado de FMA de interesse) de *G. albida* e *R. clarus* aos efeitos dos fungicidas Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e à substância de referência.

### 2.2.2.1 Fungicidas testados e substância de referência

Foram testadas as formulações comerciais de três fungicidas amplamente utilizados na agricultura, além da substância de referência recomendada por Mallmann et al. (2018) como segue:

- Clorotalonil: CAS nº 1897-45-6, produto comercial Bravonil Ultrex<sup>®</sup>, comercializado pela Syngenta e que contém 825 g de ingrediente ativo (i. a.) por kg<sup>-1</sup>. Pertencente ao grupo químico das Isoftalonitrilas e possui modo de ação de contato. Classificação do potencial de periculosidade ambiental: II - produto muito perigoso. Classificação toxicológica: 3 - moderadamente tóxico. Recomendação de uso para a batata, cebola e feijão (espécies vegetais com a maior recomendação): 1,8 kg ha<sup>-1</sup>;
- Mancozebe: CAS nº 8018-01-7, produto comercial Unizeb Gold<sup>®</sup>, comercializado pela UPL e que contém 750 g de i. a. por kg<sup>-1</sup>. Pertencente ao grupo químico dos Alquilenobis (ditiocarbamato) e possui modo de ação de contato. Classificação do potencial de periculosidade ambiental: III - produto perigoso. Classificação toxicológica: 1 - produto extremamente tóxico. Recomendação de uso para arroz, algodão e cevada (espécies vegetais com a maior recomendação): 3 kg ha<sup>-1</sup>;
- Metalaxil-M: CAS nº 70630-17-0, produto comercial Ridomil Gold bravo<sup>®</sup>, comercializado pela Syngenta e que contém 40 g i. a. L<sup>-1</sup> em associação com Clorotalonil. Pertencente ao grupo químico dos Acilalaninato (e Carbonitrilas em função da presença de Clorotalonil). Classificação do potencial de periculosidade ambiental: II - produto muito perigoso. Classificação toxicológica: 1 - produto extremamente tóxico. Recomendação de uso para o tomate rasteiro (espécie vegetal com a maior recomendação): 3 L ha<sup>-1</sup>.
- Substância de Referência: o ácido bórico [H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>], CAS nº 10043-35-3, reagente analítico produzido pela Synth, sugerida como substância de referência para ensaios ecotoxicológicos para outros organismos do solo (AMORIM et al., 2012; OCDE, 2016; PRINCZ et al., 2017; NIEMEYER et al., 2018) e para FMAs (MALLMANN et al., 2018). O ácido bórico foi incluído em todas as baterias de ensaios, pois cada espécie e geração compõem "lotes" distintos de organismos-testes.

Para as duas espécies e suas três gerações de cultivo os fungicidas foram testados em quatro concentrações e mais um controle sem aplicação (0; 10; 25; 50; 100 mg i. a. kg<sup>-1</sup> de substrato seco), com seis repetições por tratamento. A substância de referência foi testada em F1 em sete concentrações e mais um controle sem aplicação (0; 75; 150; 300; 450; 600; 900 e 1000 mg i. a. kg<sup>-1</sup> de substrato seco). Para F2 e F3, o número de tratamentos foi reduzido e novas concentrações definidas, passando a ser então, cinco concentrações e mais um controle sem aplicação (0; 100; 250; 500; 750 e 1000 mg i. a. kg<sup>-1</sup> de substrato seco), também com 6 repetições por tratamento. Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento completamente casualizado.

As contaminações foram realizadas sempre no dia da montagem do ensaio. Para cada ensaio, um gradiente com concentrações crescentes das substâncias foi preparado, diluindo-se uma solução estoque da referida substância em água destilada. A quantidade de solução estoque da substância + água destilada adicionada ao substrato em cada concentração foi calculado de forma a atingir a umidade de 50 % da CRA.

#### 2.2.2.2 *Material biológico*

Foram utilizados esporos da espécie *G. albida*, isolado SCT200A e da espécie *R. clarus*, isolado RJN102A, doravante denominados isolado G1 e R1, respectivamente. Neste trabalho, adotar-se-á, ao longo desse e dos capítulos subsequentes, o termo ‘isolado fúngico’ como sinônimo de ‘cultura’ ou ‘linhagem’, englobando um conjunto de descendentes multiesporos de uma determinada espécie de FMA.

As gerações foram obtidas a partir de multiplicação sequencial de esporos realizada no Laboratório de Ecologia do Solo e denominadas da seguinte forma:

- F1: conjunto de esporos utilizados para a obtenção dos primeiros resultados de ensaios ecotoxicológicos com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico; os resultados desses ensaios foram os apresentados por Mallmann et al. (2018). Esporos extraídos dessa mesma cultura, foram utilizados como inóculo para produção de esporos F2;
- F2: conjunto de esporos multiplicados a partir de esporos F1; esporos extraídos dessa cultura, foram utilizados como inóculo para produção de esporos F3;
- F3: conjunto de esporos multiplicados a partir de esporos F2.



### 2.2.2.2.1 Multiplicação dos esporos

Os esporos utilizados ao longo dos procedimentos apresentados neste capítulo e nos Capítulos 2 e 4, foram multiplicados em sala climatizada e com foto período utilizada pelo Laboratório de Ecologia do Solo, UDESC Lages, utilizando a metodologia de Stutz e Morton (1996) de culturas armadilhas.

As culturas armadilhas foram estabelecidas utilizando-se uma mistura de solo (Neossolo) e areia, ambos esterilizados (3 ciclos de autoclavagem de 45 minutos). Depois de estéril, o substrato foi transferido para vasos com capacidade de aproximadamente 5 kg. Sobre o substrato foram depositados cerca de 30 mL de solo-inóculo contendo os esporos de interesse e sobre este, foram colocados 10 mL de sementes (aproximadamente 400 sementes) de *Brachiaria brizantha*, que passaram pelo processo de desinfecção superficial em hipoclorito de sódio 1 % por 5 minutos (Figura 2A).

Figura 2 - Montagem (A), manutenção (B) e secagem (C) dos vasos de multiplicação de fungos micorrízicos arbusculares.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Sobre o solo-inóculo e as sementes, depositou-se uma nova camada, pouco espessa (entre 2 e 3 cm), de substrato e sobre esta, uma camada de areia estéril (aproximadamente 1

cm). Esta camada superficial de areia foi removida antes das desmontagens dos vasos e servia como uma barreira para possíveis ‘contaminações’, impedindo o contato direto do substrato do vaso com o de outros vasos ou até mesmo de solo não estéril que esteja sendo manipulado nas proximidades.

Os vasos de multiplicação foram alocados em uma sala aclimatada com condições controladas de fotoperíodo (12 h luz/ 12 h escuro) e temperatura (aproximadamente 25 °C) e, mantidos em multiplicação por aproximadamente 100 dias (Figura 2B), com rega periódica.

Após o período de 100 dias, retirava-se uma amostra de aproximadamente 50 g de substrato de cada um dos vasos em multiplicação para acompanhar o processo de esporulação. Para cada amostra os esporos foram extraídos do substrato via peneiragem úmida (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) seguido de centrifugação em gradiente de sacarose (20 % e 60 %). Quando a esporulação era observada (presença de esporos novos no substrato) suspendia-se definitivamente a rega (Figura 2C) até a senescência completa das plantas, que, depois de seca, tinham a parte aérea removida.

O substrato contendo os esporos multiplicados, juntamente com as raízes das plantas era recolhido e uma nova amostragem de cada vaso era realizada nova extração de esporos, em triplicata, e a verificação da presença de contaminação (presença de outros esporos além da espécie de interesse). Se contaminadas, as amostras eram descartadas e o substrato desses vasos esterilizado para reutilização. Se não contaminadas, as amostras de cada vaso tinham seus esporos contados sob microscópio estereoscópico, permitindo a estimativa do número de esporos por grama de substrato, agora denominado solo-inóculo. Após a recolha, deixava-se o solo-inóculo para perder umidade e quando esta atingisse aproximadamente 20 %, o solo-inóculo era armazenado em sacos plásticos, identificados com nome da espécie, código do isolado, data de recolha do substrato, número de esporos por g de solo e estocados em geladeira a 4 °C até sua utilização.

### 2.2.2.3 Análise estatística

Para cada espécie, geração (F) e agrotóxico testado os dados tiveram os pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Testes de Bartlett) verificados. Quando as premissas não foram atendidas, os dados foram transformados usando a transformação  $\text{asen}(\sqrt{x}/100)$ . Os dados de germinação foram analisados através de ANOVA (*One-way*) seguido de teste Dunnett ( $p < 0,05$ ) para avaliar a existência de diferenças significativas entre

cada concentração testada e o controle permitindo a determinação da concentração de efeito não observado (CENO).

Com base nos dados de percentual de germinação, foram determinados valores de  $CI_{50}$ ,  $CI_{20}$  e  $CI_{10}$  (concentração de inibição de 50 %, 20 % e 10 % da germinação, respectivamente), utilizando modelos de regressão não linear de acordo com o Environment Canada (EC, 2005). O método de estimação foi realizado utilizando o algoritmo Levenberg-Marquardt. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Statistica 10.0 (StatSoft 2011). Para verificar a existência de variabilidade entre as respostas das espécies testadas e suas gerações, os conjuntos de dados de  $CI_{50}$ ,  $CI_{20}$  e  $CI_{10}$ , para cada substância testada, foram submetidos individualmente a teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Como os ensaios de germinação compõem ferramentas para a etapa 'lower tier' no esquema de análise de risco, em adição às análises citadas acima, outro cálculo possível é a da Concentração Ambiental Prevista inicial das substâncias testadas no solo (originalmente *Predicted Environmental Concentration* – PEC), que é calculada com base em modelos de exposição. Quando essa concentração é calculada imediatamente após uma única aplicação de um pesticida no solo denomina-se PEC inicial ( $PEC_{inicial}$ ). Para os fungicidas testados, foram estimadas as  $PEC_{inicial}$  para cada substância através da fórmula proposta por Focus (1997):  $[PEC_{inicial} = A \times (1 - f_{int}) / (100 \times \text{depth} \times \text{bd})]$ , onde  $A$  = taxa de aplicação da substância ( $\text{g ha}^{-1}$ );  $f_{int}$  = fração interceptada pelo dossel da cultura;  $\text{depth}$  = profundidade (cm) e  $\text{bd}$  = densidade do solo seco ( $\text{g cm}^{-3}$ ).

Considerou-se aqui que todo o fungicida aplicado atingiu o solo (0% de interceptação pela cultura - pior cenário possível), que o produto foi distribuído homogeneamente na camada superior do solo de 5 cm em um solo com densidade de 1,5 (FOCUS, 1997). As taxas de aplicação dos produtos foram calculadas em  $1485 \text{ g ha}^{-1}$ ,  $2250 \text{ g ha}^{-1}$  e  $120 \text{ g ha}^{-1}$  para Clorotalonil, Mancozebe e Metalaxil-M, respectivamente. As  $PEC_{inicial}$  calculadas com base nas informações anteriores foram:  $1,98 \text{ mg kg}^{-1}$  para o Clorotalonil,  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  para Mancozebe e  $0,16 \text{ mg kg}^{-1}$  para Metalaxil – M.

### **2.2.3 Grupo de experimentos 2: Viabilidade de esporos em diferentes anos de estocagem**

Buscando responder por até quanto tempo esporos estocados a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , seriam passíveis de uso em testes ecotoxicológicos sem comprometer a sensibilidade da sua germinação, foram

selecionados esporos de isolados de FMAs que estavam armazenados no Laboratório de Ecologia por diferentes períodos (anos) de estocagem.

#### *2.2.3.2 Material biológico*

Foram utilizados esporos das espécies *G. albida* e *R. clarus*. O isolado de *G. albida* utilizado foi o SCT200A, o mesmo utilizado para os ensaios do item 2.2.1. Para *R. clarus*, como não havia disponibilidade do isolado RJN102A para os anos de estocagem desejado utilizou-se o isolado SCT720A. Ambos os isolados testados, eram provenientes da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG), cultivadas pelo do método de culturas armadilha (STUTZ & MORTON, 1996) e armazenadas a 4 °C desde o seu recebimento até a sua utilização. Foram utilizados esporos com até 5 anos de estocagem (período de 2013 a 2017).

#### *2.2.3.3 Tratamentos e análise estatística*

Para cada espécie os ensaios foram conduzidos em delineamento completamente casualizado onde, para cada uma das espécies testadas e cada ano de estocagem foram realizadas 3 repetições. A quantidade de repetições foi determinada pela quantidade máxima de esporos da espécie/ano de estocagem com menor volume de solo-inóculo.

Manteve-se o critério de determinação do que se deve considerar como um esporo germinado (comprimento das hifas após a germinação 5 vezes maior do que o diâmetro do esporo) e observou-se quais anos de estocagem atenderiam o critério de validação que exige 75 % de germinação no controle (ISO, 2009).

Ao final do ensaio, para cada espécie, ano de estocagem e repetição, o número total de esporos recuperados (encontrados no final do ensaio) e o número de esporos germinados foram contados para proceder-se o cálculo da taxa de germinação ( $[x.100/n]$ , onde  $x$  = número esporos germinados;  $n$  = número esporos recuperados). Os dados médios de germinação de cada ano de estocagem foram submetidos à análise de variância (ANOVA One-way) seguida por teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.2 Manutenção da resposta da germinação de esporos a fungicidas ao longo de três gerações monoxênicas cultivo

#### 2.3.2.2 *Gigaspora albida*

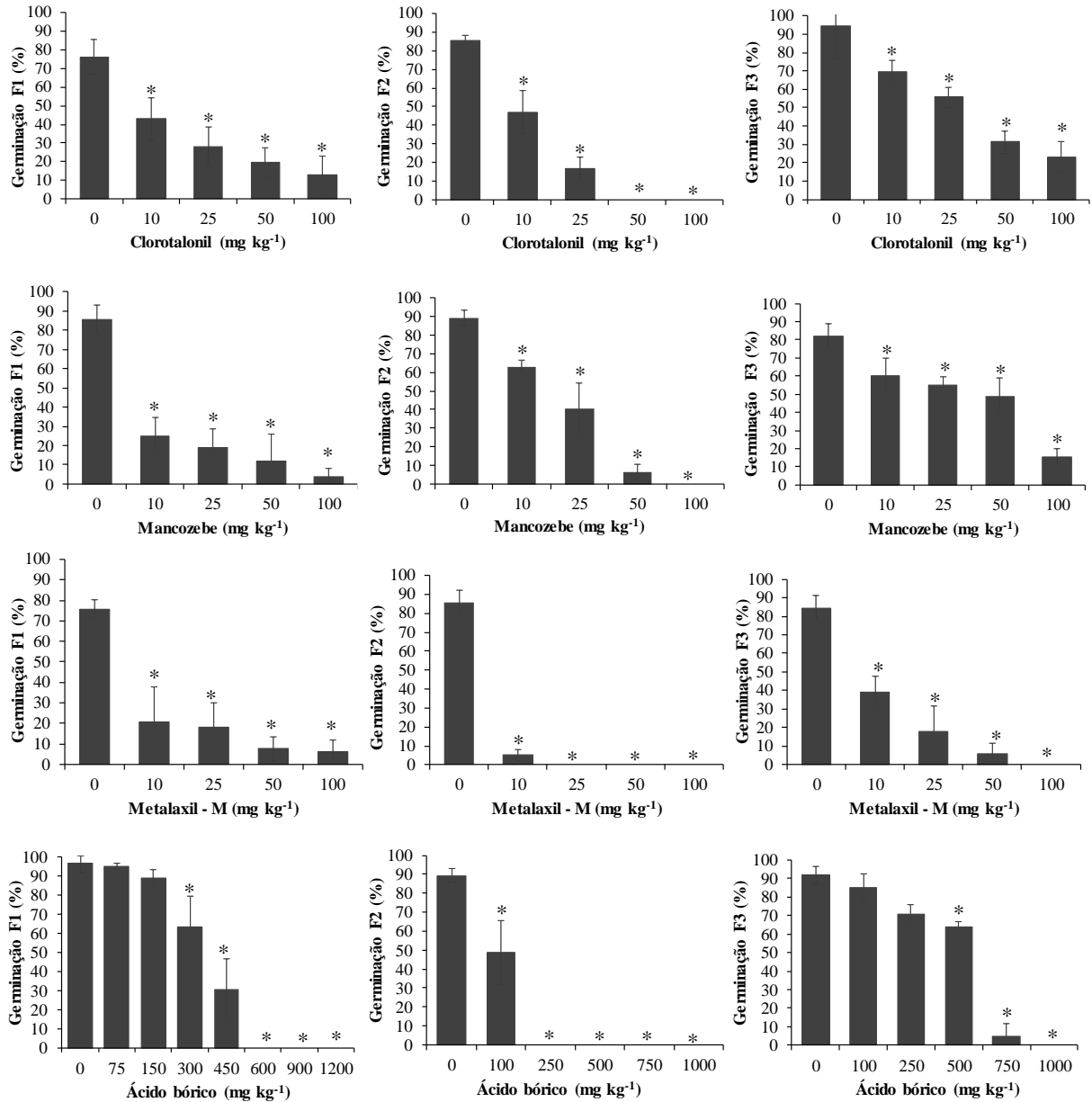
Todos os ensaios realizados para *G. albida* e suas gerações tiveram seus resultados considerados válidos, com germinação > 80 % no controle. Para todos os fungicidas testados, todas as gerações, o Teste de Dunnett demonstrou que o efeito das substâncias já se evidencia na menor concentração testada e em função disso a concentração de efeito não observado (CENO) foi definida como < 10 mg kg<sup>-1</sup>. Para o ácido bórico, essa concentração foi de 150 mg kg<sup>-1</sup> para F1, < 100 mg kg<sup>-1</sup> para F2 e 250 mg kg<sup>-1</sup> para F3. Os resultados obtidos para os ensaios de germinação de esporos das gerações F2 e F3 de *G. albida* para Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M bem como para ácido bórico estão apresentados na Figura 3.

Observa-se que para Clorotalonil e Mancozebe, houve comportamento parecido dos resultados. A CI<sub>50</sub> para as duas substâncias indica que há diferença de resultados para a geração F3, em relação as gerações F2 e F1, que não diferem entre si (Figura 4). O conjunto de CI<sub>20</sub> (Figura 5) e CI<sub>10</sub> (Figura 6), dessas duas substâncias não apresentou diferenças estatísticas entre as gerações para essas duas substâncias.

As respostas das gerações para Metalaxil-M indicam para CI<sub>50</sub> que F1 e F2 tem o mesmo comportamento de resultados e diferem de F3 (Figura 4). Para CI<sub>20</sub> os resultados de F1 indicam similaridade de comportamento tanto com F2 quanto com F3 e que F2 é estatisticamente diferente de F3 (Figura 5). Assim como para Clorotalonil e Mancozebe, o conjunto de CI<sub>10</sub> para Metalaxil-M, não apresentou significância estatística entre os resultados das três gerações (Figura 6).

Os dados para ácido bórico apontam que para CI<sub>50</sub> F1 e F3, são estatisticamente iguais (Figura 4) e para CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>, F1, F3 e F2 apresentam valores estatisticamente distintos (Figura 5 e Figura 6, respectivamente). Todos os valores de valores de CI determinados para as gerações de *G. albida*, seus intervalos de confiança e modelo estatístico empregado são apresentados na Tabela 2, no APÊNDICE A.

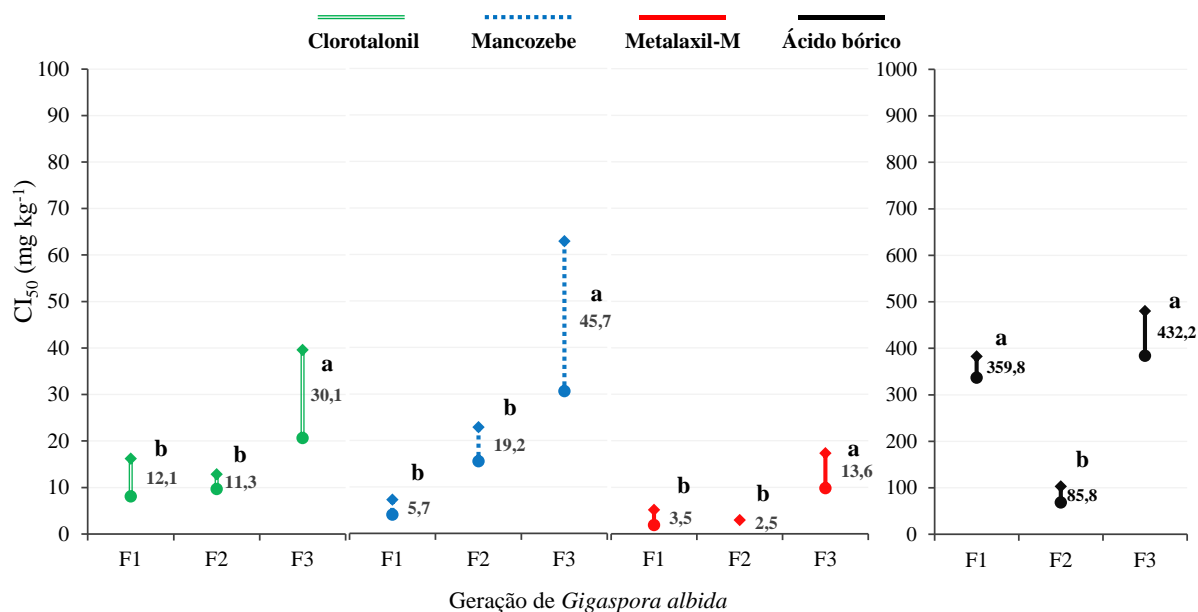
Figura 3 - Percentual de germinação dos esporos de *Gigaspora albida* nas gerações F1 (1ª coluna), F2 (2ª coluna) e F3 (3ª coluna), em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e Ácido Bórico.



Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão. Dados relativos à geração F1 foram retirados de Mallmann et al. (2018).

Fonte: Produção da autora, 2020.

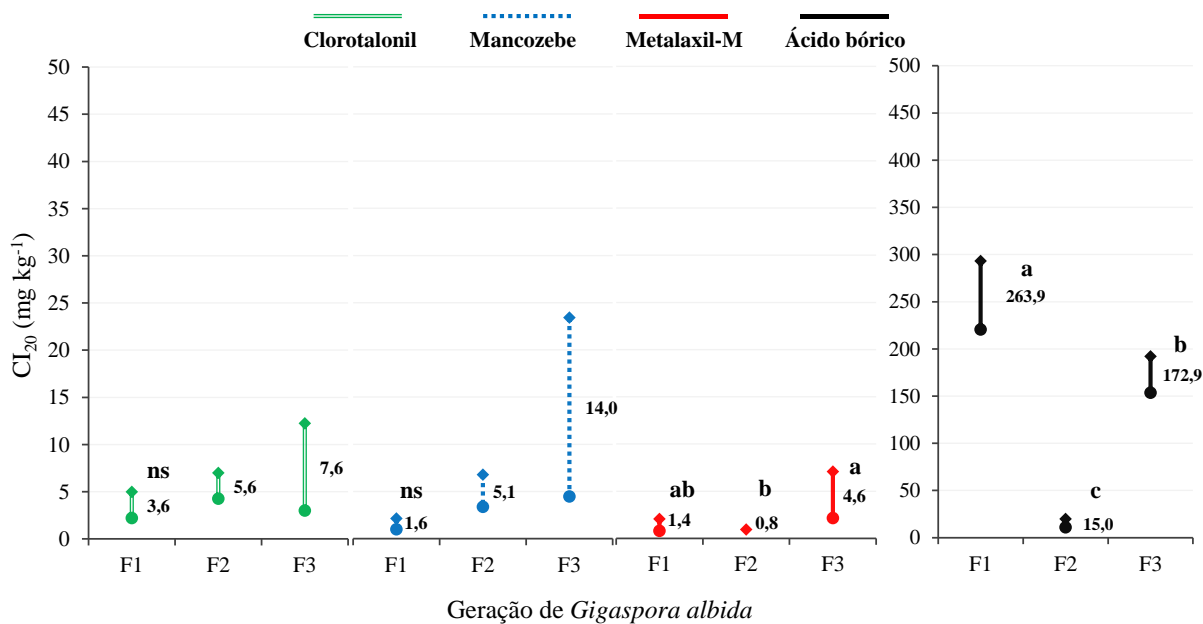
Figura 4 – Valores de concentração de inibição de 50 % da germinação (CI<sub>50</sub>) e intervalo de confiança superior (♦) e inferior (●) para as três gerações de *Gigaspora albida* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); Dados relativos à geração F1, foram retirados de Mallmann et al., (2018).

Fonte: Produção da autora, 2020.

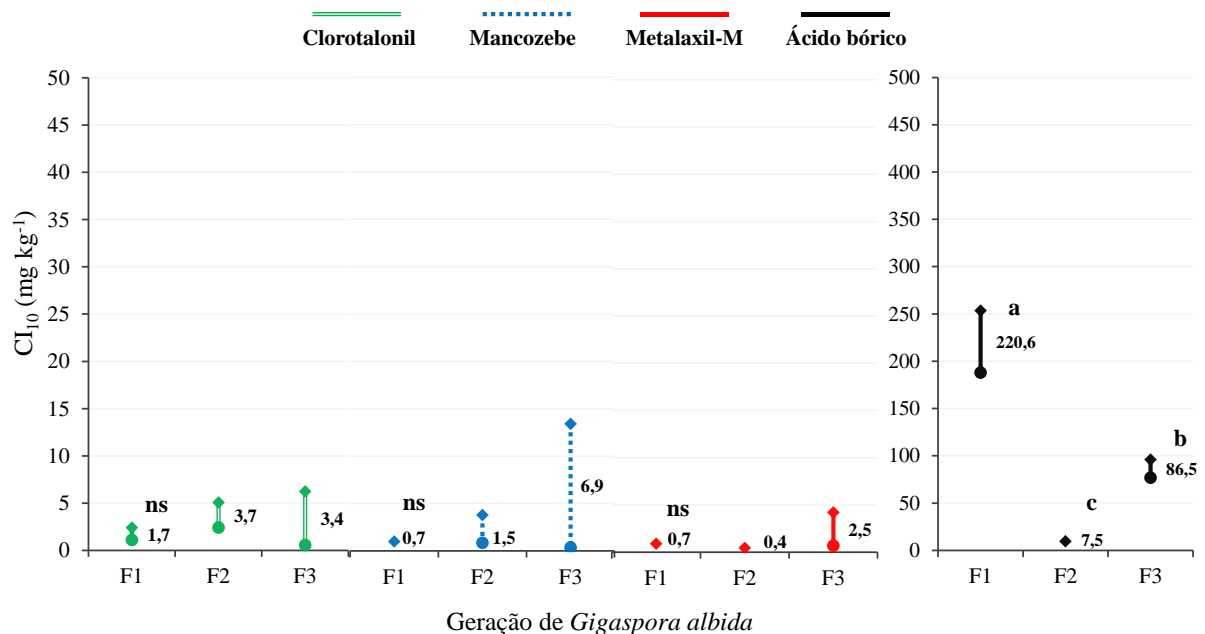
Figura 5 - Valores de concentração de inibição de 20 % da germinação (CI<sub>20</sub>) e intervalo de confiança superior (♦) e inferior (●) para as três gerações de *Gigaspora albida* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns – valores de CI não diferem estatisticamente entre si. Dados relativos à geração F1, foram retirados de Mallmann et al., (2018).

Fonte: Produção da autora, 2020.

Figura 6 - Valores de concentração de inibição de 10 % da germinação ( $CI_{10}$ ) e intervalo de confiança superior (♦) e inferior (●) para as três gerações de *Gigaspora albida* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns – valores de CI não diferem estatisticamente entre si. Dados relativos à geração F1, foram retirados de Mallmann et al., (2018).

Fonte: Produção da autora, 2020.

### 2.3.2.3 *Rhizophagus clarus*

Os ensaios realizados com as gerações de *R. clarus* tiveram seus resultados considerados válidos, com germinação > 75 % no controle (Figura 7). Para todos os fungicidas e em todas as gerações testadas, o Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ) demonstrou que o efeito das substâncias já se evidencia na menor concentração testada e em função disso a CENO foi definida como < 10 mg kg<sup>-1</sup>. Para o ácido bórico, a CENO em F1 foi de 150 mg kg<sup>-1</sup> e < 100 mg kg<sup>-1</sup> para F2 e F3.

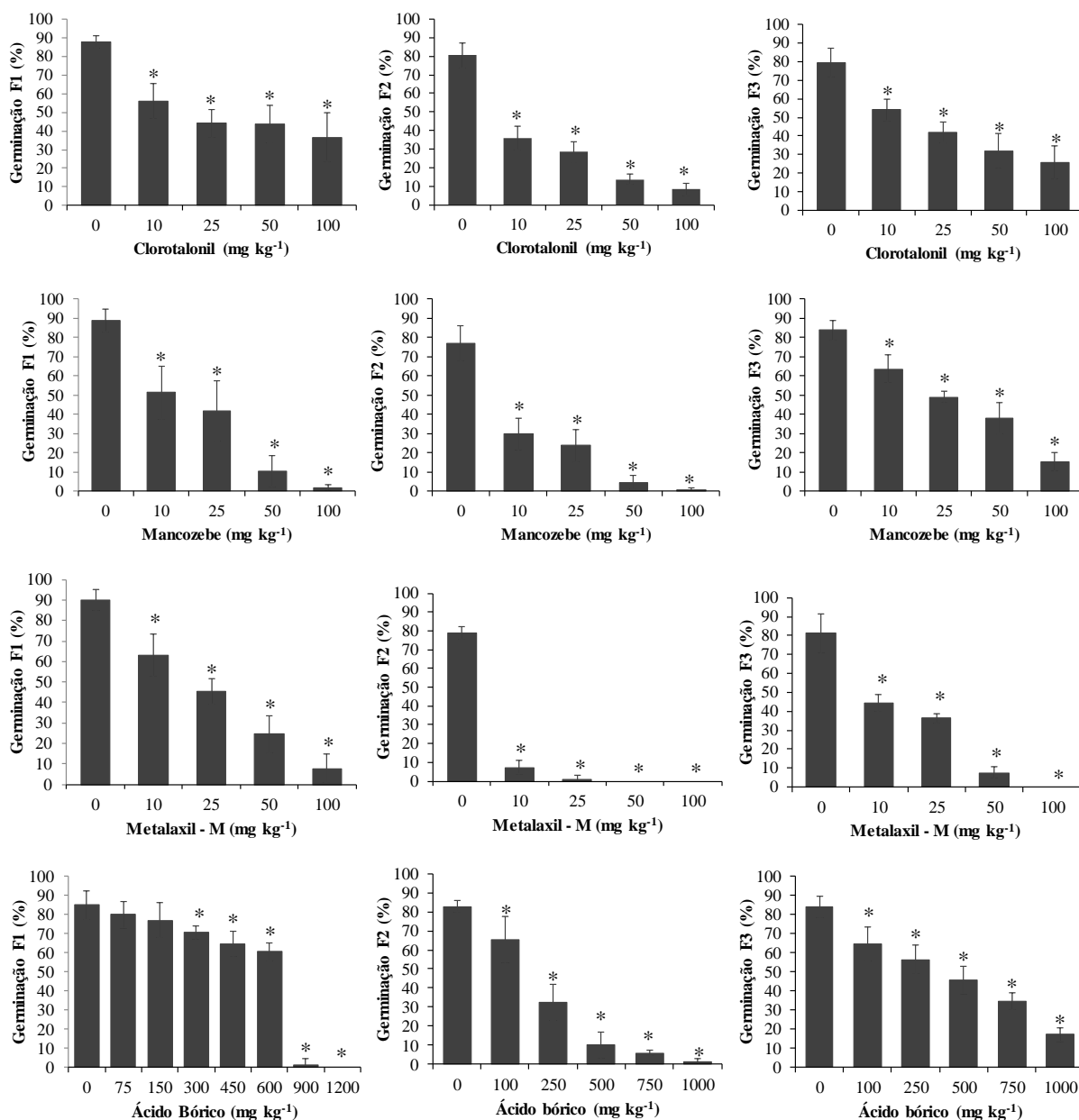
Os resultados das  $CI_{50}$ ,  $CI_{20}$ ,  $CI_{10}$  para Clorotalonil não diferiram entre si por Tukey ( $p < 0,05$ ) e para Mancozebe F3, teve respostas significativamente diferentes de F1 e F2 para todas as CI calculados (Figura 8, Figura 9 e Figura 10).

As respostas das gerações para Metalaxil-M indicam para  $CI_{50}$  que o mesmo comportamento de resultados é diferente entre todas as gerações (Figura 8). Para  $CI_{20}$  os resultados indicam similaridade de comportamento para F2 e F3 e que F1 é estatisticamente diferente de F2 (Figura 9). Quando consideradas as  $CI_{10}$  dessa substância, não houve significância estatística entre os resultados das três gerações (Figura 10).



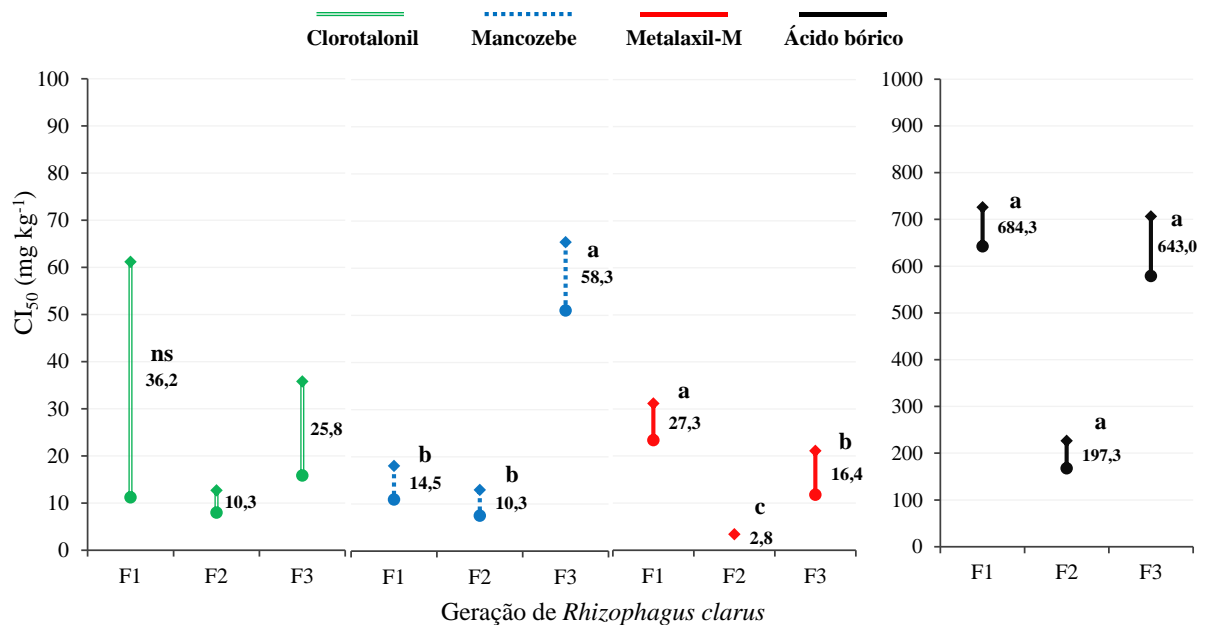
Os dados para ácido bórico apontam que para todas as CIs calculadas, F1 e F3, são estatisticamente iguais e que F2, difere das demais gerações. Todos os valores de CI determinados para as gerações de *R. clarus* pode ser vistos na Tabela 3, no APÊNDICE A.

Figura 7 - Percentual de germinação dos esporos de *Rhizophagus clarus* nas gerações F1 (1ª coluna), F2 (2ª coluna) e F3 (3ª coluna), testadas em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão. Fonte: Produção da autora, 2020.

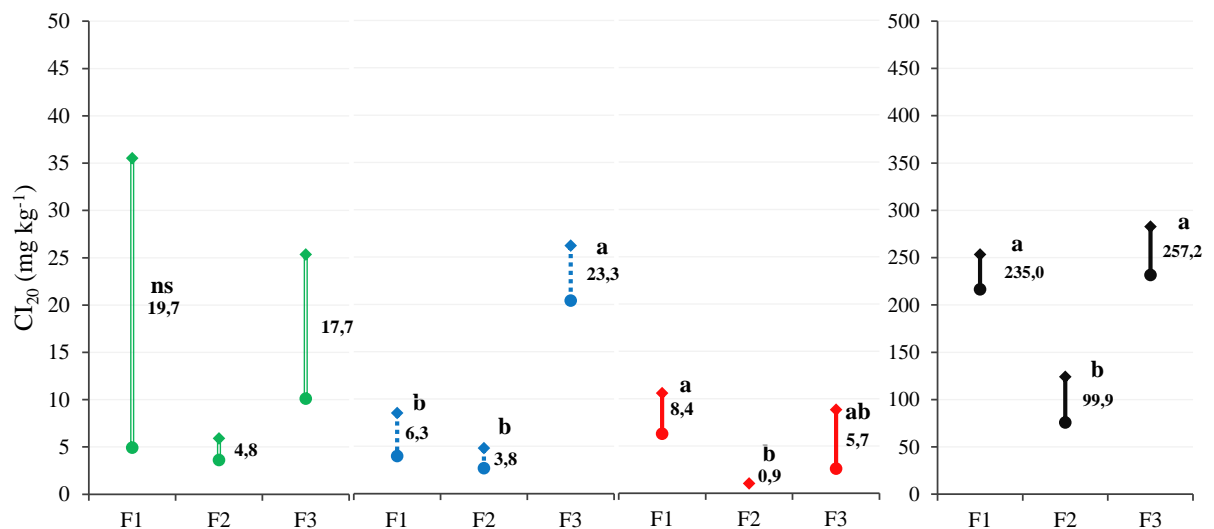
Figura 8 - Valores de concentração de inibição de 50 % da germinação ( $CI_{50}$ ) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para as três gerações de *Rhizophagus clarus* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns – valores de CI não diferem estatisticamente entre si. Dados relativos à geração F1, foram retirados de Mallmann et al., (2018).

Fonte: Produção da autora, 2020.

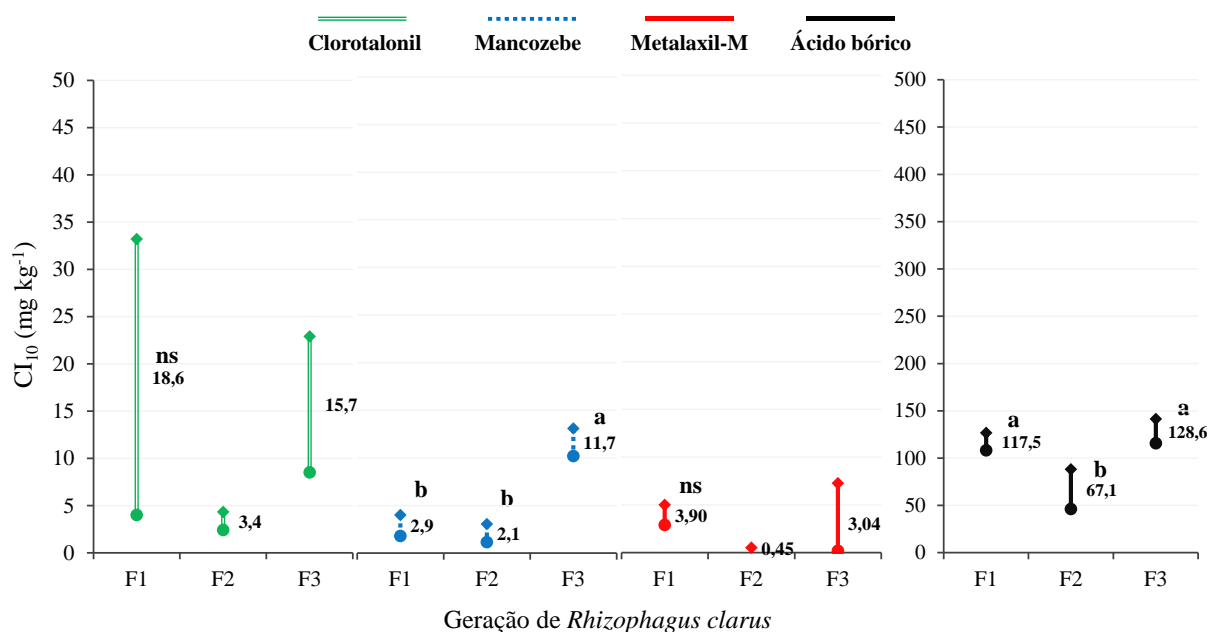
Figura 9 - Valores de concentração de inibição de 20 % da germinação ( $CI_{20}$ ) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para as três gerações de *Rhizophagus clarus* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns – valores de CI não diferem estatisticamente entre si. Dados relativos à geração F1, foram retirados de Mallmann et al., (2018).

Fonte: Produção da autora, 2020.

Figura 10 - Valores de concentração de inibição de 10 % da germinação (CI<sub>10</sub>) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para as três gerações de *Rhizophagus clarus* testadas em Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns – valores de CI não diferem estatisticamente entre si. Dados relativos à geração F1, foram retirados de Mallmann et al., (2018).

Fonte: Produção da autora, 2020.

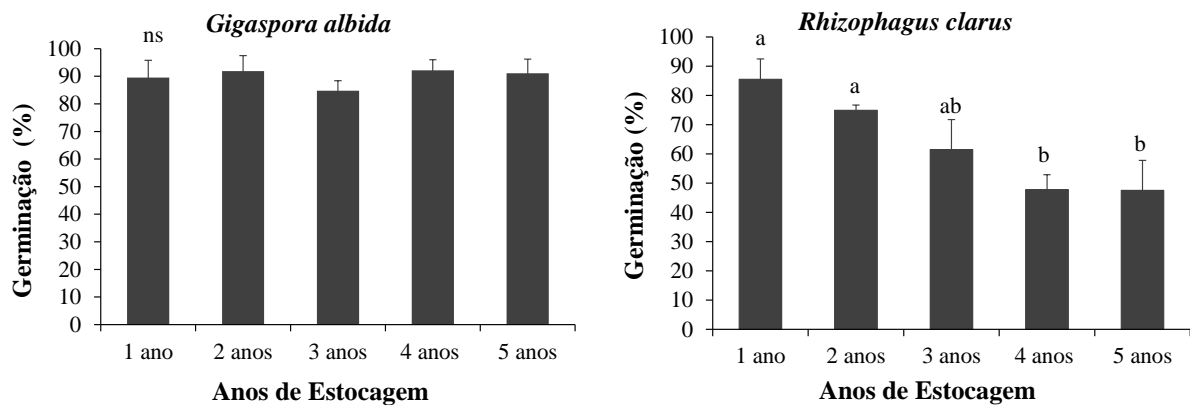
### 2.3.3 Viabilidade de esporos em diferentes anos de estocagem

As taxas médias de germinação de esporos das duas espécies para o 1º, 2º, 3º, 4º e 5º ano de estocagem foram respectivamente: 90, 92, 85, 92 e 91 % para *G. albida* e 86, 76, 61, 48 e 48 % para *R. clarus* (Figura 11).

Estatisticamente, não houve diferença significativa entre os anos de estocagem de *G. albida* e para todos os anos de estocagem avaliados, as médias de germinação são suficientes para validar um ensaio seguindo os critérios propostos pelo protocolo ISO 10832:20009 e validados para essas duas espécies em Mallmann et al. (2018) ( $\geq 75$  %).

Para a espécie *R. clarus*, o 1º e 2º ano obtiveram valores de germinação estatisticamente superiores ao 4º e 5º ano de estocagem e atingiram média de germinação suficiente para validar um ensaio. O percentual de germinação do 3º ano de estocagem foi intermediário, mas não atinge 75 %, logo, não passível de uso para um ensaio ecotoxicológico com esse padrão de validação.

Figura 11 - Percentual de germinação de *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus* ao longo de cinco anos de estocagem.



Os dados são médias de 3 repetições; ns = diferença estatística não significativa através de teste Tukey ( $p < 0.05$ ); (⊥) desvio padrão.

Fonte: Produção da autora, 2020.

## 2.4 DISCUSSÃO

### 2.4.2 Manutenção da resposta da germinação de esporos a fungicidas ao longo de três gerações de cultivo

Todas as substâncias testadas afetaram as espécies de FMA testadas e suas gerações. A magnitude dos efeitos variou entre as substâncias (agrotóxicos ou ácido bórico) e isso se deve ao fato de que cada uma delas, atua de modo distinto no metabolismo dos fungos.

Clorotalonil e Mancozebe são fungicidas de contato multi-sítio e possuem a característica de atuar em pontos do metabolismo fúngico (GISI; SIEROTZKI, 2008; BRASIL, 2017). São considerados de baixo risco no que tange a seleção de fungos com resistência a eles (EPA, 2020) e por isso acabam sendo utilizados com alta frequência durante o período vegetativo das plantas (SCARIOT, 2016). Tanto o Clorotalonil como o Mancozebe possuem histórico de ação com indicação de atuação em moléculas atuantes no processo de respiração fúngica (SCARIOT, 2016). O Clorotalonil foi indicado como inibidor das moléculas de tiol, e o Mancozebe foi associado como um desacoplador de cadeia transportadora de elétrons, provocando perturbações na função mitocondrial (SCARIOT, 2016; EPA, 2020). O Mancozebe também foi descrito como causador de morte por apoptose em celular de alguns grupos fúngicos que não os FMA (SCARIOT, 2016).

Os dois fungicidas citados acima, causaram efeitos similares entre as gerações dos isolados testados. Isso pode ser decorrente da ação em diferentes pontos do metabolismo dos FMA promotores da germinação dos esporos, dado os seus modos de ação.

O modo de ação do Metalaxil-M afeta a síntese de ácidos nucleicos, inibindo a RNA polimerase I, afetando diretamente a síntese do RNA ribossomal e como consequência provoca todo um desbalanço na produção de proteínas na célula fúngica (BRASIL, 2017; EPA, 2020). Os efeitos na germinação, quando medidos pelo valor da CI determinado, foram encontrados em concentrações mais baixas para Metalaxil-M do que para os outros fungicidas. Esses efeitos podem ser atribuídos a fato deste atuar em etapas mais primordiais do metabolismo fúngico, dado o seu modo de ação.

Com relação ao boro (B), os fungos não utilizam esse elemento em seu metabolismo e as primeiras hipóteses envolvendo o B em fungos indicaram que B poderia ser sequestrado por carboidratos fúngicos (LEHTO et al., 2004). Nesse processo, a absorção de B pode se dar através da absorção passiva de ácido bórico (forma de B disponível na solução do solo em pH neutro e a substância testa), seguido de rápida formação de complexos com os carboidratos fúngicos, permitindo contínua entrada de ácido bórico e, portanto, acumulação desse elemento nas células fúngicas, mesmo contra um gradiente de concentração (LAVOLA; APHALO; LEHTO, 2011). É possível que o B absorvido na forma de ácido bórico, acumulado nas células fúngicas e tenha provocado alterações metabólicas, não mensuradas nesse estudo, mas que inibiram a germinação.

No que se refere à resposta das gerações das espécies testadas, os resultados indicaram que a variabilidade da resposta da germinação depende da substância testada e da magnitude do efeito que se quer medir (aqui optamos pelas concentrações de inibição em 50, 20 e 10 % da germinação). Embora alguns grupos de resultados como o conjunto de  $CI_{10}$  determinadas para os fungicidas (e também  $CI_{20}$  para Clorotalonil) das gerações de *G. albida* e o conjunto de todas as CIs de *R. clarus* para o Clorotalonil, tenham apresentado comportamento estatisticamente equivalente, para a maioria das combinações 'substância + geração + CI' os resultados indicam a ausência de estabilidade da resposta.

Não houve, entre os isolados de *G. albida* e nem entre os de *R. clarus* uma geração que tenha sido mais ou menos sensível para todas as substâncias (fungicidas e ácido bórico), indicando que a variação da resposta ao longo das gerações pode ser resultado do modo de ação da substância e da variabilidade genética natural presentes nesses fungos. A variabilidade genética entre organismos da mesma espécie vem sendo estudada e evidências experimentais mostram que parte dessa variabilidade pode ser encontrada a níveis de núcleos, dentro de um

citoplasma comum (HIJRI; SANDERS, 2005). Núcleos com material genético diferente, tendem a gerar, descendentes de FMAs que receberam nucleótípos diferentes em comparação à "linhagem parental" ou dos "esporos irmãos" (ANGELARD et al., 2010.) Nucleótípos distintos (determinados pela quantidade total de DNA codificante e não-codificante) influenciam no desenvolvimento celular e em alguns de suas características como o volume celular e nuclear e tamanho dos cromossomos (BENNETT, 1985; DOYLE; COATE, 2019). As variantes genéticas de uma mesma linhagem de FMA, são capazes de expressar respostas fenotípicas distintas às mesmas variáveis (EHINGER et al., 2012).

Observou-se para principalmente entre os conjuntos de  $CI_{50}$  e  $CI_{20}$  calculadas para F2 e F3 de ambas as espécies, uma variação numericamente ampla (e estatisticamente diferente) de resultados. Efeitos contrastantes em gerações subsequentes também foram observados por Ehinger et al. (2012) que, conduziram estudo *in vitro*, avaliando características moleculares e de germinação de 3 gerações de *Rhizophagus irregularis*. Os autores observaram que uma determinada linhagem apresentou as taxas mais lentas de crescimento do tubo germinativo dos esporos avaliados e que, a geração seguinte apresentou as taxas mais rápidas de crescimento da mesma característica. Pontuaram que as variações fenotípicas, acompanham as variações genéticas dessas linhagens e gerações e que essas variações pareciam ser aleatórias. Para este estudo, não houve avaliações a nível molecular que nos permita afirmar que somente a variabilidade genética seja a responsável pelas respostas encontradas.

Num esquema de análise de risco, para a fase de menor complexidade, a existência de risco dos agrotóxicos testados não considera somente os números absolutos das CIs calculadas. Adota-se a existência de uma relação entre a PEC calculada para cada substância e as concentrações de efeito em 10 % da população testada (EFSA, 2015). Esse critério é considerado para organismos da fauna do solo, que já possuem uma regulamentação específica. Extrapolar essa abordagem para avaliações com FMAs ainda demanda ser discutida, uma vez que não se tem informações suficientes para afirmar que aceitar um impacto em 10 % do efeito medido, é uma margem segura em termos de manutenção dos serviços prestados por esses organismos.

Considerando as  $CI_{10}$  calculadas, tivemos valores de efeito menores do que o valor de  $PEC_{inicial}$  calculada para Clorotalonil ( $1,98 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e Mancozebe ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Isso significa que, para *G. albida* F1 e Clorotalonil e para as gerações F1 e F2 de ambas as espécies para Mancozebe, há a exposição à uma concentração desses agrotóxicos no solo, maior do que a que causa efeito "aceitável".

Nesse estudo, não verificou-se a estabilidade da resposta da germinação ao longo das gerações, mas a sensibilidade das espécies às substâncias existe e foi comprovada (CENO < 10 mg kg<sup>-1</sup>; resultados dos testes Dunnett), mesmo que algumas substâncias possam ter indicativos de não causar risco, quando se considera a relação entre CI<sub>10</sub> e PECs, para esse estudo).

As menores variações entre resultados foram observadas dentro do conjunto de CI<sub>10</sub> calculadas e, dentro do contexto da ecotoxicologia, pode ser a informação mais segura a ser utilizada para contornar a necessidade de padronização na obtenção dos resultados. Testes ecotoxicológicos de laboratório representam o pior cenário de exposição dos organismos-testes às substâncias e embora a germinação, que é a característica medida pelo protocolo ISO 10832:2009 e pela adaptação de Mallmann et al. (2018), seja uma resposta passível de variações, dependendo do conjunto de organismo-teste, ela deve ser entendida como uma etapa inicial da avaliação dos efeitos de agrotóxicos e outras substâncias sobre a simbiose micorrízica. Ensaio de germinação compõem ensaios preliminares, com menor nível de complexidade (*lower tier*) e podem representar dentro do contexto de avaliação de risco, um paralelo daquilo que os ensaios de letalidade representam para a avaliação da fauna solo: uma ferramenta que permite respostas mais rápidas que permitam estimar novas concentrações de substâncias e avaliar efeitos em características ecologicamente mais relevantes do ciclo de vida desses organismos.

### 2.4.3 Viabilidade dos esporos

O processo de multiplicação, como visto no item 2.2.2.2.1 Multiplicação dos esporos dura aproximadamente 4 meses. Isso significa que, para cumprir a premissa do protocolo ISO de se utilizar esporos com idade inferior a 5 meses o processo de multiplicação deverá ser constante, numa situação de montagem de ensaios em baterias de teste ou, numa segunda situação, que a compra desses isolados dos bancos que disponibilizam culturas de FMAs deverá ser efetuada de forma frequente. A primeira situação incorre na necessidade de recursos humanos disponíveis constantemente e a segunda, em haver disponibilidade de recursos financeiros para a compra (e a disponibilidade dos isolados de interesse nas coleções de cultura de FMAs) e ambas, podem constituir um entrave para o desenvolvimento de pesquisas com esses organismos.

Os resultados para as espécies testadas, apontaram tempos diferentes de viabilidade dos esporos. Os esporos de *G. albida* podem permanecer estocados por até 5 anos, enquanto, para *R. clarus* o tempo de estocagem diminui para 2 anos.

Mesmo adotando, para ambas a espécies, o menor tempo possível de estocagem (2 anos), tem-se uma ‘vida útil’ de isolado quase quatro vezes superior àquela indicada no protocolo ISO, que é de até 5 meses e contorna em partes, as dificuldades de multiplicação em larga escala desses organismos, impostas pela característica de simbionte obrigatório.

Além dos aspectos inerentes ao processo de multiplicação dos esporos em si e dificuldades para a aquisição de exemplares de isolados fúngicos, outro forte motivo pode ser adicionado ao porquê se optar por utilizar esporos, desde que viáveis, com maior idade e tempo de armazenagem em ensaios ecotoxicológicos: a existência de variação da resposta de germinação. Esporos que não se mantêm viáveis por longos períodos ou que não toleram tempo de estocagem prolongada, necessariamente precisarão de ciclos de reprodução mais frequentes implicando num aumento das possibilidades de variação genética e conseqüentemente, de variação da desses organismos-teste as substâncias testadas.

Logo, esporos viáveis por períodos prolongados (desde que armazenados adequadamente) otimizam o uso e o processo de produção desses propágulos uma vez que, esporos “mais velhos” podem ser utilizados em testes ecotoxicológicos sem comprometer a resposta da germinação e ainda minimizam os efeitos em termos de variabilidade genética que a reprodução frequente pode gerar.

## 2.5 CONCLUSÃO

Esporos de três gerações de cultivo das espécies *G. albida* e *R. clarus* não mantiveram a estabilidade da sua resposta de germinação, mesmo utilizando-se do método padrão de condução dos ensaios e os mesmos compostos testados.

Os esporos de *G. albida* mantiveram, ao longo de cinco anos de estocagem, a viabilidade necessária para atender o pré-requisito de percentual de germinação na validação de ensaios do protocolo ecotoxicológico recomendado; Esporos de *R. clarus*, esticados por até dois anos mantêm sua viabilidade de capacidade de validar ensaios ecotoxicológicos com base nesse critério.



## REFERÊNCIAS

AMF PHYLOGENY. Phylogeny and taxonomy of Glomeromycota ('arbuscular mycorrhizal [AM] and related fungi'), 2019. **Glomeromycota SPECIES LIST**. Disponível em: [http://www.amf-phylogeny.com/amphylo\\_species.html](http://www.amf-phylogeny.com/amphylo_species.html). Acesso em: 12 dez. 2019.

AMORIM, M.J.B; NATAL-DA-LUZ, T; SOUSA J.P.; LOUREIRO, S; BECKER, L; RÖMBKE, J.; SOARES, A.M.V.M. Boric acid as reference substance: pros cons and standardization. **Ecotoxicol.**, v. 21, p. 919–924, 2012. doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0832-9>

ANGELARD, C et al. Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription. **Curr Biol.**, v. 20, p. 1216–21, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.031>

BENNETT, M.D. Intraspecific variation in DNA amount and the nucleotypic dimension in plant genetics. In: FREELING, M. (Ed.). **Plant genetics**. UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. v. 35, p. 283-302, 1985.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. COORDENAÇÃO-GERAL DE AGROQUÍMICOS E AFINS. Ato n° 45, de 09 de junho de 2017. Disponível em [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/ATO45\\_DE09DEJUNHODE2017.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/ATO45_DE09DEJUNHODE2017.pdf). Acesso em: 18 dezembro de 2019.

CICG - COLEÇÃO INTERNACIONAL DE CULTURA DE GLOMEROMYCOTA. Blumenau, SC, Brasil. Disponível em: <https://sites.google.com/site/cicgfma/home>

CROSSAY, T. et al. New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS. **Sci Rep.**, v. 7, p. 1-16, 2017. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14487-6>

DANIELS, B. A. **Factors affecting germination of endomycorrhizal spores**. 1978. 75 p. Ph.D. Thesis - Oregon State University, Oregon, 1978.

DELAUX P. M. et al. Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. **PNAS** v. 112, p. 13390–13395, 2015. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1515426112>, PMID: 26438870

DOYLE, J.J; COATE, J. E. Polyploidy, the nucleotype, and novelty: the impact of genome doubling on the biology of the cell. **Int. J. Plant Sci.**, v. 180 p. 1–52, 2019. doi: <https://doi.org/10.1086/700636>

EC - Environment Canada. Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests, Method development and applications section. Report EPS 1/RM/46. In: **Environmental Protection Series**. Environment Canada. Environmental Technology Centre, Ottawa, ON, 2005.

EFSA, European Food Safety Authority. Draft EFSA Guidance Document for predicting environmental concentrations of active substances of plant protection products and transformation products of these active substances in soil. **EFSA Journal**. 2015. Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)

EHINGER, M.O. et al. Significant genetic and phenotypic changes arising from clonal growth of a single spore of an arbuscular mycorrhizal fungus over multiple generations. **New Phytol.**, v. 196, p. 853-861, 2012. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04278.x>

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Common and trade names of select fungicides currently registered in the United States. disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/how-search-information-about-pesticide-ingredients-and-labels#PPLS>. Acesso em: 05 de janeiro de 2020.

FOCUS - Forum for the Co-ordination of pesticide fate models and their Use, 1997. Soil persistence models and EU registration: The final report of the work of the Soil Modelling Work group of FOCUS. 1997.

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 Entwicklungsfor schung: University of Bonn, 2004

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. doi:[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)

GISI, U.; SIEROTZKI, H.). Fungicides modes of action and resistance in downy mildews. **Eur. J. Plant Pathol.** 122: 157-167, 2008. doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9290-5>

HAGE-AHMED, K.; ROSNER, K.; STEINKELN, S. Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. **Pest Management Sci.**, v. 75, p. 583-590, 2019. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.5220>

HIJRI, M.; SANDERS, I. R. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. **Nature**, v. 33, p. 160-163, 2005.  
doi: <https://doi.org/10.1038/nature03069>

HOSNY, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; DULIEU, H. Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. **Genome**, v. 41, n. 3, p. 422–428, 1998.  
doi: <https://doi.org/10.1139/g98-038>

IBM CORP. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Versão 25.0. Armonk, Nova Iorque: IBM Corp. 2017. Disponível em < <https://www.ibm.com/br-pt/analytics/spss-trials>>

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 11268-2**: Soil quality – Effects of pollutants on earthworms - Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. ISO, Geneva, 2012.

KAONONGBUA, W.; MORTON, J. B.; BEVER, J. D. Taxonomic revision transferring species in *Kuklospora* to *Acaulospora* (Glomeromycota) and a description of *Acaulospora colliculosa* sp. Nov. from field collected spores. *Mycologia*, v. 102, p. 1497 – 1509, 2010.  
doi: <https://doi.org/10.3852/10-011>

LAVOLA, A.; APHALO, P.J.; LEHTO, T. Boron and other elements in sporophores of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi. **Mycorrhiza**, v. 21, p. 155–165, 2011. doi: <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0321-7>

LEE K. M. et al. Pitfalls and important issues in testing reliability using intraclass correlation coefficients in orthopedic research. **Clin Orthop Surg.**, v. 4, n. 2, p. 149-155, 2012.  
doi: <http://dx.doi.org/10.4055/cios.2012.4.2.149>.

LEHTO, T.; LAVOLA, A.; KALLIO, E.; APHALO, J.P. Boron uptake by ectomycorrhizas of silver birch. **Mycorrhiza**, v. 14, p. 209–212, 2004. doi: <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0290-1>

LOUIS, I.; LIM, G. Effect of Storage of Inoculum on Spore Germination of a Tropical Isolate of *Glomus clarum*. **Mycologia.**, v. 80, n. 2, p. 157-161, 1988.  
doi: <https://doi.org/10.2307/3807790>

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.

MALLMANN, G.C. et al. Placing arbuscular mycorrhizal fungi on the risk assessment test battery of plant protection products (PPPs). **Ecotoxicology**. 27, 809–818, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1946-0>

NIEMEYER, J.C. et al. Boric acid as reference substance for ecotoxicity tests in tropical artificial soil. **Ecotoxicol.**, Technical note:1-7, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1915-7>

NOVAIS, C. B. et al . Compatibility and incompatibility in hyphal anastomosis of arbuscular mycorrhizal fungi. **Sci. agric.**, v. 74, n. 5, p. 411-416, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0243>.

NOVAIS, C. B. et al. Interconnectedness, length and viability of arbuscular mycorrhizal mycelium as affected by selected herbicides and fungicides. **Appl Soil Ecol.**, v. 143, p. 144-152, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.06.013>

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (2016) Predatory mite (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) Reproduction test in soil. **OECD guideline for the testing of chemicals No. 226**. Paris, France.

PRINCZ, J.; BECKER, L.; SCHEFFCZYK, A.; STEPHENSON, G.; SCROGGINS, R.; MOSER, T.; RÖMBKE, J. Ecotoxicity of boric acid in standard laboratory tests with plants and soil organisms. **Ecotoxicol.**, v. 26, p. 471–481, 2017. doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1789-0>

REDECKER, D. et al. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **Mycorrhiza**, v. 23, p. 515 – 531, 2013. doi: <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0486-y>

SCARIOT, F. J. Efeito dos fungicidas mancozeb, captan e dithianon sobre *Saccharomyces cerevisiae*. Caxias do Sul, 2016 106p. (Dissertação de mestrado) – Universidade de Caxias do Sul.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3 ed. New York: Academic Press, 2008. ISBN: 9780123705266

STATSOFT. **STATISTICA 10.0 (data analysis software system)**. [s.l]. 2011. Disponível em <<http://www.statsoft.com>>.

STÜRMER, S. L.; MORTON, J. B. Taxonomic reinterpretation of morphological characters in *Acaulosporaceae* based on developmental patterns. **Mycologia**, v. 91, p. 849 – 857, 1999. doi: <https://doi.org/10.2307/3761538>

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.

STUTZ, J.C.; MORTON, J.B. Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems. **Can J Botany**., v. 74, p. 1883–1889, 1996. doi: <https://doi.org/10.1139/b96-225>

## APÊNDICE A

Tabela 2 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para o isolado G1 de *Gigaspora albida* e suas gerações (F1, F2 e F3), em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.

Substância / Geração	CENO	CI <sub>50</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>20</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>10</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico
<b>Clorotalonil</b>				
F1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>12,1<sup>b</sup></b> [8,1 – 16,2] Exponencial	<b>3,6<sup>ns</sup></b> [2,2 – 5,0] Exponencial	<b>1,7<sup>ns</sup></b> [1,1 – 2,4] Exponencial
F2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>11,3<sup>b</sup></b> [9,7 – 12,8] Logístico	<b>5,6</b> [4,3 – 7,0] Logístico	<b>3,7</b> [2,4 – 5,1] Logístico
F3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>30,1<sup>a</sup></b> [20,7 – 39,6] Exponencial	<b>7,6</b> [3,0 – 12,2] Logístico	<b>3,4</b> [0,6 – 6,2] Logístico
<b>Mancozebe</b>				
F1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>5,7<sup>b</sup></b> [4,00 – 7,3] Exponencial	<b>1,6<sup>ns</sup></b> [1,0 – 2,1] Exponencial	<b>0,7<sup>ns</sup></b> [0,5 – 1,0] Exponencial
F2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>19,2<sup>b</sup></b> [15,5 – 22,9] Logístico	<b>5,1</b> [3,4 – 6,8] Linear	<b>1,5</b> [-0,9 – 3,8] Linear
F3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>46,7<sup>a</sup></b> [30,6 – 62,9] Logístico	<b>14,0</b> [4,5 – 23,4] Logístico	<b>6,9</b> [0,4 – 13,4] Logístico
<b>Metalaxil-M</b>				
F1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>3,5<sup>b</sup></b> [1,9 – 5,1] Exponencial	<b>1,4<sup>ab</sup></b> [0,8 – 2,1] Exponencial	<b>0,7<sup>ns</sup></b> [0,4 – 0,9] Exponencial
F2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>2,5<sup>b</sup></b> [2,0 – 3,0] Exponencial	<b>0,8<sup>b</sup></b> [0,6 – 0,9] Exponencial	<b>0,4</b> [0,3 – 0,4] Exponencial
F3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>13,6<sup>a</sup></b> [9,8 – 17,3] Logístico	<b>4,6<sup>a</sup></b> [2,2 – 7,01] Logístico	<b>2,5</b> [0,7 – 4,2] Logístico
<b>Ácido Bórico</b>				
F1	150 mg kg <sup>-1</sup>	<b>359,8<sup>a</sup></b> [336,9 – 382,8] Logístico	<b>263,9<sup>a</sup></b> [234,6 – 293,1] Logístico	<b>220,6<sup>a</sup></b> [187,8 – 253,4] Logístico
F2	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>85,8<sup>b</sup></b> [68,7 – 103,0] Exponencial	<b>15,0<sup>c</sup></b> [10,9 – 19,9] Linear	<b>7,5<sup>c</sup></b> [5,5 – 9,7] Linear
F3	250 mg kg <sup>-1</sup>	<b>432,2<sup>a</sup></b> [384,2 – 480,3] Linear	<b>172,9<sup>b</sup></b> [153,7 – 192,1] Linear	<b>86,5<sup>b</sup></b> [76,8 – 96,1] Linear

Para a mesma substância, médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns - médias não diferem estatisticamente entre si. Dados relativos ao campo F1 – Fonte: Mallmann et al. (2018). CI<sub>50</sub>, 20 e 10 = concentração de inibição de 50 %, 20 % e 10 % da germinação; IC - intervalos de confiança.

Fonte: Produção da autora, 2020.

Tabela 3 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para o isolado R1 de *Rhizophagus clarus* e suas gerações (F1, F2 e F3), em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.

Substância / Geração	CENO	CI <sub>50</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>20</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>10</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico
<b>Clorotalonil</b>				
F1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>36,2<sup>ns</sup></b> [11,2 - 61,2] Gompertz	<b>19,7<sup>ns</sup></b> [4,9 - 34,5] Exponencial	<b>18,6<sup>ns</sup></b> [4,0 - 33,2] Exponencial
F2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>10,3</b> [ 8,0 - 12 ,7] Exponencial	<b>4,8</b> [ 3,6 - 5,9] Exponencial	<b>3,4</b> [ 2,2 - 4,3] Exponencial
F3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>25,8</b> [ 15,9 - 35,8] Exponencial	<b>17,7</b> [ 10,1 - 25,3] Exponencial	<b>15,7</b> [8,5 - 22,9] Exponencial
<b>Mancozebe</b>				
F1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>14,5<sup>b</sup></b> [10,9 - 18,1] Exponencial	<b>6,3<sup>b</sup></b> [4,0 - 8,5] Exponencial	<b>2,9<sup>b</sup></b> [1,8 - 4,0] Exponencial
F2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>10,3<sup>b</sup></b> [7,5 - 13,0] Linear	<b>3,8<sup>b</sup></b> [ 2,7 - 4,8] Linear	<b>2,1<sup>b</sup></b> [1,2 - 3,1] Linear
F3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>58,3<sup>a</sup></b> [ 51,0 - 65,5] Linear	<b>23,3<sup>a</sup></b> [20,4 - 26,2] Linear	<b>11,7<sup>a</sup></b> [10,2 - 13,1] Linear
<b>Metalaxil-M</b>				
F1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>27,3<sup>a</sup></b> [23,4 - 31,2] Exponencial	<b>8,4<sup>a</sup></b> [6,3 - 10,6] Exponencial	<b>3,9<sup>ns</sup></b> [2,9 - 5,0] Exponencial
F2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>2,8<sup>c</sup></b> [ 2,2 - 3,4] Exponencial	<b>0,9<sup>b</sup></b> [ 0,8 - 1,0] Exponencial	<b>0,5</b> [ 0,4 - 0,6] Exponencial
F3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>16,4<sup>b</sup></b> [11, 8 - 21,1] Exponencial	<b>5,7<sup>ab</sup></b> [ 2,6 - 8,8] Exponencial	<b>3,0</b> [0,2 - 7,3] Exponencial
<b>Ácido Bórico</b>				
F1	150 mg kg <sup>-1</sup>	<b>684,3<sup>a</sup></b> (642,3 - 726,3) Gompertz	<b>235,0<sup>a</sup></b> [216,6 - 253,4] Linear	<b>117,5<sup>a</sup></b> [108,3 - 126,7] Linear
F2	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>197,3<sup>b</sup></b> [ 167,8 - 226,7] Logístico	<b>99,9<sup>b</sup></b> [ 75,8 - 124,1] Logístico	<b>67,1<sup>b</sup></b> [46,2 - 88,1] Logístico
F3	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>643,0<sup>a</sup></b> [579,2 - 706,2] Linear	<b>257,2<sup>a</sup></b> [231,7 - 282,7] Linear	<b>128,6<sup>a</sup></b> [115,8 - 141,3] Linear

Para a mesma substância, médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns - médias não diferem estatisticamente entre si. Dados relativos ao campo F1 – Fonte: Mallmann et al. (2018). CI<sub>50</sub>, 20 e 10 = concentração de inibição de 50 %, 20 % e 10 % da germinação; IC - intervalos de confiança.

Fonte: Produção da autora, 2020.

### 3 CAPÍTULO 2: VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE ISOLADOS *Gigaspora albida* E *Rhizophagus clarus* A FUNGICIDAS

#### RESUMO

Grupos-chave para várias funções ecossistêmicas, principalmente relacionados ao incremento nutricional das plantas, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) possuem uma variabilidade genética natural entre indivíduos da mesma espécie que pode influenciar na resposta desses organismos, quando expostos à agrotóxicos e outros compostos no solo. Propôs-se nesse estudo, verificar existência de variabilidade na resposta intraespecífica da germinação de esporos de cinco isolados das espécies *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus*, com diferentes origens geográficas quando testada com os fungicidas Clorotalonil, Mancozebe e Metalaxil (nas concentrações de 0, 10, 25, 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup>) e a ácido bórico (0, 100, 250, 500, 750 e 1000 mg kg<sup>-1</sup>), além de avaliar a resposta da espécie *Funneliformis mosseae* (BEG 240), para Clorotalonil e ácido bórico (nas mesmas concentrações). Os resultados dos testes de germinação mostraram concentrações de efeito não observado (CENO)  $\leq 10$  mg kg<sup>-1</sup> para os isolados de *G. albida* e  $< 10$  mg kg<sup>-1</sup> para os isolados de *R. clarus*, para todos os fungicidas testados. No ácido bórico, a CENO variou entre  $< 100$  mg kg<sup>-1</sup> e 250 mg kg<sup>-1</sup> para *G. albida* e foi sempre  $< 100$  mg kg<sup>-1</sup> para os isolados de *R. clarus*. Os valores de concentração de inibição (CI) determinados para cada espécie e isolados (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>), apontaram para a existência de variações no comportamento dos resultados entre isolados da mesma espécie em todas as substâncias testadas, mesmo utilizando-se de método padrão de condução dos ensaios. Em complemento aos resultados de CI<sub>10</sub> estabelecidos para cada espécie, isolados e fungicida, esses valores foram comparados com o valor estimado da Concentração Ambiental Prevista inicial das formulações testadas (originalmente *Predicted Environmental Concentration* – PEC<sub>inicial</sub>), para Clorotalonil (1,98 mg kg<sup>-1</sup>), Mancozebe (3 mg kg<sup>-1</sup>) e para Metalaxil – M (0,16 mg kg<sup>-1</sup>) e, de todos os isolados testados foi possível apontar que o Clorotalonil oferece potencial risco para a germinação do isolado G3 de *G. albida*. Outros isolados tiveram valores de CI<sub>10</sub> bem próximo as PEC<sub>inicial</sub> para Mancozebe (isolado R3) e Metalaxil-M (isolados G2 e G3). Os resultados para *F. mosseae* permitiram o cálculo das CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub> e a CENO foi determinada em  $< 10$  mg kg<sup>-1</sup> para Clorotalonil e  $< 100$  mg kg<sup>-1</sup> para ácido bórico.

**Palavras-chave:** Agrotóxicos. Inibição da germinação. Isolados fúngicos. Risco de exposição.



### 3 CHAPTER 2: INTRASPECIFIC VARIABILITY OF SPORE GERMINATION IN *Gigaspora albida* AND *Rhizophagus clarus* ISOLATES TO FUNGICIDES

#### ABSTRACT

Key groups for various ecosystem functions, mainly related to the nutritional increase of plants, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) have a natural genetic variability between individuals of the same species and that can influence the response of these organisms when exposed to pesticides and other compounds in the soil. This study aimed to verify the existence of response intraspecific variability of spore germination in five *Gigaspora albida* and *Rhizophagus clarus* species isolates, with different geographical origins when tested with the fungicides Chlorothalonil, Mancozeb and Metalaxyl-M (in 0, 10, 25, 50 and 100 mg kg<sup>-1</sup> concentrations) and boric acid (0, 100, 250, 500, 750 and 1000 mg kg<sup>-1</sup>) and in addition to evaluating the response of *Funneliformis mosseae* (BEG 240), for chlorothalonil and boric acid (in the same concentrations). The results of the germination tests showed the no observed effects concentration (NOEC) is  $\leq 10$  mg kg<sup>-1</sup> for *G. albida* isolates and  $< 0$  mg kg<sup>-1</sup> for *R. clarus* isolates. For boric acid, NOEC varied between  $<100$  mg kg<sup>-1</sup> and 250 mg kg<sup>-1</sup> to *G. albida* and it was always  $< 10$  mg kg<sup>-1</sup> for *R. clarus* isolates. The inhibition concentration values (IC) determined for each species and isolates (IC<sub>50</sub>, IC<sub>20</sub> e IC<sub>10</sub>), showed the existence of behavior variations of the results among the isolates of same species, in all tested substances, even using the standard method of conduction of the tests. The IC<sub>10</sub> results established for each species, generation and fungicide were compared with the Predicted Environmental Concentration – PEC<sub>initial</sub> to Chlorothalonil (1,98 mg kg<sup>-1</sup>), Mancozeb (3 mg kg<sup>-1</sup>) and Metalaxyl-M (0,16 mg kg<sup>-1</sup>) and of all the tested isolates, it was possible to point out that Chlorothalonil offers potential risk for the germination of G3 *G. albida* isolate. Other isolates had IC<sub>10</sub> values closely to PEC<sub>initial</sub> estimated for Mancozeb (R3 isolate) and Metalaxyl-M (G2 and G3 isolates). The results for *F. mosseae* allowed the calculation of IC<sub>50</sub>, IC<sub>20</sub> and IC<sub>10</sub> NOEC was determined to be  $<10$  mg kg<sup>-1</sup> for Chlorothalonil and  $<100$  mg kg<sup>-1</sup> for boric acid.

**Key words:** Pesticides. Germination inhibition. Fungal isolates. Risk of exposure.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Os FMAs são grupos-chave na prestação de serviços ecossistêmicos, entre esses e em destaque, estão o incremento nutricional e fitossanidade das plantas (GIANINAZZI et al., 2010; GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2015). Sabe-se que a eficiência simbiótica das espécies de FMAs pode variar entre espécies de FMA distintas ou entre diferentes isolados da mesma espécie (MUNKVOLD et al., 2004; JOHNSON et al., 2012). A nível de indivíduo, a variabilidade genética existente entre indivíduos da mesma espécie (NOVAIS et al., 2017) também pode influenciar em níveis de tolerância ou sensibilidade desses organismos quando expostos à diferentes produtos químicos, incluindo os agrotóxicos (NOVAIS et al., 2019). Além de substâncias distintas, o tipo de sistema experimental adotado, a etapa do ciclo de vida estudada e as espécies/isolados testadas também podem interferir na amplitude da resposta dos fungos (LENOIR; FONTAINE; SAHRAOUI, 2016).

*G. albida* é uma das espécies propostas por Mallmann et al. (2018) para ser utilizada em avaliações ecotoxicológicas envolvendo agrotóxicos. A espécie pertence à Família Gigasporaceae, Ordem Diversisporales de acordo com a classificação para Glomeromycota proposta por Redecker et al. (2013). A espécie foi descrita por Schenck e Smith (1982) e seus esporos são globosos ou subglobosos, com tamanho entre 200 e 280  $\mu\text{m}$ . As paredes dos esporos de *G. albida* são formadas por três camadas, sendo: (1) a mais externa uma camada permanente, lisa e rígida; (2) a camada intermediária é semi-plástica constituída por lâminas que podem se espessar ou aumentar em número com a diferenciação e amadurecimento do esporo e (3) a terceira camada (e mais interna) possui numerosas “verrugas” ou “papilas” em sua superfície interna e, por estar associada a formação de estruturas de germinação é chamada de camada germinativa. Na germinação dos esporos, o tubo germinativo se forma nas proximidades papilas da camada germinativa e cresce através das paredes do esporo (SCHENCK; SMITH, 1982; INVAM, 2017a). Quando em associação micorrízica *G. albida* espécie forma arbúsculo com extremidades finas a partir de uma hifa tronco dilatada, não forma estruturas de armazenamento (vesículas) mas forma, através da diferenciações de hifas externas, as chamadas células auxiliares que, para alguns autores exerce funções semelhantes as vesículas; além disso, possuem a características de produzir micélio/hifa extrarradiculares extensos no solo em relação a outras espécies de FMA (ABBOTT, 1982, BENTIVENGA; MORTON, 1995; CAVAGNARO et al, 2001; INVAM, 2017).

Já *R. clarus*, a segunda espécie proposta para estudos ecotoxicológicos com agrotóxicos, pertence à Família Glomeraceae, Ordem Glomerales, foi descrito por Nicolson e Schenck,

em 1979 e pertencia inicialmente ao gênero *Glomus*. Em 2010, a partir de evidências moleculares, a espécie foi separada de *Glomus* e incluída no gênero *Rhizophagus* (SCHÜBLER; WALKER, 2010). Os esporos de *R. clarus* são formados por três camadas: (1) uma camada externa hialina e mucilaginosa, que se degrada e se desprende do esporo ao longo do seu amadurecimento e geralmente está ausente em esporos maduros; (2) uma camada intermediária, permanente, formada por subcamadas com consistência granular que causam rachaduras e fragmentação da parede do esporo, possui maior espessura em algumas regiões de modo que, visualmente o esporos tenha uma aparência ondulada; (3) uma terceira camada, permanente, geralmente fina, formada por subcamadas que podem se espessar (NICOLSON; SCHENCK, 1979; STÜRMER; MORTON, 1997; INVAM, 2017b). Na germinação, um ou mais tubos germinativos se originam no septo, ou no ponto em que a hifa suspensora se quebra e "emergem" da camada mais interna do esporo. A formação de arbúsculos para associações micorrízicas promovidas por *R. clarus* é mais abundante no início da colonização, há a formação de vesículas e a diferenciação de hifas intraradiculares em esporos não é incomum. Produzem micélio externo às raízes e esporos no solo, mais rapidamente do que *Gigaspora* (NICOLSON; SCHENCK, 1979, ABBOTT, 1982; LEE; EOM, 2015; INVAM, 2017).

Uma vez que, a variabilidade intraespecífica dos FMAs pode interferir na sensibilidade aos agrotóxicos no solo, esta precisa ser considerada e investigada quando pretendemos recomendar isolados de espécies de FMAs para uso em protocolos ecotoxicológicos padronizados. Nesse sentido, propôs-se nesse capítulo, verificar existência de variabilidade na resposta intraespecífica da germinação de esporos das espécies *G. albida* e *R. clarus*, propostas por Mallmann et al. (2018) à agrotóxicos. Adicionalmente, neste capítulo avaliou-se o desempenho da resposta da germinação de *F. mosseae* (isolado BEG 240), recomendada no protocolo ISO 10832:2009 para testes ecotoxicológicos com metais, quando testada com Clorotalonil e a substância de referência.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Dois grupos de experimentos foram realizados, utilizando o protocolo ecotoxicológico proposto por Mallmann et al. (2018). Um grupo de experimentos buscando para avaliar variabilidade intraespecífica da resposta de isolados de *G. albida* e de *R. clarus* à contaminação pelos fungicidas Clorotalonil, Mancozebe e Metalaxil-M e ácido bórico e o outro buscou avaliar a sensibilidade da espécie de referência do protocolo ISO 10832:2009 à fungicida e à substância de referência proposta pelo mesmo estudo. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório

de Ecologia do Solo, da Universidade do Estado de Santa Catarina e se referem a avaliações sobre a germinação dos esporos, parte da fase pré-simbiótica do ciclo de vida dos FMAs.

### **3.2.1 Metodologia comum aos dois grupos de experimentos**

O substrato, bem como o método de montagem, avaliação e desmontagem das unidades experimentais para os dois grupos de experimentos desse capítulo, seguiram exatamente como descrito para os experimentos do Capítulo 1, nos itens 2.2.1.1 e 2.2.1.2. Substâncias testadas, bem como as análises estatísticas empregadas seguiram o proposto no Capítulo 1, nos itens 2.2.2.1 e 2.2.2.3, respectivamente. Especificidades de cada grupo de experimentos desse capítulo são descritos abaixo.

### **3.2.2 Grupo de experimentos 1: Variabilidade intraespecífica da resposta da germinação a fungicidas**

Esse conjunto de experimentos usou como substâncias testes os fungicidas Clorotalonil, Mancozebe e Metalaxil-M e além do ácido bórico como substância de referência. Os efeitos dos fungicidas foram testados em quatro concentrações e mais um controle sem aplicação (0; 10; 25; 50; 100 mg kg<sup>-1</sup> de substrato seco), com seis repetições por tratamento. O ácido bórico foi testado em cinco concentrações e mais um controle sem aplicação (0; 100; 250; 500; 750 e 1000 mg kg<sup>-1</sup> de substrato seco), também com 6 repetições por tratamento. Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento completamente casualizado. Para a contaminação, um gradiente com concentrações crescentes das substâncias foi preparado, diluindo-se uma solução estoque da referida substância em água destilada. A quantidade de solução estoque da substância + água destilada adicionada ao substrato em cada concentração foi calculado de forma a atingir a umidade desejada. As contaminações foram realizadas sempre no dia da montagem do ensaio.

Foram utilizados esporos de 5 isolados de *G. albida* (SCT200A, MGR602C, PRN201A, SCT217A e SCT238B) e outros 5 isolados da espécie *R. clarus* (RJN102A, CNPAB005, SCT720A, 6AmA e NA112A), multiplicados conforme descrito em 2.2.2.2.1. Para esses isolados, atribui-se um código alfanumérico e estabelecemos correspondência desse, com o código original dos isolados testados (Quadro 2). Os esporos utilizados em cada ensaio possuíam idade inferior a 1 ano. Para a obtenção dos resultados referentes aos isolados G1 e R1, não

foram realizados novos ensaios. Utilizou-se os resultados referentes à geração F3 de *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus* apresentados no Capítulo 1.

Quadro 2 - Códigos e informações sobre local e ano de estabelecimento das culturas dos isolados de *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus* testados.

Código	Espécie/Isolado	Localidade/ano de estabelecimento das culturas
G1	<sup>1</sup> <i>Gigaspora albida</i> SCT200A	Dunas marítimas/Praia Santinho, Florianópolis – SC, 2005.
G2	<sup>1</sup> <i>Gigaspora albida</i> MGR602C	Serra do Cipó, Lagoa Santa – MG, 2009.
G3	<sup>1</sup> <i>Gigaspora albida</i> PRN201A	Ilha do Mel, Pontal do Paraná – PR, 2005
G4	<sup>1</sup> <i>Gigaspora albida</i> SCT217A	Dunas marítimas/Praia da Joaquina, Florianópolis – SC, 2005.
G5	<sup>1</sup> <i>Gigaspora albida</i> SCT238B	Dunas marítimas/ Florianópolis – SC, 2005.
R1	<sup>1</sup> <i>Rhizophagus clarus</i> RJN102A	Obtido via CNPAB-UFLA - Flórida, USA. Ano não disponível
R2	<sup>2</sup> <i>Rhizophagus clarus</i> CNPAB005	Local de coleta e ano de estabelecimento desconhecido.
R3	<sup>1</sup> <i>Rhizophagus clarus</i> SCT720A	Pastagem - Navegantes, SC. Ano 2007
R4	<sup>3</sup> <i>Rhizophagus clarus</i> 6Ama	Área de mineração, Morgantown, WV – EUA, 2008.
R5	<sup>3</sup> <i>Rhizophagus clarus</i> NB112A	Local exato desconhecido, Namíbia, 1992.

<sup>1</sup>Isolados provenientes da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota – CICG;

<sup>2</sup>Isolado adquirida junto ao Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner – CRB-JD.

<sup>3</sup>Isolados mantidos no Internacional Culture Collection Of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi – INVAM, cedidos ao Laboratório de Microbiologia/UFSC Curitibanos (via remessa internacional); multiplicados a partir de culturas *in vitro* e fornecidas pela Professora Sonia Purin da Cruz (Laboratório de Microbiologia – UFSC Curitibanos).

### 3.2.3 Grupo de experimentos 2: Resposta da germinação de esporos de *Funneliformis mosseae* a fungicida e substância de referência

Foram utilizados esporos de *Funneliformis mosseae*, isolado BEG 240, adquirido junto ao Banco Internacional de Glomeromycota (<https://www.i-beg.eu/>) isolado de solo agrícola, na Alemanha, em 1993 (IBG, 2019).

A partir do solo-inóculo proveniente do Banco Internacional de Glomeromycota, novos esporos foram multiplicados seguindo o descrito em 2.2.2.2.1. O número de esporos obtido não foi suficiente para realizar ensaios com todas as substâncias descritas no conjunto de experimentos do tópico que trata da variabilidade intraespecífica e por isso selecionamos o Clorotalonil (produto comercial Bravonil Ultrex<sup>®</sup>) e o ácido bórico [H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>]. O Clorotalonil foi testado em quatro concentrações, mais controle sem aplicação (0; 10; 25; 50; 100 mg kg<sup>-1</sup> de substrato seco); e o ácido bórico em cinco concentrações, mais controle sem aplicação (0; 100; 250; 500; 750 e 1000 mg kg<sup>-1</sup> de substrato seco), ambos com 6 repetições por tratamento. Para os ensaios envolvendo essa espécie, adotou-se a temperatura de 24 °C (± 2 °C), originalmente indicada pelo protocolo ISO 10832:2009.

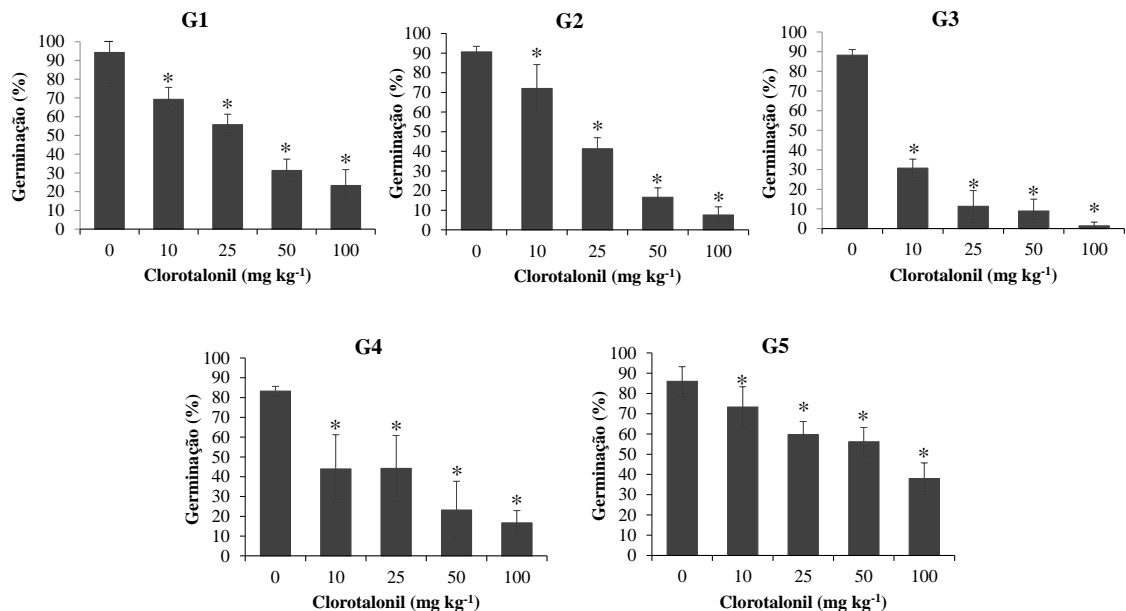
### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Variabilidade intraespecífica da resposta da germinação a fungicidas

##### 3.3.1.1 *Gigaspora albida*

Todos os ensaios realizados para os isolados de *G. albida* tiveram seus resultados considerados válidos, com germinação maior que 80 % nos tratamentos controle conforme Mallmann et al. (2018). A germinação de esporos apresentou efeito de redução já na menor concentração de Clorotalonil testada (10 mg kg<sup>-1</sup>). Resultados para Clorotalonil mostraram através de Teste de Dunnett (Figura 12) e em função disso a concentração de efeito não observado (CENO) foi definida como < 10 mg kg<sup>-1</sup>, para esse fungicida. Para Mancozebe, isolados G1, G2, G3 e G4, os resultados indicam que efeitos sobre a inibição da germinação ocorreram em concentrações menores do que 10 mg kg<sup>-1</sup>, logo, a CENO foi igualmente determinada como <10 mg kg<sup>-1</sup>. O isolado G5 apresentou efeito do agrotóxico a partir da segunda concentração testada (25 mg kg<sup>-1</sup>) e a CENO foi estimada em 10 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 13).

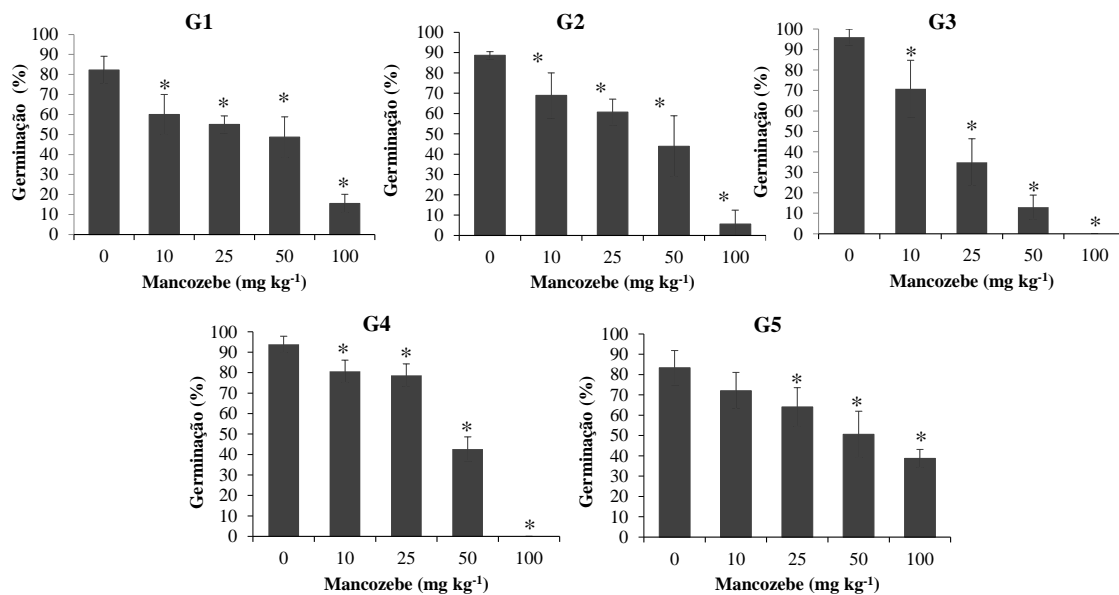
Figura 12 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de *Gigaspora albida*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil.



G1, G2, G3, G4 e G5 – indicam isolados diferentes da espécie *Gigaspora albida*. Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão.

Fonte: Produção da autora, 2020.

Figura 13 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de *Gigaspora albida*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Mancozebe.



G1, G2, G3, G4 e G5 – indicam isolados diferentes da espécie *Gigaspora albida*. Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão.

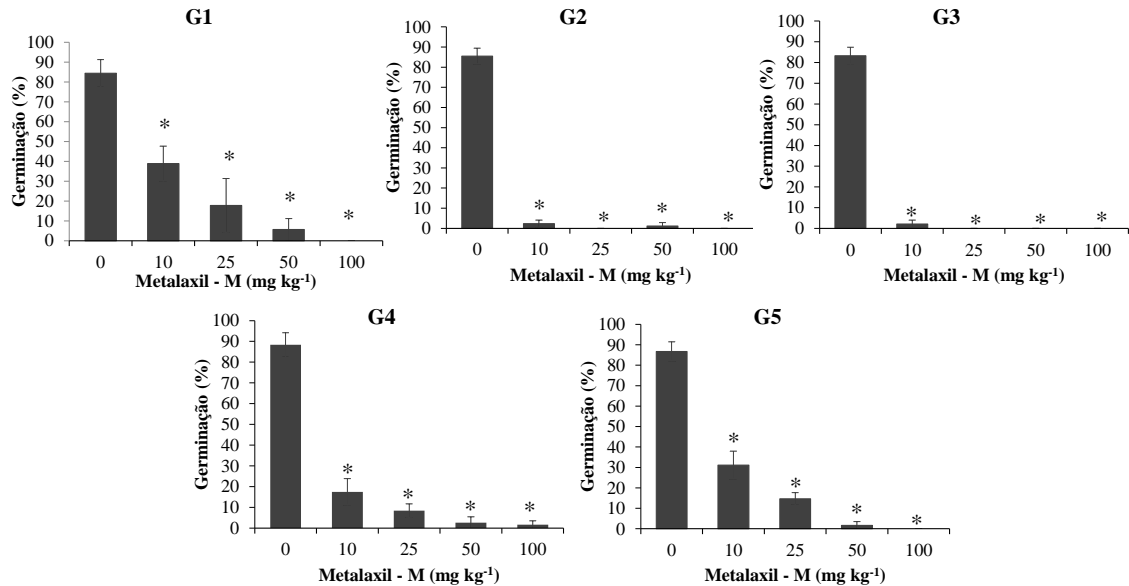
Fonte: Produção da autora, 2020.

Quando testados com Metalaxil-M, os efeitos sobre a germinação ficaram evidentes a partir da menor concentração testada para todos os isolados e a CENO foi estimada como  $< 10 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figura 14). E, para o ácido bórico, as concentrações CENO foram de  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  para o isolado G1 e  $< 100 \text{ mg kg}^{-1}$  para os demais isolados testados (Figura 15).

Os resultados da comparação por Tukey entre os valores de  $CI_{50}$  (Figura 16),  $CI_{20}$  (Figura 17) e  $CI_{10}$  (Figura 18) indicaram que para Clorotalonil os isolados G1, G2, G3 e G4 apresentaram o mesmo comportamento de resposta diferindo, estatisticamente, do isolado G5. Para Mancozebe o isolado G5 apresentou os maiores valores de CIs calculados ( $CI_{50}=90,7$ ,  $CI_{20}= 36,3$  e  $CI_{10}= 18,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) dentre os 5 isolados testados e diferiu estatisticamente do isolado G3 (que apresentou os menores valores de CI). Isolados G1, G2 e G4, para  $CI_{50}$ , apresentaram comportamentos de resposta iguais entre si, porém, com valores de CI intermediários e estatisticamente diferentes de G3 e G5. Para  $CI_{20}$  e  $CI_{10}$ , os isolados G1, G2 e G4, tiveram comportamento equivalente ou ao isolado G3 ou ao isolado G5. O Metalaxil-M foi o agrotóxico que apresentou os menores valores de CIs entre os três testados. O isolado G1 apresentou os maiores valores de CI e diferiu estatisticamente dos isolados G2 e G3 que apresentaram os menores valores de CI entre os isolados testados. Isolados G4 e G5 apresentaram valores de CIs intermediários que, estatisticamente se equivaleram ao isolado G1 ou aos isolados G2 e G3. Não houve diferença estatística significativa entre os valores das três

classes de CI determinadas para ácido bórico. Todos os valores de valores de CI determinados para as gerações de *G. albida*, seus intervalos de confiança e modelo estatístico empregado são apresentados na Tabela 4, no APÊNDICE B.

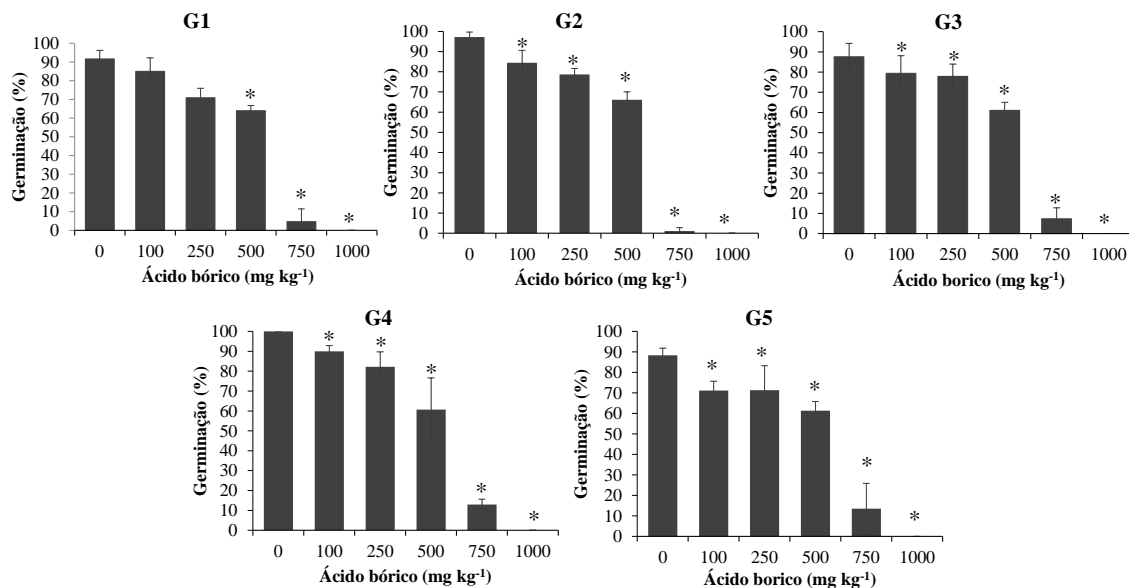
Figura 14 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de *Gigaspora albida*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Metalaxil-M.



G1, G2, G3, G4 e G5 – indicam isolados diferentes da espécie *Gigaspora albida*. Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão.

Fonte: Produção da autora, 2020.

Figura 15 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de *Gigaspora albida*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Ácido bórico.

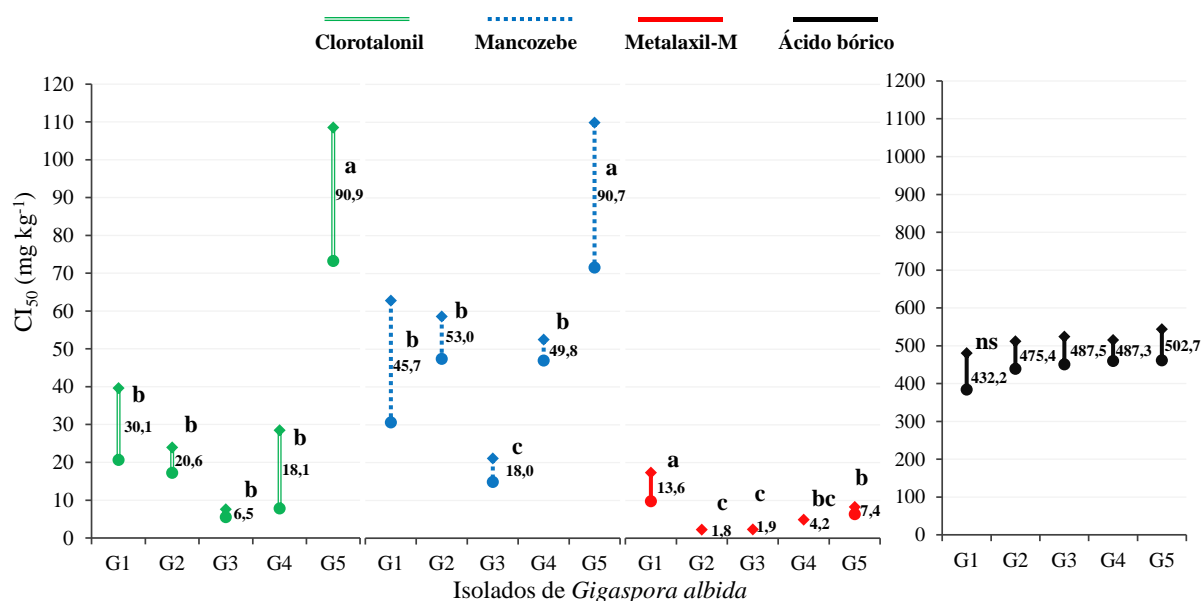


G1, G2, G3, G4 e G5 – indicam isolados diferentes da espécie *Gigaspora albida*. Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão.

Fonte: Produção da autora, 2020.



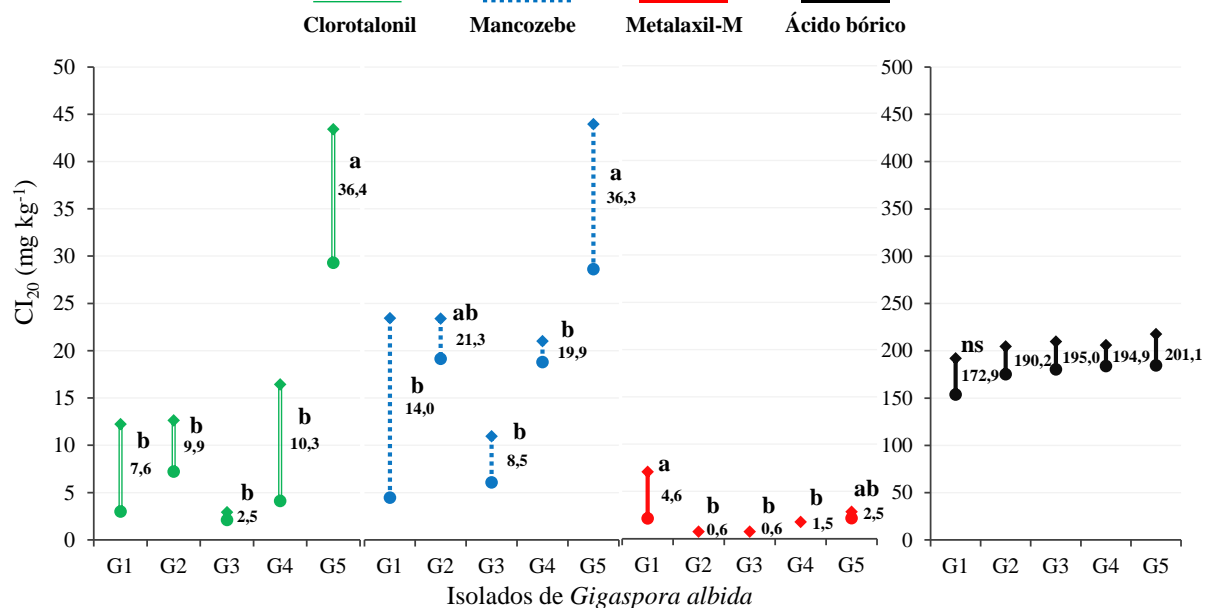
Figura 16 - Valores de concentração de inibição de 50 % da germinação (CI<sub>50</sub>) e intervalo de confiança superior (♦) e inferior (●) para os diferentes isolados de *Gigaspora albida* testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



G1, G2, G3, G4 e G5 – indicam isolados diferentes da espécie *Gigaspora albida*. Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns – valores de CI não diferem estatisticamente entre si.

Fonte: Produção da autora, 2020.

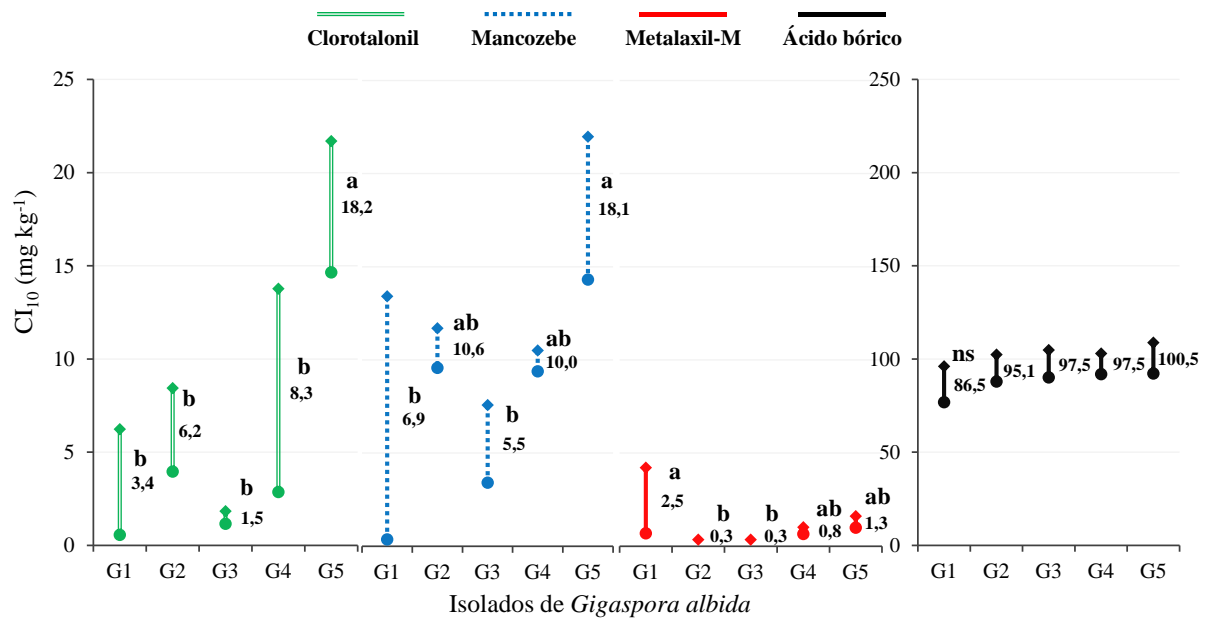
Figura 17 - Valores de concentração de inibição de 20 % da germinação (CI<sub>20</sub>) e intervalo de confiança superior (♦) e inferior (●) para os diferentes isolados de *Gigaspora albida* testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



G1, G2, G3, G4 e G5 – indicam isolados diferentes da espécie *Gigaspora albida*. Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns – valores de CI não diferem estatisticamente entre si.

Fonte: Produção da autora, 2020.

Figura 18 - Valores de concentração de inibição de 10 % da germinação ( $CI_{10}$ ) e intervalo de confiança superior ( $\blacklozenge$ ) e inferior ( $\bullet$ ) para os diferentes isolados de *Gigaspora albida* testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



G1, G2, G3, G4 e G5 – indicam isolados diferentes da espécie *Gigaspora albida*. Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns – valores de CI não diferem estatisticamente entre si.

Fonte: Produção da autora, 2020.

### 3.3.1.2 *Rhizopagus clarus*

Todos os ensaios realizados com isolados de *R. clarus* apresentaram germinação maior que 75 % nos tratamentos controle, tornando os resultados válidos.

Os resultados indicaram que o Clorotalonil (Figura 19/Figura 12), o Mancozebe (Figura 20) e o Metalaxil-M (Figura 21) causaram efeito de inibição da germinação em concentrações menores do que  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , através do Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Em função disso, a CENO foi determinada como  $< 10 \text{ mg kg}^{-1}$  para todos os fungicidas. O ácido bórico apresentou concentrações CENO  $< 100 \text{ mg kg}^{-1}$  para todos os isolados demais isolados testados (Figura 22).

Quando comparadas por Tukey ( $p < 0,05$ ), os isolados R1, R3 e R4 apresentaram valores de  $CI_{50}$  estatisticamente equivalentes entre si e diferentes de R2 para Clorotalonil (Figura 23). Os isolados R3 e R4 apresentaram comportamentos de resposta estatisticamente iguais entre si para  $CI_{20}$  e diferiram do isolado R5. Ainda para  $CI_{20}$  os isolados R3 e R4 equivaleram estatisticamente ao isolado R1 e este, equivalente ao R2 (Figura 24). Para o valor de  $CI_{10}$

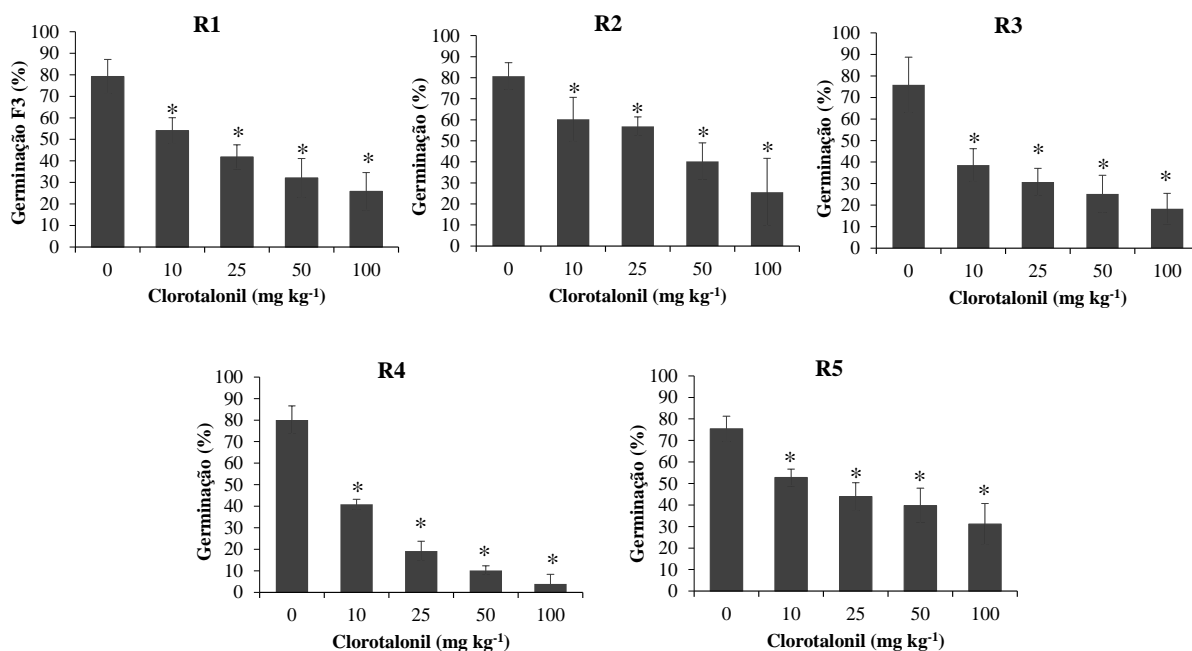
determinado, o isolado R3 apresentou comportamento intermediário entre os isolados R1, R2 e R5 que se equivaleram e diferiram estatisticamente do isolado R4 (Figura 25).

Para Mancozebe em todas as CIs determinadas, os isolados R3 e R4 tiveram valores que se equivaleram, mas que diferiram estatisticamente de R2. Os isolados R1 e R5 apresentaram comportamento de resultados equivalentes ou aos isolados R3 e R4 ou ao isolado R2. Nos resultados para Metalaxil-M, o isolado R5 apresentou o maior valor de  $CI_{50}$  diferindo estatisticamente do isolado R3, enquanto os isolados R1, R2 e R4, apresentaram valores de  $CI_{50}$  intermediários à R5 e R3 (Figura 23). Para os valores de  $CI_{20}$  e  $CI_{10}$  não houve diferenças estatísticas significativas entre os isolados (Figura 24 e Figura 25).

O ácido bórico foi a única entre as substâncias testadas que não apresentou diferença estatística significativa entre os valores das três classes de CI determinadas, assim como aconteceu para a substância em *G. albida*.

Todos os valores de valores de CI determinados para as gerações de *G. albida*, seus intervalos de confiança e modelo estatístico empregado são apresentados na Tabela 5, no APÊNDICE B.

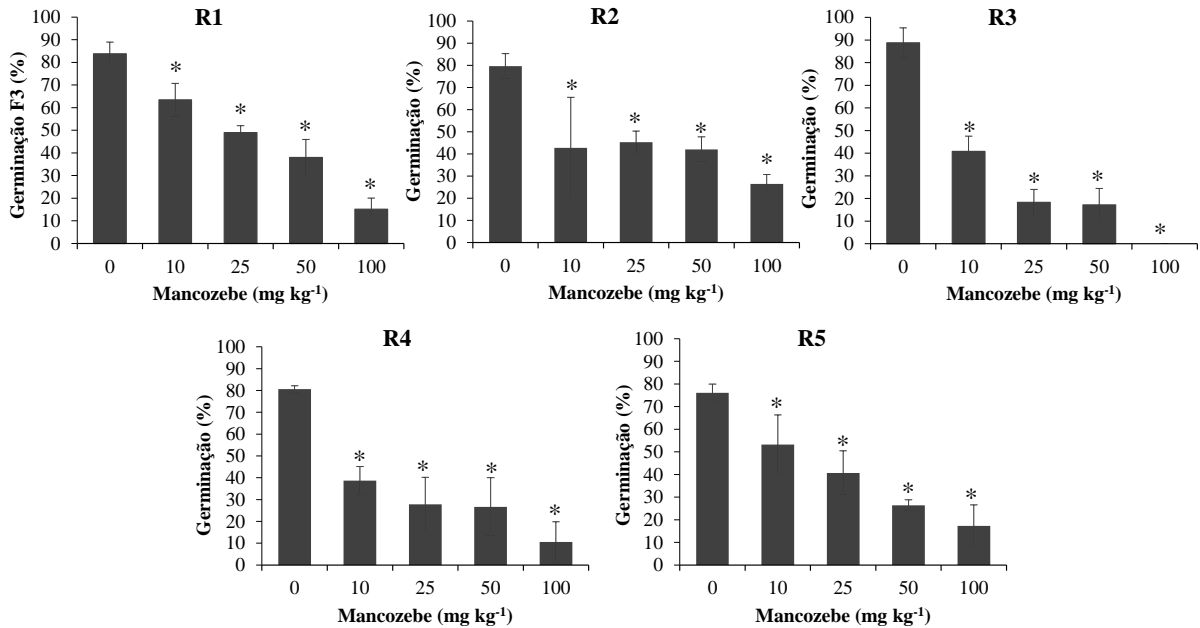
Figura 19 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de *Rhizophagus clarus*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil.



R1, R2, R3, R4 e R5 – indicam isolados diferentes da espécie *Rhizophagus clarus*. Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão.

Fonte: Produção da autora, 2020.

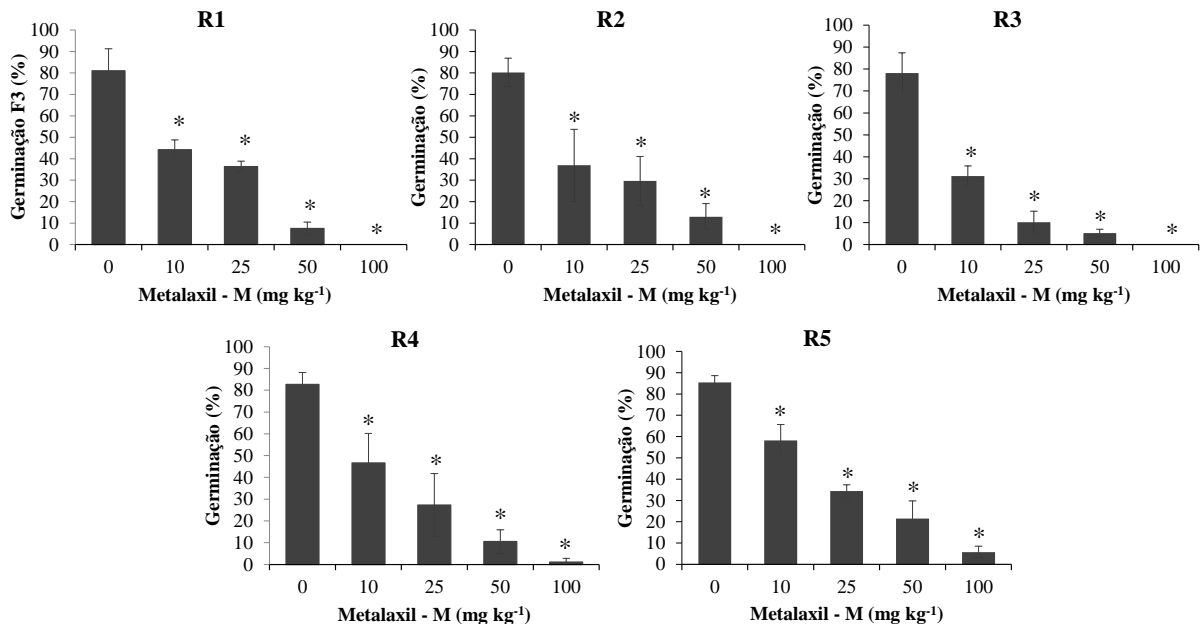
Figura 20 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de *Rhizophagus clarus*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Mancozebe.



R1, R2, R3, R4 e R5 – indicam isolados diferentes da espécie *Rhizophagus clarus*. Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão.

Fonte: Produção da autora, 2020.

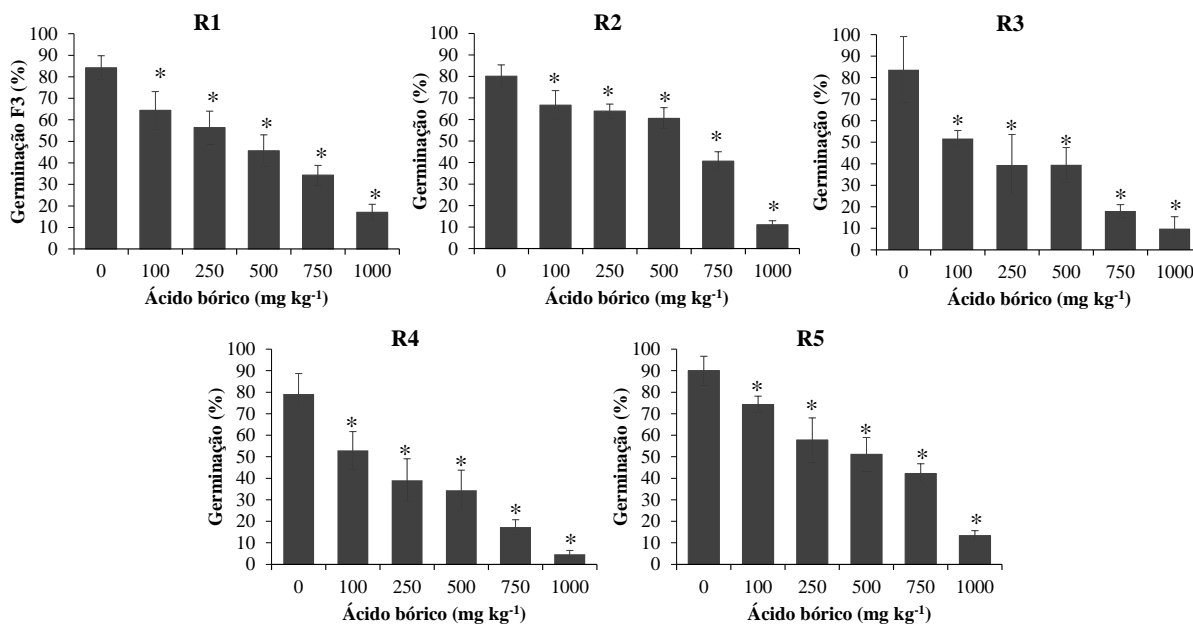
Figura 21 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de *Rhizophagus clarus*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Metalaxil-M.



R1, R2, R3, R4 e R5 – indicam isolados diferentes da espécie *Rhizophagus clarus*. Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão.

Fonte: Produção da autora, 2020.

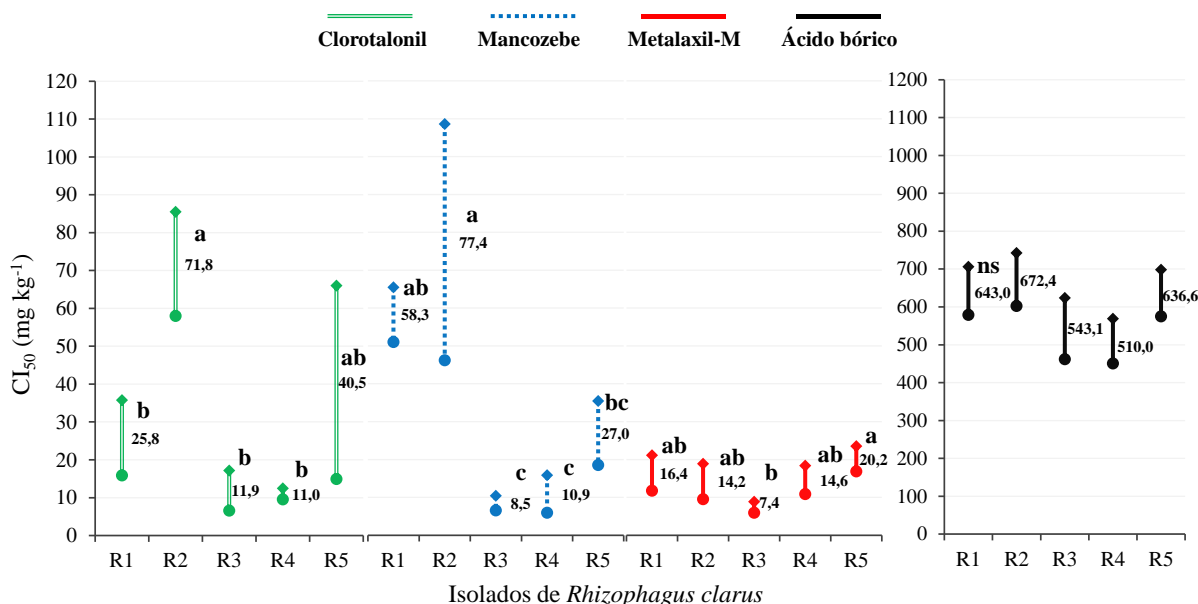
Figura 22 - Percentual de germinação dos esporos para os diferentes isolados de *Rhizophagus clarus*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Ácido bórico.



R1, R2, R3, R4 e R5 – indicam isolados diferentes da espécie *Rhizophagus clarus*. Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\tau$  – desvio padrão.

Fonte: Produção da autora, 2020.

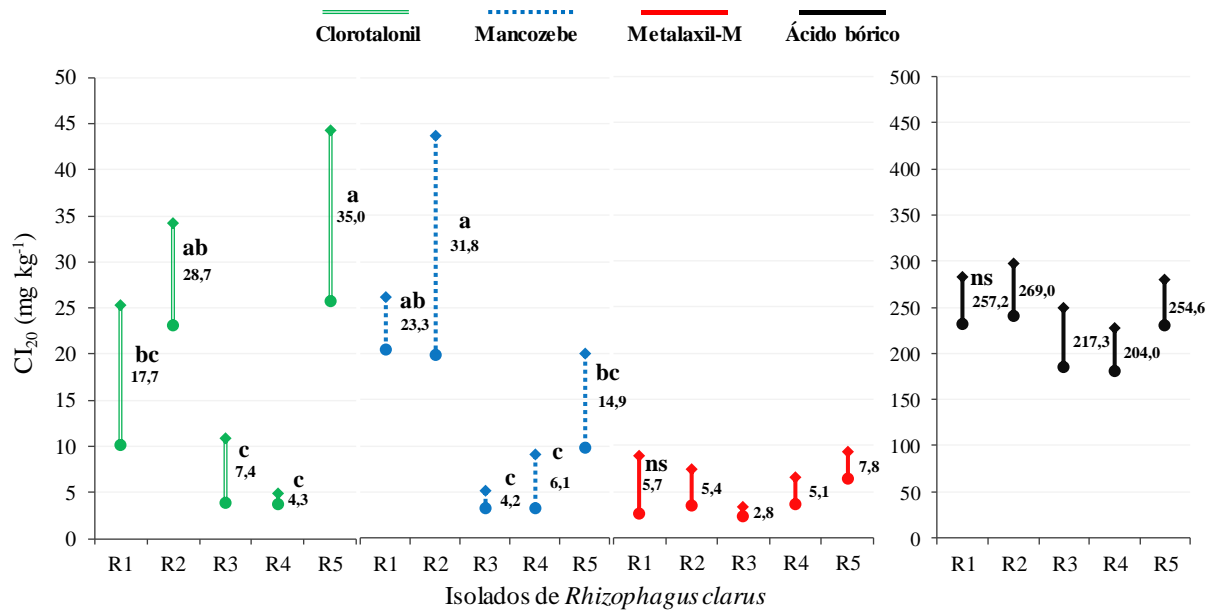
Figura 23 - Valores de concentração de inibição de 50 % da germinação (CI<sub>50</sub>) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para os diferentes isolados de *Rhizophagus clarus* testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



R1, R2, R3, R4 e R5 – indicam isolados diferentes da espécie *Rhizophagus clarus*. Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns – valores de CI não diferem estatisticamente entre si.

Fonte: Produção da autora, 2020.

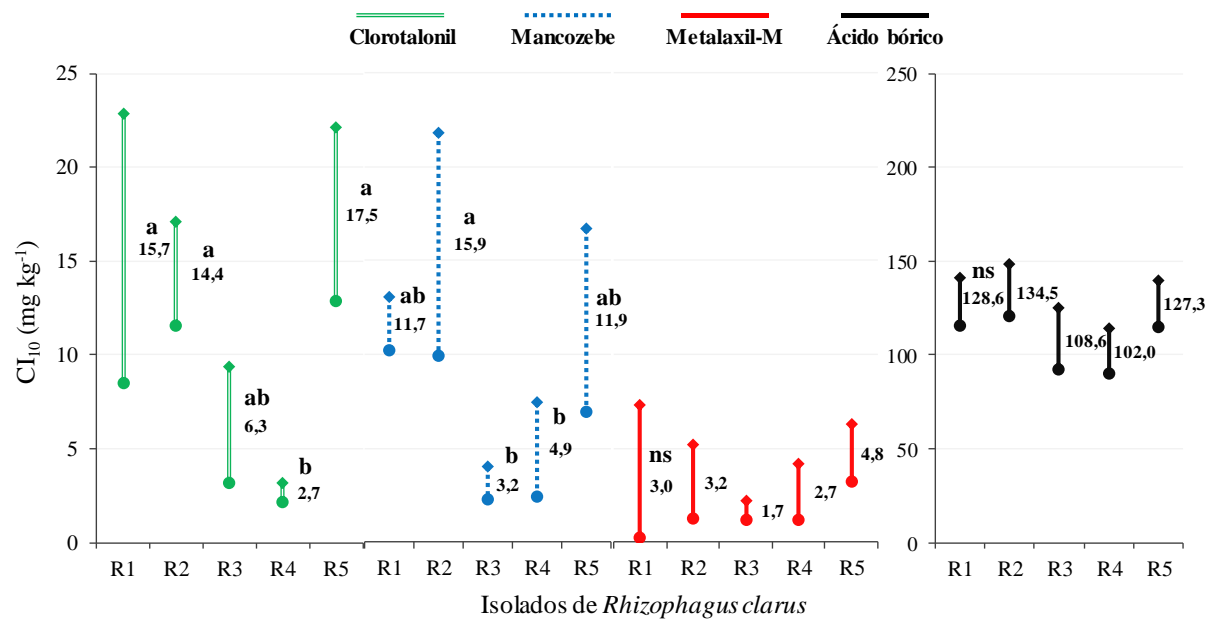
Figura 24 - Valores de concentração de inibição de 20 % da germinação (CI<sub>20</sub>) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para os diferentes isolados de *Rhizophagus clarus* testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



R1, R2, R3, R4 e R5 – indicam isolados diferentes da espécie *Rhizophagus clarus*. Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns – valores de CI não diferem estatisticamente entre si.

Fonte: Produção da autora, 2020.

Figura 25 - Valores de concentração de inibição de 10 % da germinação (CI<sub>10</sub>) e intervalo de confiança superior (◆) e inferior (●) para os diferentes isolados de *Rhizophagus clarus* testados em SAT contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.



R1, R2, R3, R4 e R5 – indicam isolados diferentes da espécie *Rhizophagus clarus*. Para a mesma cor de barras, letras diferentes acima dos valores de CI, indicam que esses diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns – valores de CI não diferem estatisticamente entre si.

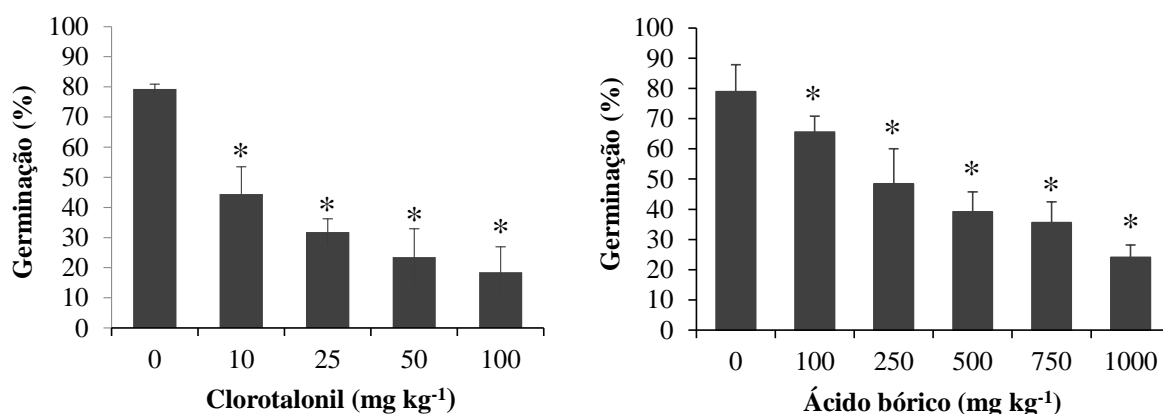
Fonte: Produção da autora, 2020

### 3.3.2 Espécie de referência do protocolo ISO 10832:2009

Os ensaios para *F. mosseae*, apresentaram mais do que 75 % de germinação nos tratamentos controle, validando os ensaios e mostraram que tanto o Clorotalonil, quanto o ácido bórico causaram efeito já na menor concentração testada (10 mg kg<sup>-1</sup> para Clorotalonil e 100 mg kg<sup>-1</sup> para ácido bórico) e em função disso a CENO para esses ensaios é < 10 mg kg<sup>-1</sup> para Clorotalonil e < 100 mg kg<sup>-1</sup> para ácido bórico. A Figura 26 apresenta os resultados para esses dois ensaios.

Para Clorotalonil a CI<sub>50</sub> foi determinada em 14,2 [9,8 - 18,5], a CI<sub>20</sub> em 8,3 [5,6 - 11,12] e a CI<sub>10</sub> em 6,9 [4,4 - 9,4] mg kg<sup>-1</sup>. O ensaio com ácido bórico gerou as seguintes CIs: CI<sub>50</sub> de 463,5 [327,7 - 599,3], CI<sub>20</sub> de 282,7 [243,4 - 322,0] e CI<sub>10</sub> de 141,3 [121,7 - 161,0] mg kg<sup>-1</sup>.

Figura 26 - Percentual de germinação dos esporos de *Funneliformis mosseae* testados em Clorotalonil e ácido bórico.



Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão. Fonte: Produção da autora, 2020.

## 3.4 DISCUSSÃO

### 3.4.1 Variabilidade intraespecífica da resposta da germinação a fungicidas

As análises estatísticas indicaram para os ensaios realizados com fungicidas que existe variabilidade intraespecífica da resposta entre os isolados testados tanto de *G. albida* quanto de *R. clarus*. As variações das respostas para os fungicidas também não seguiram nenhum padrão. Houve uma alternância onde um isolado foi mais suscetível aos efeitos de determinada substância e menos suscetível que outro, para outra substância. Para alguns isolados, como os isolados G1, G4 e G5 de *G. albida*, levantou-se a possibilidade de haver maior proximidade da

resposta de germinação, por estes compartilharem características comuns de origem e tempo de manutenção em culturas (os três foram isolados a partir de dunas marítimas do mesmo município: Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, coletados e mantidos em culturas desde 2005) (Quadro 2). Compartilhar essas características comuns pode ter influenciado nas respostas de G1 e G4, mas não influenciou na resposta desses dois em relação ao isolado G5, pois diferenças estatísticas significativas foram encontradas entre esses isolados.

É interessante observar que, embora exista para os fungicidas, a germinação dos esporos não apresenta variabilidade intraespecífica nos testes com ácido bórico. Esse ponto pode ter como possível explicação o modo de ação distintos das substâncias, que já foi comentado no Capítulo 1. O ácido bórico manteve uma variação menor da resposta, possivelmente porque age em um sítio metabólico específico, diferentemente dos fungicidas testados que tem como características poder atuar em sítios metabólicos distintos (Clorotalonil e Mancozebe tem modo de ação multi-sítio; Metalaxil age na síntese de ácidos nucléicos, provocando desbalanço na produção de proteínas) (BRASIL, 2017; EPA, 2020). O ácido bórico que se acumula nas células fúngicas, associados à carboidratos e pode provocar alterações em funções metabólicas relacionadas à utilização dessas substâncias pelo esporo (LEHTO et al., 2004; NEHLS et al., 2010; LAVOLA; APHALO; LEHTO, 2011). Como o processo de germinação utiliza como fonte de energia as reservas do próprio esporo, é provável então, que o B absorvido na forma de ácido bórico utilizado na contaminação do substrato-teste, tenha se acumulado nas células fúngicas e provocado alterações metabólicas inibindo a utilização dos carboidratos fúngicos como energia para germinação. De todo modo, esses resultados reforçam o uso do ácido bórico como substância de referência para os ensaios ecotoxicológicos envolvendo FMAs.

A existência de variação genética entre isolados de uma mesma espécie pode ser a responsável pelas diferenças da sensibilidade da resposta às substâncias testadas. Essa variação (ou diversidade) genética dentro das espécies ou entre isolados é resultado da estrutura genética dos FMAs, que possui fortes evidências de ser "multi-genômica". A evidência sustenta que as centenas e/ou milhares de núcleos dentro de um único esporo e os dispersos pelo micélio cenocítico dos FMAs não são geneticamente idênticos (KUHN; HIJRI; SANDERS, 2001; EHINGER et al, 2012) e que a existência de isolados FMA geneticamente diferentes podem influenciar em sua capacidade de sobrevivência no ambiente (COLARD; ANGELARD; SANDERS, 2011; LENOIR; FONTAINE; SAHRAOUI, 2016).

Mas como a variabilidade da resposta intraespecífica dos FMAs pode implicar no seu uso como indicador do efeito de agrotóxicos no solo, dentro do contexto de análise de risco? Ao considerar-se apenas a resposta direta da germinação para identificar o potencial risco de



um agrotóxico para os FMAs, a variação de resultados irá implicar na decisão haver ou não risco de exposição à formulação para esse grupo de organismos não-alvo.

Tem-se por exemplo, o conjunto das  $CI_{10}$  geradas para os isolados de *G. albida* testados com Clorotalonil. Apenas o isolado G3 teve  $CI_{10}$  (magnitude de efeito utilizada pela EFSA) calculada abaixo do valor de PEC para o Clorotalonil ( $PEC_{inicial} = 1,98 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Nessas condições, para esse único isolado a  $CI_{10}$  (que foi de  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) indica o potencial do risco desse fungicida enquanto para os outros quatro isolados testados, o Clorotalonil não oferece risco.

Para Mancozebe ( $PEC_{inicial} = 3 \text{ mg kg}^{-1}$ ), nenhum isolado teve valor de  $CI_{10}$  menor do que a PEC, mas, o isolado R3 apresentou  $CI_{10}$  de  $3,2 \text{ mg kg}^{-1}$ , valor bem próximo à PEC e poderia ser potencialmente afetado pela presença desse produto no ambiente; os outros quatro isolados, não indicaram esse potencial efeito. O mesmo ocorreu para Metalaxil-M, que teve a PEC calculada em  $0,16 \text{ mg kg}^{-1}$  e os isolados G2 e G3 tiveram valores de  $CI_{10}$  de  $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ . A proximidade dos valores, podendo gerar dúvidas a respeito de condições seguras de exposição à substância, enquanto os demais isolados não gerariam essa dúvida.

Se a existência de variabilidade genética e consequente variação nas respostas fenotípicas é uma realidade para os FMAs, como contornar a necessidade de padronização na obtenção dos resultados, fortemente defendida para baterias de ensaios ecotoxicológicos em uma análise de risco? É preciso não interpretar a resposta da germinação como uma resposta definitiva do risco das substâncias sobre todo o grupo-chave. A fase pré-simbiótica, representa uma etapa do ciclo de vida desses organismos obrigatoriamente simbiotes e como tal, é possível considerar a utilização das respostas obtidas nesses ensaios de laboratório como base para ensaios mais elaborados e que englobem também a fase simbiótica dos FMAs.

### 3.4.2 Espécie de referência do protocolo ISO 10832:2009

No que diz respeito à magnitude dos efeitos para *F. mosseae*, para Clorotalonil as respostas foram bastante próximas aquelas obtidas para o isolado R3 e para o ácido bórico, se assemelharam mais aos valores obtidos pelos isolados de *G. albida* embora, taxonomicamente *F. mosseae* se aproxime mais de *R. clarus* (ambas pertencem a família Glomeraceae). Relacionando o valor de  $CI_{10}$  ( $6,7 \text{ mg kg}^{-1}$ ) com o valor de  $PEC_{inicial}$  do Clorotalonil ( $1,98 \text{ mg kg}^{-1}$ ) concentração de efeito no isolado é pelo menos 3 vezes maior do que a de exposição no ambiente, indicando, possivelmente, ausência de risco dessa substância para *F. mosseae*.

### 3.5 CONCLUSÃO

As respostas dos diferentes isolados testados de *G. albida* e de *R. clarus*, mantidas as condições padrão de condução dos ensaios indicam que a variabilidade intraespecífica influencia na resposta de germinação dessas espécies/isolados para os agrotóxicos testados, mas não influencia na sua resposta à substância de referência

Embora não tenha sido testada para avaliações com agrotóxicos no protocolo ISO 10832:2009, *F. mosseae* respondeu ao agrotóxico testado e à substância de referência, permitindo que se determinassem todas as concentrações de efeito assim como *G. albida* e *R. clarus*.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, L. K. Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. **Aust. J. Bot.**, v. 30, p. 485 - 499, 1982.  
doi: <https://doi.org/10.1071/BT9820485>

ANTUNES, P.M., et al. Evidence for functional divergence in arbuscular mycorrhizal fungi from contrasting climatic origins. **New Phytologist**, v. 189, p. 507–514, 2011.  
doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03480.x>.

BENTIVENGA, S. P.; MORTON, J. B. A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. **Mycologia**, v. 87, p. 719–731, 1995.  
doi: <https://doi.org/10.1080/00275514.1995.12026590>

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. COORDENAÇÃO-GERAL DE AGROQUÍMICOS E AFINS. **Ato n° 45**, de 09 de junho de 2017. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/ATO45\\_DE09DEJUNHODE2017.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/ATO45_DE09DEJUNHODE2017.pdf). Acesso em: 18 dezembro de 2019.

CAVAGNARO, T. R. et al. Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. **New Phytol.**, v. 151, p. 469–475, 2001. doi: <https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00191.x>

CICG - COLEÇÃO INTERNACIONAL DE CULTURA DE GLOMEROMYCOTA. Blumenau, SC, Brasil. Disponível em: <https://sites.google.com/site/cicgfma/home>

CRB-JD - CENTRO DE RECURSOS BIOLÓGICOS JOHANNA DÖBEREINER. **Lista de linhagens de fungos micorrízicos no CRB-JD**. Embrapa Agrobiologia. Seropédica, RJ, Brasil. Disponível em <https://www.embrapa.br/agrobiologia/crb-jd>

COLARD, A.; ANGELARD, C.; SANDERS, I. R. Genetic exchange in an arbuscular mycorrhizal fungus results in increased rice growth and altered mycorrhiza-specific gene transcription. **Appl Environ Microbiol.**, v. 77, p. 6510- 6515, 2011.  
doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.05696-11>

EHINGER, M.O.; CROLL, D.; KOCH, A.M.; SANDERS, I.R. Significant genetic and phenotypic changes arising from clonal growth of a single spore of an arbuscular mycorrhizal fungus over multiple generations. **New Phytologist**, v. 196, p. 853-861, 2012.  
doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04278.x>

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Common and trade names of select fungicides currently registered in the United States. disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/how-search-information-about-pesticide-ingredients-and-labels#PPLS>. Acesso em: 05 de janeiro de 2020.

GIANINAZZI, S. et al. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. **Mycorrhiza**, v. 20, n.8, p.519-530, 2010. doi: <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>

GIOVANNETTI, M.; AVIO, L.; SBRANA, C. Functional significance of anastomosis in arbuscular mycorrhizal networks. In: **Mycorrhizal Networks**. Springer, Dordrecht, pp. 41–67.

IBG - The International Bank for the Glomeromycota. **Culture database: BEG core**. Dijon, Franca. Disponível em: <https://www.i-beg.eu/cultures/BEG240.htm>. Acesso em: 27 Nov. 2019.

INVAM – INTERNACIONAL CULTURE COLLECTION OF (VESICULAR) ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. ***Gigaspora albida* (reference accession BR214)**. Davis College of Agriculture, Natural Resources and Design. Morgantown, West Virginia, EUA. 2017a. Disponível em: <https://invam.wvu.edu/fungi/taxonomy/gigasporaceae/gigaspora/albida.html>. Acesso em 13 de dezembro de 2019.

INVAM – INTERNACIONAL CULTURE COLLECTION OF (VESICULAR) ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. ***Rhizophagus clarus* (reference accession FL979A)**. Davis College of Agriculture, Natural Resources and Design. Morgantown, West Virginia, EUA. 2017. Disponível em: <http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/rhizophagus/clarum.html>. Acesso em 13 de dezembro de 2019.

INVAM – INTERNACIONAL CULTURE COLLECTION OF (VESICULAR) ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. **INVAM Accessions**. Davis College of Agriculture, Natural Resources and Design. Morgantown, West Virginia, EUA. 2020. Disponível em: <https://invam.wvu.edu/culture-methods/culture-search>. Acesso em 05 de janeiro de 2020.

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

JOHNSON, D. et al. The importance of individuals: intraspecific diversity of mycorrhizal plants and fungi in ecosystems. *New Phytologist*, v. 194, p. 614–628, 2012. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04087.x>

KUHN, G.; HIJRI, M.; SANDERS, I. R. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, v 414 p. 745- 758, 2001.  
doi: <https://doi.org/10.1038/414745a>

LAVOLA, A.; APHALO, P.J.; LEHTO, T. Boron and other elements in sporophores of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi. ***Mycorrhiza***, v. 21, p. 155–165, 2011.  
doi: <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0321-7>

LEE, E.H.; EO, J.K.; KA, K.H.; EOM, A.H. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Roles in Ecosystems. ***Mycobiology***, v. 41, p. 121-125, 2013.  
doi: <https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.3.121>

LEE, E. H.; EOM, A. H. Growth characteristics of *Rhizophagus clarus* strains and their effects on the growth of host plants. ***Mycobiology***, v. 43, n. 4, p. 444 - 449, 2015.  
doi: <https://doi.org/10.5941/myco.2015.43.4.444>

LEHTO, T.; LAVOLA, A.; KALLIO, E.; APHALO, J.P. Boron uptake by ectomycorrhizas of silver birch. ***Mycorrhiza***, v. 14, p. 209–212, 2004. doi: <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0290-1>

LENOIR, I.; FONTAINE, J.; SAHRAOUI, A.L.H. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: a review. *Phytochemistry* 123, 4–15. 2016.  
doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.002>

MALLMANN, G.C. et al. Placing arbuscular mycorrhizal fungi on the risk assessment test battery of plant protection products (PPPs). ***Ecotoxicology***. 27, 809–818, 2018.  
doi:10.1007/s10646-018-1946-0

MUNKVOLD, L.; KJØLLER, R.; VESTBERG, M.; ROSENDAHL, S.; JAKOBSEN, I. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. ***New Phytologist***, v. 164, p. 357–364, 2004. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01169.x>

NEHLS, U. et al. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. ***Plant Biology***, v. 12, n. 2, p. 292–301, 2010. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00312.x>

NICOLSON, T. H.; SCHENCK, N. C. Endogonaceous mycorrhizal endophytes in Florida. ***Mycologia***, v. 71, n. 1, p. 178-198, 1979.  
doi: <https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12020997>

NOVAIS, C. B. et al . Compatibility and incompatibility in hyphal anastomosis of arbuscular mycorrhizal fungi. **Sci. agric.**, v. 74, n. 5, p. 411-416, 2017.  
doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0243>.

NOVAIS, C. B. et al. Interconnectedness, length and viability of arbuscular mycorrhizal mycelium as affected by selected herbicides and fungicides. **Appl Soil Ecol.**, v. 143, p. 144-152, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.06.013>

REDECKER, D. et al 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **Mycorrhiza**, v. 23, p. 515-531. doi:10.1007/s00572-013-0486-y.

SCHENCK, N. C.; SMITH, G. S. Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida. **Mycologia**, v. 74, n. 1, p. 77-92, 1982.  
doi: <https://doi.org/10.2307/3792631>

SCHÜBLER, A.; WALKER, C. The Glomeromycota. **A species list with new families and new genera**. Gloucester, p. 1-56, 2010.

STÜRMER, S. L.; MORTON, J. B. Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus*. **Mycologia**, v. 89, p. 72–81, 1997.  
doi: <https://doi.org/10.1080/00275514.1997.12026756>

## APÊNDICE B

Tabela 4 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para os diferentes isolados de *Gigaspora albida*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.

Substância / Isolado	CENO	CI <sub>50</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>20</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>10</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico
<b>Clorotalonil</b>				
G1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>30,1<sup>b</sup></b> [20,7 - 39,6] Exponencial	<b>7,6<sup>b</sup></b> [3,0 - 12,2] Logístico	<b>3,4<sup>b</sup></b> [0,6 - 6,2] Logístico
G2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>20,6<sup>b</sup></b> [17,3 - 24,0] Logístico	<b>9,9<sup>b</sup></b> [7,2 - 12,6] Logístico	<b>6,2<sup>b</sup></b> [4,0 - 8,4] Logístico
G3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>6,5<sup>b</sup></b> [5,54 - 7,6] Exponencial	<b>2,5<sup>b</sup></b> [2,1 - 2,9] Exponencial	<b>1,5<sup>b</sup></b> [1,2 - 1,8] Exponencial
G4	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>18,1<sup>b</sup></b> [7,8 - 28,4] Exponencial	<b>10,3<sup>b</sup></b> [4,1 - 16,4] Exponencial	<b>8,3<sup>b</sup></b> [2,9 - 13,8] Exponencial
G5	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>90,9<sup>a</sup></b> [73,2 - 108,5] Linear	<b>36,4<sup>a</sup></b> [29,3 - 43,4] Linear	<b>18,2<sup>a</sup></b> [14,7 - 21,7] Linear
<b>Mancozebe</b>				
G1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>45,7<sup>b</sup></b> [30,6 - 62,9] Logístico	<b>14,0<sup>b</sup></b> [4,5 - 23,4] Logístico	<b>6,9<sup>b</sup></b> [0,4 - 13,4] Logístico
G2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>53,0<sup>b</sup></b> [47,5 - 58,6] Exponencial	<b>21,3<sup>ab</sup></b> [19,1 - 23,4] Exponencial	<b>10,6<sup>ab</sup></b> [9,6 - 11,7] Exponencial
G3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>18,0<sup>c</sup></b> [14,89 - 21,1] Logístico	<b>8,5<sup>b</sup></b> [6,1 - 11,0] Logístico	<b>5,5<sup>b</sup></b> [3,41 - 7,6] Logístico
G4	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>49,8<sup>b</sup></b> [47,0 - 52,5] Linear	<b>19,9<sup>b</sup></b> [18,8 - 21,0] Linear	<b>10,0<sup>ab</sup></b> [9,4 - 10,5] Linear
G5	10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>90,7<sup>a</sup></b> [71,6 - 109,9] Linear	<b>36,3<sup>a</sup></b> [28,6 - 44,0] Linear	<b>18,1<sup>a</sup></b> [14,3 - 22,0] Linear
<b>Metalaxil-M</b>				
G1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>13,6<sup>a</sup></b> [9,8 - 17,3] Logístico	<b>4,6<sup>a</sup></b> [2,2 - 7,1] Logístico	<b>2,5<sup>a</sup></b> [0,7 - 4,2] Logístico
G2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>1,8<sup>c</sup></b> [1,4 - 2,3] Linear	<b>0,6<sup>b</sup></b> [0,5 - 0,8] Linear	<b>0,3<sup>b</sup></b> [0,2 - 0,4] Linear
G3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>1,9<sup>c</sup></b> [1,4 - 2,4] Exponencial	<b>0,6<sup>b</sup></b> [0,5 - 0,8] Exponencial	<b>0,3<sup>b</sup></b> [0,2 - 0,4] Exponencial
G4	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>4,2<sup>bc</sup></b> [3,4 - 4,9] Exponencial	<b>1,5<sup>b</sup></b> [1,3 - 1,8] Exponencial	<b>0,8<sup>ab</sup></b> [0,7 - 1,0] Exponencial
G5	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>7,4<sup>b</sup></b> [6,4 - 8,3] Exponencial	<b>2,5<sup>ab</sup></b> [2,2 - 2,9] Exponencial	<b>1,3<sup>ab</sup></b> [1,0 - 1,6] Exponencial
<b>Ácido Bórico</b>				
G1	250 mg kg <sup>-1</sup>	<b>432,2<sup>ns</sup></b> [384, 2 - 480,3] Linear	<b>172,9<sup>ns</sup></b> [153,7 - 192,1] Linear	<b>86,4<sup>ns</sup></b> [76,4 - 96,1] Linear
G2	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>475,4</b> [439,3 - 511,6] Linear	<b>190,2</b> [175,1 - 204,6] Linear	<b>95,1</b> [87,9 - 102,3] Linear
G3	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>487,5</b> [450,7 - 524,3] Linear	<b>195,0</b> [180,3 - 209,7] Linear	<b>97,5</b> [90,1 - 104,9] Linear
G4	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>487,3</b> [459,5 - 515,0] Linear	<b>194,9</b> [183,8 - 206,0] Linear	<b>97,5</b> [91,9 - 103,0] Linear
G5	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>502,7</b> [461,3 - 544,0] Linear	<b>201,1</b> [184,5 - 217,6] Linear	<b>100,5</b> [92,3 - 108,8] Linear

G1, G2, G3, G4 e G5 – indicam isolados diferentes da espécie *Gigaspora albida*. Para a mesma substância, médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns - médias não diferem estatisticamente entre si. Dados relativos ao campo G1, são os mesmos descritos no Cap. 1 para geração F3; IC - intervalos de confiança.

Fonte: Produção da autora, 2020.

Tabela 5 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para os diferentes isolados de *Rhizophagus clarus*, em solo artificial tropical (SAT) contaminado com Clorotalonil, Mancozebe, Metalaxil-M e ácido bórico.

Substância / Isolado	CENO	CI <sub>50</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>20</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>10</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico
<b>Clorotalonil</b>				
R1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>25,8<sup>b</sup></b> [ 15,9 - 35,8] Exponencial	<b>17,7<sup>bc</sup></b> [ 10,1 - 25,3] Exponencial	<b>15,7<sup>a</sup></b> [8,5 - 22,9] Exponencial
R2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>71,8<sup>a</sup></b> [58,0 - 85,5] Exponencial	<b>28,7<sup>ab</sup></b> [23,2 - 34,2] Exponencial	<b>14,4<sup>a</sup></b> [11,6 - 17,1] Exponencial
R3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>11,9<sup>b</sup></b> [6,6 - 17,2] Exponencial	<b>7,4<sup>c</sup></b> [3,9 - 10,9] Exponencial	<b>6,3<sup>ab</sup></b> [3,2 - 9,4] Exponencial
R4	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>10,1<sup>b</sup></b> [9,5-12,5] Exponencial	<b>4,3<sup>c</sup></b> [3,7 - 4,9] Exponencial	<b>2,7<sup>b</sup></b> [2,1 -3,2] Exponencial
R5	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>40,5<sup>ab</sup></b> [ 14,9 – 66,0] Exponencial	<b>35,0<sup>a</sup></b> [25,7 - 44,2] Linear	<b>17,5<sup>a</sup></b> [ 12,9 - 22,1] Linear
<b>Mancozebe</b>				
R1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>58,3<sup>ab</sup></b> [ 51,0 - 65,5] Linear	<b>23,3<sup>ab</sup></b> [20,4 - 26,2] Linear	<b>11,7<sup>ab</sup></b> [ 10,2 - 13,1] Linear
R2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>77,4<sup>a</sup></b> [46,2 - 108,6] Linear	<b>31,8<sup>a</sup></b> [19,8 - 43,7] Linear	<b>15,9<sup>a</sup></b> [9,9 - 21,9] Linear
R3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>8,5<sup>c</sup></b> [6,6 - 10,4] Exponencial	<b>4,2<sup>c</sup></b> [3,2 - 5,2] Exponencial	<b>3,2<sup>b</sup></b> [2,30- 4,0] Exponencial
R4	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>10,9<sup>c</sup></b> [5,9-15,9] Exponencial	<b>6,1<sup>c</sup></b> [3,2 -9,0] Exponencial	<b>4,9<sup>b</sup></b> [2,4 - 7,4] Exponencial
R5	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>27,0<sup>bc</sup></b> [ 18,5 - 35,5] Exponencial	<b>14,9<sup>bc</sup></b> [ 9,8 - 20,0] Exponencial	<b>11,9<sup>ab</sup></b> [ 7,0 - 16,7] Exponencial
<b>Metalaxil-M</b>				
R1	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>16,4<sup>ab</sup></b> [11,8 - 21,1] Exponencial	<b>5,7<sup>ns</sup></b> [ 2,6 - 8,8] Exponencial	<b>3,0<sup>ns</sup></b> [0,2 - 7,3] Exponencial
R2	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>14,2<sup>ab</sup></b> [9,6 - 18,9] Exponencial	<b>5,4</b> [3,5 - 7,4] Exponencial	<b>3,2</b> [1,2 - 5,2] Exponencial
R3	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>7,4<sup>b</sup></b> [6,0 - 8,9] Exponencial	<b>2,8</b> [2,3 - 3,4] Exponencial	<b>1,7</b> [1,2 -2,2] Exponencial
R4	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>14,6<sup>ab</sup></b> [10,9- 18,4] Exponencial	<b>5,1</b> [3,6 - 6,5] Exponencial	<b>2,7</b> [1,2- 4,2] Exponencial
R5	< 10 mg kg <sup>-1</sup>	<b>20,2<sup>a</sup></b> [ 16,9 - 23,5] Exponencial	<b>7,8</b> [6,4 - 9,3] Exponencial	<b>4,8</b> [3,2 - 6,3] Exponencial
<b>Ácido Bórico</b>				
R1	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>643,0<sup>ns</sup></b> [579,2 - 706,2] Linear	<b>257,2<sup>ns</sup></b> [231,7 - 282,7] Linear	<b>128,6<sup>ns</sup></b> [115,8 - 141,3] Linear
R2	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>672,4</b> [602,4 - 742,5] Linear	<b>269,0</b> [240,9 - 297,0] Linear	<b>134,5</b> [120,5 - 148,5] Linear
R3	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>543,1</b> [462,1 - 624,0] Linear	<b>217,2</b> [184,8 - 249,7] Linear	<b>108,6</b> [92,4 - 124,8] Linear
R4	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>510,0</b> [450,9 - 569,1] Linear	<b>204,0</b> [180,4 - 227,7] Linear	<b>102,0</b> [90,2 - 113,8] Linear
R5	< 100 mg kg <sup>-1</sup>	<b>636,6</b> [ 575,0 - 698,2] Linear	<b>254,6</b> [ 230,0 - 279,3] Linear	<b>127,3</b> [115,0 - 139,6] Linear

R1, R2, R3, R4 e R5 – indicam isolados diferentes da espécie *Rhizophagus clarus*. Para a mesma substância, médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns - médias não diferem estatisticamente entre si. Dados relativos ao campo R1, são os mesmos descritos no Cap. 1 para geração F3; IC - intervalos de confiança.

Fonte: Produção da autora, 2020.





#### 4 CAPÍTULO 3: SISTEMA *IN VITRO* PLANTA-FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES PARA AVALIAÇÃO DO RISCO DE FUNGICIDAS NA SIMBIOSE

##### RESUMO

O caráter de biotrofismo obrigatório impede que os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) completem seu ciclo de vida sem a presença de uma planta hospedeira. O desenvolvimento de técnicas de cultivo vegetal *in vitro* permitiram também o estabelecimento e avaliações da simbiose micorrízica *in vitro*. Neste estudo, o objetivo foi verificar o uso do sistema de cultivo *in vitro* de FMA e raízes transformadas de chicória (*Cichorium intybus* L.) sob aplicação de concentrações crescentes de Clorotalonil (0; 0,5; 1; 1,5; 3; 6; 12 e 24 mg kg<sup>-1</sup>) na avaliação dos efeitos desse fungicida sobre a fase simbiótica desses organismos e a possibilidade desse método ser empregado em um protocolo ecotoxicológico. Utilizou-se o isolado de *R. clarus* NB112A em meio de cultura contaminado. O experimento teve a duração de 10 semanas e as avaliações envolveram variáveis ligadas à colonização das raízes, produção de esporos e comprimento do micélio extrarradicular. Os resultados indicaram efeito do fungicida sobre o percentual de colonização total, permitindo a determinação de concentrações de inibição (CI) CI<sub>20</sub> (4,6 mg kg<sup>-1</sup>) e CI<sub>10</sub> (2,4 mg kg<sup>-1</sup>) e ausência de efeitos para as variáveis percentual de colonização por arbúsculos e vesículas, produção de esporos e comprimento micelial extrarradicular. O uso do método *in vitro* nas condições adotadas nesse estudo, não são suficientemente eficientes para compor um protocolo de nível *lower tier*, demanda necessidade de aprimoramento e de se realizar novos experimentos antes da sua utilização como ferramenta padrão.

**Palavras-chave:** Biotrofismo obrigatório. Cultivo *in vitro*. Raízes transformadas. Ri T-DNA.

#### 4 CHAPTER 3: PLANT-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN *IN VITRO* SYSTEM FOR ASSESSMENT THE RISK OF FUNGICIDES ON SYMBIOSIS

##### ABSTRACT

The obligatory biotrophism character prevents arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from completing their life cycle without the presence of a host plant. The development of *in vitro* plant cultivation techniques also allowed the establishment and evaluation of mycorrhizal symbiosis *in vitro*. In this study, the objective was to verify the use of the *in vitro* culture system of AMF and transformed chicory roots (*Cichorium intybus* L.) under increasing concentrations of Chlorothalonil (0, 0.5, 1, 1.5, 3, 6, 12 and 24 mg kg<sup>-1</sup>) and to evaluate the effects of this fungicide on the symbiotic phase of AMF and the possibility of this method being used in an ecotoxicological protocol. *Rhizophagus clarus* NB112A isolate was used in contaminated culture medium for the experiment. The experiment lasted 10 weeks and the evaluations involved variables related to root colonization, spore production and extraradical hyphal length. The results indicated the effect of the fungicide on the percentage of total colonization, allowing the determination of inhibition concentrations IC<sub>20</sub> (4.6 mg kg<sup>-1</sup>) e IC<sub>10</sub> (2.4 mg kg<sup>-1</sup>) and non-significant effects for the percentage of colonization by arbuscules and vesicles, spore production and extraradical hyphal length. The use of the method under the conditions employed in this study, are not sufficiently efficient to compose a lower-tier protocol, requiring the need for improvement and to carry out new experiments before being used as a standard tool.

**Key words:** Obligatory biotrophism. *In vitro* cultivation. Transformed roots. Ri T-DNA.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Os esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) podem germinar e desenvolver um micélio pré-simbiótico a partir da sua reserva energética, mas, como organismo simbiotrófico obrigatório, não conseguem continuar seu desenvolvimento sem a presença de uma planta hospedeira e essa característica dificulta o estudo desses organismos (STRULLU; ROMAND; PLENCHETTE, 1991; DECLERK; STRULLU; FORTIN, 2005; HAGE-AHMED; ROSNER; STEINKELN, 2019). Esse entrave foi parcialmente contornado a partir do desenvolvimento de técnicas que permitem crescimento e manutenção de tecidos vegetais em soluções nutritivas combinadas ao desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante.

Bactérias pertencentes ao gênero *Agrobacterium*, (especialmente *Agrobacterium rhizogenes* são agentes patogênicos presentes naturalmente no solo), responsáveis pela proliferação excessiva de raízes em cabeleira tiveram parte do seu DNA associado ao DNA dos tecidos vegetais mantidos *in vitro* (MUGNIER; MOSSE, 1987; AZCON-AGUILAR; BAGO; BAREA, 1999). Na técnica de raízes transformadas por Ri T-DNA al, as células vegetais cultivadas *in vitro* são infectadas por *A. rhizogenes* e o DNA de transferência (T-DNA) oriundo do plasmídeo bacteriano (indutor de raízes - Ri) é transferido, integrado e passa a se expressar na célula vegetal do hospedeiro (ZAMBRYSKI; TEMPÉ; SCHELL, 1989). O vegetal infectado sofre sucessivas modificações metabólicas, passa a produzir enzimas e sintetizar substâncias usadas como fonte de energia pela bactéria, sofrem desbalanço da produção hormonal alterando a produção e sensibilidade das auxinas (e citocininas) e passa a proliferar raízes adventícias de rápido crescimento na região de infecção: as *hairy roots* (SAITO; YAMAZAKI; MURAKOSHI, 1992).

Para a avaliação da simbiose micorrízica, a utilização de raízes modificadas permitiu o cultivo *in vitro* de FMAs e a produção de material fúngico aplicável em investigações acerca da genética, biologia celular, biodiversidade e fisiologia de FMAs, bem como para o entendimento de eventos relacionadas à troca de sinais entre simbiote e raiz hospedeira, estabelecimento e desenvolvimento da simbiose até a formação completa de novos glomerosporos (AZCON-AGUILAR; BAGO; BAREA, 1999; DECLERCK; SÉGUIN; DALPÉ, 2005). Além disso, a utilização de raízes modificadas permite observações microscópicas não destrutivas, análises bioquímicas, estudos de interação com outros microrganismos, o isolamento de variáveis ambientais envolvidas na simbiose e a produção massiva, em escala industrial de FMAs (DECLERK; STRULLU; FORTIN, 2005).

No âmbito dos estudos com agrotóxicos, técnicas de cultivo *in vitro* de FMAs em raízes transformadas por Ri T-DNA, tem sido empregadas na avaliação da toxicidade de agrotóxicos sobre os FMA e os resultados indicam, geralmente, efeitos negativos dessas substâncias sobre a germinação de esporos (ZOCCO et al., 2008; BUYSENS; DUPRE DE BOULOIS; DECLERCK, 2015), colonização radicular (WAN; RAHE; WATTS, 1998; ZOCCO et al., 2008, LI et al., 2013; BUYSENS; DUPRE DE BOULOIS; DECLERCK, 2015), comprimento micelial (WAN; RAHE; WATTS, 1998; CALONNE et al., 2012), esporulação (WAN; RAHE; WATTS, 1998; ZOCCO et al., 2008, CALONNE et al., 2012) e também sobre outras características da simbiose, como a formação de anastomose (CARDENAS-FLORES et al., 2011; NOVAIS et al., 2019) e atividades enzimáticas; (LI et al., 2013).

Por outro lado, as raízes transformadas em Ri T-DNA carecem de tecido fotossintético, e balanço hormonal, em comparação com uma planta autotrófica podendo alterar também o metabolismo envolvido no estabelecimento e manutenção da relação simbiótica (HAGE-AHMED; ROSNER; STEINKELLN, 2019), podendo não fornecer informações tão realistas sobre os efeitos de substâncias ativas na colonização e na simbiose micorrízica.

Desse modo, pretendeu-se verificar a possibilidade de uso do sistema cultivo *in vitro* de FMAs com raízes modificadas (BECARD; FORTIN, 1988) de chicória (*Cichorium intybus* L.) no estabelecimento de protocolo *lower tier* de avaliação dos efeitos do fungicidas na fase simbiótica desses organismos.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, propôs-se utilizar para o experimento *in vitro*, os mesmos isolados propostos por Mallmann et al. (2018) para testes ecotoxicológicos da fase pré-simbiótica de FMAs. Não houve sucesso na tentativa de estabelecer cultivos *in vitro* das espécies/isolados *Gigaspora albida* SCT200A e *Rhizophagus clarus* RJN102A e por isso optou-se pela utilização de um isolado já estabelecido nesse tipo de sistema. Essa decisão foi tomada a partir de dois experimentos prévios, conduzidos também *in vitro*, cujos resultados foram passíveis apenas de avaliação visual e que estão sucintamente descritos no Apêndice C

Neste tópico, serão descritos os procedimentos para a condução de um experimento envolvendo isolado de FMA mantido em cultura *in vitro* e raízes modificadas de chicória. Os procedimentos para o manuseio dos materiais biológicos e posterior montagem dos ensaios *in vitro* seguiram conforme orientação e descrição do "Protocolo de Procedimentos do Laboratório de Microbiologia - UFSC Campus Curitibanos". A preparação do meio de cultivo e montagem

das unidades experimentais foi realizada nesse laboratório e posteriormente transportadas até o Laboratório de Ecologia do Solo (UDESC Lages), onde as avaliações foram realizadas.

#### **4.2.1 Material biológico**

Utilizou-se o isolado *Rhizophagus clarus* NB112A, proveniente da Internacional Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi – INVAM, encaminhado ao Laboratório de Microbiologia/UFSC Curitibanos via remessa internacional e cedidos para esse estudo pela Professora Sonia Purin da Cruz (Laboratório de Microbiologia – UFSC Curitibanos). As placas contendo o isolado de interesse (e que seriam as placas "matriz" para o experimento) foram estabelecidas com três meses de antecedência para garantir a quantidade de material necessária para a montagem do experimento.

As raízes modificadas de chicória (*Cichorium intybus* L.) foram obtidas no BCCM (2017), mantidas *in vitro* e repicadas para crescimento em novas placas 15 dias antes da sua utilização no experimento.

#### **4.2.2 Meio de cultivo e substância testada**

Utilizou-se como meio de cultura o meio modificado Strullu-Romand (MSR) (STRULLU; ROMAND, 1986). Ao meio de cultura, adicionou-se o fungicida Clorotalonil (Bravonil 500®, comercializado pela Syngenta com 500 g de ingrediente ativo L<sup>-1</sup>). O fungicida foi diluído ao meio de cultura de forma a compor sete tratamentos e mais um controle sem aplicação (0; 0,5; 1; 1,5; 3; 6; 12 e 24 mg kg<sup>-1</sup>);

A adição do fungicida ocorreu depois do processo de autoclavagem do meio de cultivo e desse ser vertido nas placas de Petri. A solução estoque contendo o fungicida a ser adicionado em cada um dos tratamentos passou por filtração (0,22 µm de poro; diâmetro externo de 30 mm), visando eliminar possíveis contaminações.

#### **4.2.3 Montagem e desmontagem das unidades experimentais**

Foram selecionadas como fonte de esporos placas com colonização já bem estabelecida, raízes quase em estagnação de crescimento e contendo significativo número de esporos. Sobre essas placas foi delimitado um grid de 1 cm x 1 cm. Cada cm<sup>2</sup> contendo esporos, mas também hifas e fragmentos de raiz, serviu como fonte de propágulo para o estabelecimento de nova

colonização, dentro de uma unidade experimental. As regiões da placa matriz identificadas com menor densidade de esporos foram marcadas e não utilizadas para o ensaio.

Dez desses cm<sup>2</sup> de fonte de propágulo foram avaliados previamente e contou-se, sob microscópio estereoscópico, entre 45 e 68 esporos por cm<sup>2</sup>. Cada cm<sup>2</sup> foi retirado da placa matriz, com auxílio de bisturi estéril e inserido no centro de uma nova Placa de Petri de plástico, também estéril, ainda sem o meio de cultivo contaminado.

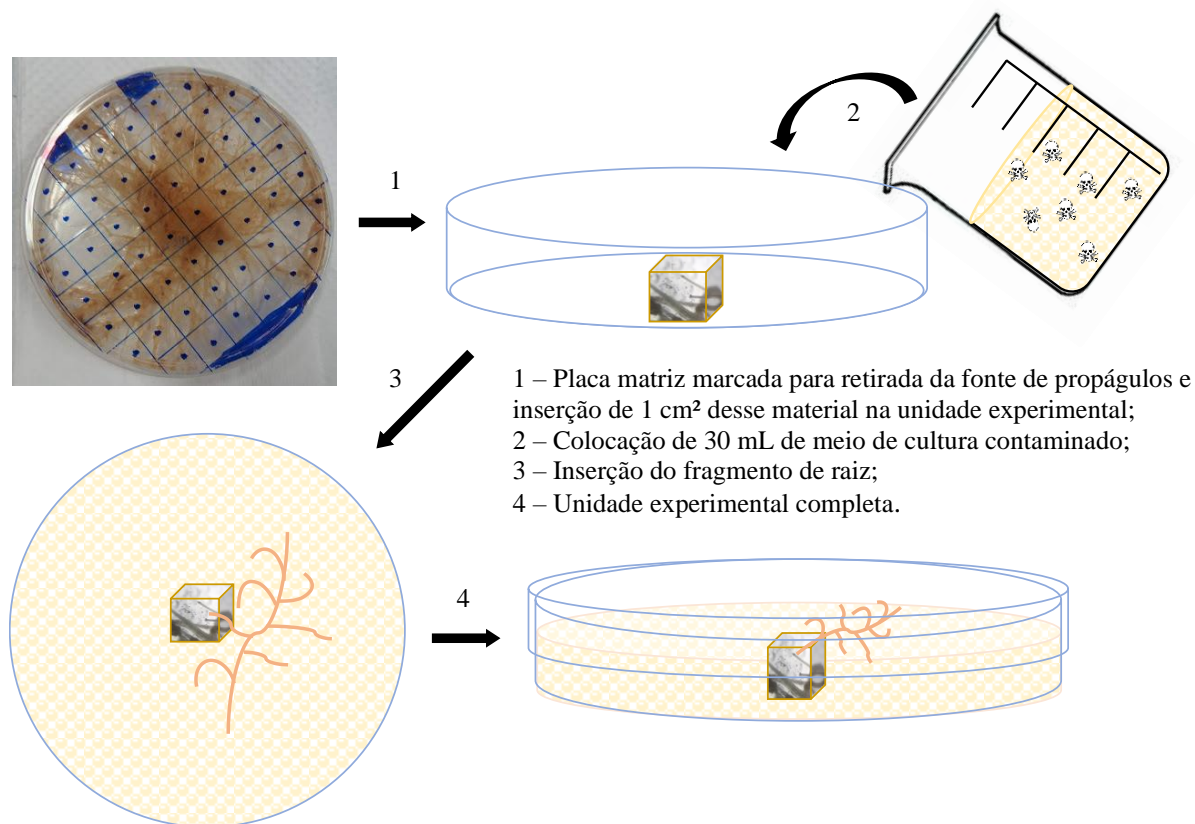
Às placas contendo o cm<sup>2</sup> inicial de propágulos, foram adicionados 30 mL do meio de cultivo contaminado. Para cada concentração foram preparadas 12 placas. Depois que o meio de cultivo, já com os propágulos solidificou, inseriu-se em cada UE um fragmento de raiz de chicória com aproximadamente 5 cm, de coloração esbranquiçada e apresentando ramificações. As unidades experimentais foram vedadas com filme plástico de parafina, identificadas e armazenadas em câmara de germinação, à 25 °C, em delineamento completamente casualizado.

Ao longo do período de condução do experimento algumas repetições em cada tratamento foram perdidas por contaminação de fungos e bactérias indesejados. Placas contaminadas foram autoclavadas para descarte. O ensaio foi conduzido pelo período de 10 semanas e após esse período as UEs foram desmontadas. Para cada UE foi demarcado onde estava o cm<sup>2</sup> inicial de amostra inserida na montagem da mesma e esse material inicial foi cuidadosamente removido com auxílio de bisturi. As raízes de chicória foram removidas das UEs, lavadas abundantemente em água corrente sob peneira de 45 µm e alocadas em recipientes, com água destilada, para posterior manuseio e avaliações.

O material retido na peneira de 45 µm, juntamente com o meio de cultivo das UEs, (agora já sem a amostra de 1 cm<sup>2</sup> inicial e sem as raízes, mas, contendo esporos e hifas) foi colocado em frasco do tipo Erlenmeyer e sobre esse meio, visando sua dissolução, adicionou-se 20 mL de uma solução de citrato de sódio (10 Mm, com pH 6,0). Erlenmeyers contendo o meio de cultura e a solução de citrato de sódio foram colocados em banho-maria à 55 °C, com agitação manual dos frascos para acelerar o processo de dissolução. Temperaturas superiores à adotada não são recomendadas sem testes prévios, pois o material contido no meio de cultivo ainda precisaria ser avaliado e poderia se danificar.

Após a dissolução completa do meio (para algumas amostras o período de banho maria foi superior a 5 h), este foi vertido em peneira de 45 µm e lavado abundantemente em água corrente, transferidos para recipientes devidamente identificados e armazenados com água destilada, em geladeira até sua avaliação. A Figura 27 apresenta um esquema que ilustra o processo de montagem das UEs.

Figura 27 - Esquema de montagem das unidades experimentais do ensaio *in vitro*, com meio de cultura contaminado com Clorotalonil.



Fonte: Produção da autora, 2020.

#### 4.2.4 Variáveis simbióticas avaliadas

Raízes e o material contido no meio de cultura (esporos e hifas) de cada tratamento e repetição foram avaliados para as variáveis de colonização radicular, número de esporos e comprimento micelial extrarradicular total.

##### 4.2.4.1 Percentual de colonização radicular

As amostras foram mantidas em água destilada (que era trocada a cada 7 dias ao longo do período em que permaneceram armazenadas). O processo de coloração seguiu conforme proposto por proposto por Koske & Gemma (1989) com ajuste de tempo para cada etapa. Testes prévios foram realizados para definir as seguintes etapas:

- Dia 1: as raízes foram retiradas da água destilada e imersas em solução de KOH 10 % e permaneceram nessa solução, à frio, por 24h;



- Dia 2: substituiu-se a solução adicionada no dia 1 por nova solução de KOH 10 %. Levou-se as amostras para banho-maria à 60 °C por 2,5 h, realizou-se mais uma troca da solução de KOH 10 % e as amostras permaneceram por mais 2,5 h no banho-maria; após retiradas do banho-maria permaneceram *overnight* (durante a noite, de um dia para o outro) na mesma solução;
- Dia 3: as amostras foram retiradas da solução de KOH 10 %, lavadas em água corrente para completa remoção de resíduos dessa solução, imersas em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alcalina (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + NH<sub>4</sub>OH) por 1 h, lavadas novamente em água corrente e imersas em solução de HCl 2 % e mantidas *overnight* nessa solução;
- Dia 4: substituição da solução de HCl 2 % (raízes não lavadas para essa troca). Mantidas nessa nova solução até o dia 5;
- Dia 5: as amostras foram retiradas da solução de HCL 2% e inseridas em solução de glicerol acidificado (500 ml Glicerina, 450 ml água destilada, 50 ml HCL 1%) contendo 0,2% de azul de tripan (2 g em 1 L de solução). Uma vez no azul de tripan, as amostras foram levadas ao banho-maria, na temperatura de 60 °C por 2 h. Após retiradas do banho-maria as amostras permaneceram na solução de azul de tripan por mais 48 h (dias 6 e 7);
- Dia 8: as amostras foram retiradas da solução de azul de tripan, armazenadas em água destilada e em geladeira até a montagem das lâminas para avaliação em microscópio.

As raízes coloridas de cada amostra foram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm e dispostas em lâminas de microscopia. Como para cada tratamento contou de 6 repetições, apenas 1 lâmina com 10 fragmentos foi montada por amostra. O percentual de colonização total seguiu o proposto por McGonile et al. (1990). As estruturas foram observadas em microscópio com aumento de 400x, determinando sua presença ou ausência em 50 pontos observados. Foi considerado como ponto colonizado do fragmento, aquele que apresentou a presença de pelo menos uma estrutura fúngica (hifa, vesícula, arbúsculo ou esporo). O número de pontos observados foi definido em função no número de repetições por tratamentos em comparação prévia com a avaliação em 100 e 200 pontos por lâmina. O percentual de colonização total, colonização por hifas, vesículas e arbúsculos, considerando os valores de fragmentos colonizados em relação aos não colonizados, foi calculado.

#### 4.2.4.2 Número de esporos por unidade experimental

Para cada tratamento e repetições, toda a amostra oriunda do meio de cultura dissolvido foi utilizada para a contagem do número de esporos. A totalidade da amostra foi vertida em uma placa de Petri quadriculada e os esporos contados sob microscópio estereoscópico em aumento de 40x e os dados anotados. Depois da contagem, as amostras foram cuidadosamente devolvidas para os frascos para avaliação posterior.

#### 4.2.4.3 Comprimento micelial extrarradicular total

A quantificação do comprimento de micélio extrarradicular total das amostras do meio de cultura (CMET) foi realizada conforme descrito por Melloni (1996) e Melloni & Cardoso (1999), com adaptações. A metodologia original prevê a extração do micélio do solo, por se tratar de meio de cultura, estas etapas foram suprimidas. Para cada amostra:

- A amostra em sua totalidade foi colocada na jarra de um liquidificador (objetivando separar os grupamentos de hifas que tendem a se formar em meio líquido), seu volume foi ajustado para 1500 mL e agitado durante 30 s na menor velocidade;
- Após a agitação, todo o volume contido na jarra foi colocado em peneira de malha 45 µm e o material retido nesta peneira foi armazenado em recipiente plástico, com tampa até a sua filtração em bomba de vácuo;
- A filtração à vácuo foi realizada em membrana quadriculada de nitrato de celulose, com diâmetro de 4,7 cm e porosidade de 0,47 µm. Toda a amostra contida no recipiente foi utilizada na filtragem. As membranas foram previamente identificadas e um campo contendo 64 campos (8 x 8 quadriculados) foi demarcada;
- Após a amostra filtrada estar completamente seca, a membrana foi colocada sob lâmina de vidro de 5 x 5 cm, lubrificada com uma gota de óleo de amêndoas para facilitar a visualização no microscópio óptico;
- Foram avaliados os 64 campos em cada membrana, a partir observação das hifas em um dispositivo reticulado acoplado a umas das oculares do microscópio. O dispositivo denominado na literatura estrangeira como *'Eye piece Whipple disc'*, constitui-se de uma *grid* de 10 x 10 quadrículos (cada quadrículo ou retículo possui dimensões de 1mm x 1mm). O número de intersecções das hifas com as linhas horizontais desse *grid* foi contado sob microscópio no aumento de 625 vezes (25x da ocular; 25x da objetiva);

O comprimento do micélio extrarradicular total, é normalmente expresso em centímetros de hifa por grama de solo seco, entretanto, aqui usaremos a medida de centímetros de hifa por 30 mL de meio de cultura (pois toda a amostra foi utilizada). O número de intersecções obtidas anteriormente foi transformado em comprimento de micélio através da equação de Newman (1966). A determinação das incógnitas dessa equação seguiu informações contidas em Cardoso-Filho (1994), Melloni (1996) e Nogueira (1997). A equação de Newman é dada pela fórmula:

$$R = (\pi * A * n) / 2 * H \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

R = comprimento do micélio extrarradicular avaliado nos 64 campos da membrana (mm);

A = área interna avaliada de um reticulado do dispositivo, no aumento considerado (1 mm<sup>2</sup> x 625 x 64 campos na membrana = 40.000 mm<sup>2</sup>);

H = comprimento total das linhas horizontais do *grid* contido no dispositivo, no aumento considerado (1 retículo = 1mm; 1 linha contendo 10 retículos = 10 mm) (10 mm x 10 linhas x 625 = 62500 mm);

n = número de intersecções das hifas nas linhas horizontais do *grid* contido no dispositivo.

Como as intersecções foram obtidas por amostragem em 64 campos da membrana, utilizou-se um fator de correção para extrapolar o valor para a área útil da membrana. Considerou-se como área útil aquela coberta pela amostra (o equipamento de filtração utilizado acoplado a bomba de vácuo possuía diâmetro de 4 cm; logo 1256,64 mm<sup>2</sup> x 625 = 785.400 mm<sup>2</sup>). Temos então:

$$R * (785.400 / 40.000) = 19,635 * R \quad (\text{Equação 2})$$

Substituindo a Equação 1 na Equação 2, teremos:

$$RT = \{19,635 * [(\pi * A * n) / (2 * H)]\}$$

$$RT = \{19,635 * [(\pi * 40.000 * n) / (2 * 62.500)]\}$$

$$RT = [19,635 (1,0053 * n)]$$

$$RT = 19,7390 * n \quad (\text{expresso em mm por UE}^{-1}) \quad (\text{Equação 3})$$

ou

$$RT = 1,9739 * n \quad (\text{expresso em cm por UE}^{-1})$$

ou

$$RT = 0,0197 * n \quad (\text{expresso em m por UE}^{-1})$$

#### 4.2.5 Análise estatística

Em virtude de repetições terem sido perdidas por contaminação, utilizou-se o menor número de repetições existentes em um tratamento como número amostral para os demais. Dos tratamentos 0,5 e 1,5 mg kg<sup>-1</sup> restaram apenas 5 UEs e para selecionar quais UEs seriam utilizadas ou eliminadas para as análises estatísticas, utilizou-se dois critérios: (1) verificação de outliers e (2) valores mais distantes da mediana daquele conjunto de dados. Esses critérios foram aplicados para a variável % colonização total e, para as demais variáveis utilizaram-se as mesmas repetições. Dessa forma, cada um dos tratamentos contou com 5 repetições. Para cada variável avaliada foram verificados os pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Testes de Bartlett). Quando as premissas não foram atendidas, os dados de percentual de colonização foram transformados usando  $[(asen(\sqrt{x}))/180*\pi]$ , os dados de número de esporos usando a transformação  $[(x + 0,5)^{1/2}]$  e os dados de comprimento micelial total usando a transformação  $[\log(x)]$ . Em seguida cada variável foi analisado através de ANOVA (One way) seguido de teste Dunnett ( $p < 0,05$ ) para avaliar a existência de diferenças significativas entre cada concentração testada e o controle permitindo a determinação da concentração de efeito não observado (CENO).

Também tentou-se determinar os valores de CI<sub>50</sub> (concentração originando 50 % de inibição da variável analisada) os valores de CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub> (concentração originando 20 % e 10 % de inibição da variável analisada, respectivamente), utilizando-se modelos de regressão não linear de acordo com o Environment Canada (EC, 2005) e o software Statistica 10.0 (StatSoft 2011).

#### 4.3 RESULTADOS

Dentre as estruturas passíveis de avaliação e que caracterizam a colonização radicular, serão apresentados abaixo os resultados referentes à colonização total (presença de pelo menos uma estrutura típica da simbiose), colonização por arbúsculos e vesículas. A presença de esporos não foi observada para as amostras avaliadas e a colonização por hifas apresentou os mesmos percentuais da colonização total.

O percentual de colonização total no tratamento controle foi de 76 % (desvio padrão – DP = 3 e coeficiente de variação – CV = 3,4 %), subiu para 86 % na primeira concentração (0,5 mg kg<sup>-1</sup>) com Clorotalonil e seguiu uma tendência de queda dos valores nas concentrações seguintes (Figura 28). O Teste Dunnett ( $p < 0,05$ ) indicou que os valores da primeira

concentração com fungicida foram superiores ao controle, não houve efeito na segunda concentração com Clorotalonil ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e todas as demais, foram afetadas negativamente pelo fungicida. Mesmo na maior concentração testada, não houve efeito em 50 % da colonização medida e não foi possível calcular a  $CI_{50}$ , mas, estimou-se CENO em  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ . Valor de  $CI_{20}$  foi estimado em  $4,56 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $1,30 - 7,82$ ) e  $CI_{10}$  em  $2,40 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $0,37 - 4,42$ ) (ambas utilizando modelo estatístico hormesis).

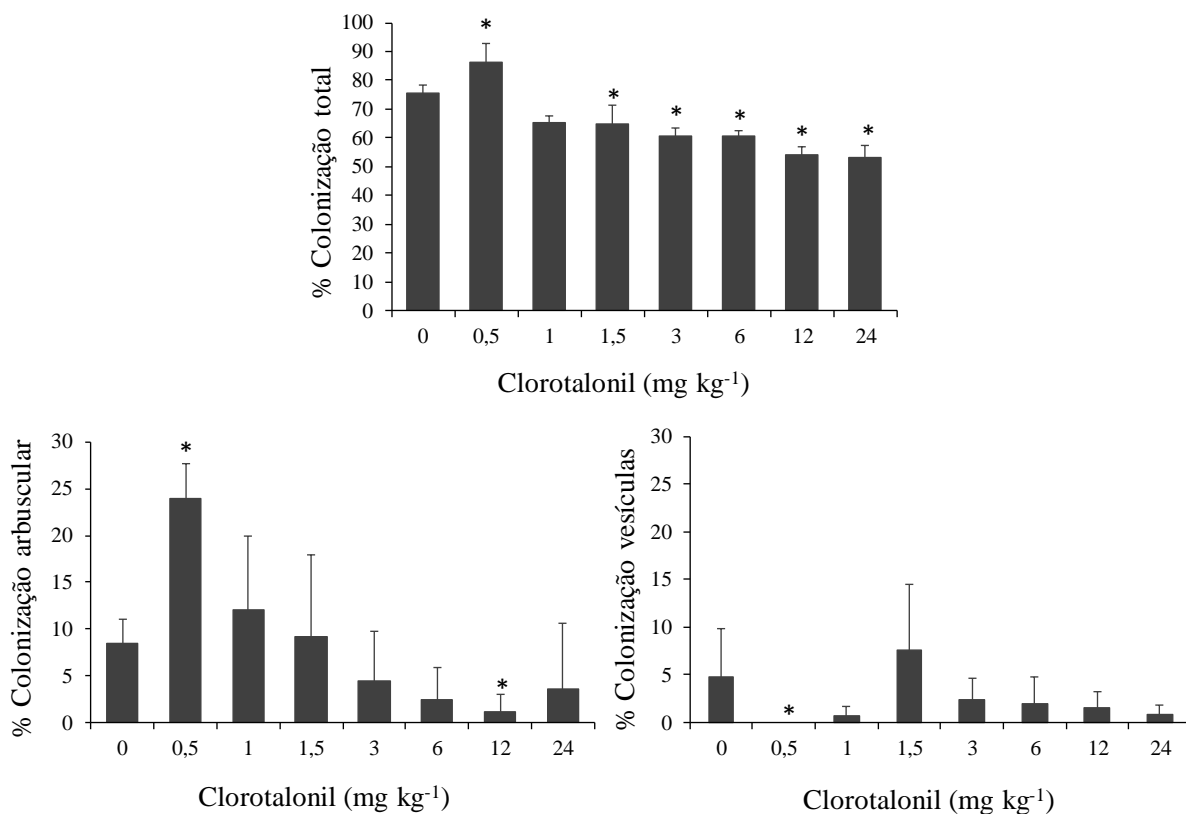
Os dados de colonização por arbúsculos também apresentou um valor positivo da primeira concentração com presença de fungicida no meio em relação ao controle (8 % de colonização,  $DP = 3$  e  $CV = 31 \%$  e) (Figura 28). Houve efeito negativo apenas no tratamento com  $12 \text{ mg kg}^{-1}$  e, em função dos amplos desvios padrões o efeito foi suprimido nas concentrações anteriores a  $12 \text{ mg kg}^{-1}$  e voltou a não existir na maior concentração ( $24 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Em função do comportamento dos dados, nenhuma CI foi passível de determinação.

A colonização por vesículas foi de 5 % no controle ( $DP = 5$  e  $CV = 105 \%$ ) não foi observada na primeira concentração testada ( $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e essa foi a única que apresentou diferença estatística do tratamento controle (Figura 28). Assim como ocorreu para os dados de colonização por vesículas, em função dos amplos desvios padrões outras diferenças estatísticas não foram detectadas. Para esse conjunto de dados, também não foi possível determinar nenhum valor de CI.

Resultados referentes ao número de esporos e comprimento micelial extrarradicular total dizem respeito a totalidade da amostra de uma UE (com 30 mL de meio de cultura). A média de número esporos do tratamento controle foi de 93 esporos ( $DP = 87$ ,  $CV = 93,8 \%$ ) e a maior média (175 esporos) foi contabilizada na concentração com  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de fungicida (Figura 29). Esse conjunto de dados apresentou médias que oscilaram em aumento ou decréscimo ao longo dos tratamentos, desvios padrões bastante amplos a partir do tratamento com  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  e nenhum efeito do fungicida detectado para as concentrações testadas em relação ao controle, através de Teste Dunnett ( $p < 0,05$ ). Nenhuma CI pode ser calculada e a CENO foi estimada como  $> 24 \text{ mg kg}^{-1}$ .

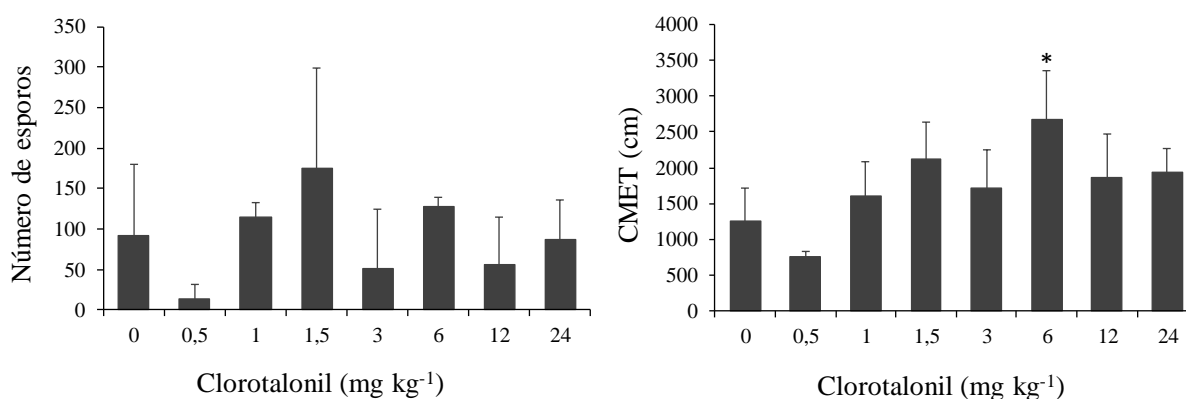
A média de hifas para a variável CMET, no tratamento controle foi de 1263 cm de hifas por UE ( $DP = 455,4$  e  $CV = 36,1 \%$ ). A maior média (2665 cm por UE) foi observada no tratamento com  $6 \text{ mg kg}^{-1}$  de fungicida (Figura 29). Nessa concentração houve diferença significativa positiva em relação ao controle através de Teste Dunnett. Novamente nenhuma CI pode ser calculada e a CENO foi estimada como  $> 24 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Figura 28 - Percentual de colonização total, colonização por arbúsculos e vesículas das raízes do experimento conduzido *in vitro*, contaminado com Clorotalonil.



Os dados (mostrados não transformados) são médias de 5 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão. Fonte: Produção da autora, 2020.

Figura 29 - Número de esporos e comprimento micelial extrarradicular total para cada unidade experimental do experimento conduzido *in vitro*, contaminado com Clorotalonil.



Os dados (mostrados não transformados) são médias de 5 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão. Fonte: Produção da autora, 2020.

#### 4.4 DISCUSSÃO

Dentro das variáveis avaliadas no experimento *in vitro*, apenas o percentual de colonização total teve concentrações de efeito passíveis de cálculo. As demais devido a variação nas médias de respostas entre os tratamentos não foram passíveis dessa determinação. Nota-se que, para a concentração de 0,5 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto houve um significativo incremento do número de arbúsculos e hifas (estruturas que caracterizam o estabelecimento e manutenção da simbiose), nenhuma estrutura de armazenamento de energia, representada pela total ausência de vesículas, foi observada. A aparente ausência de efeito do fungicida no meio para as variáveis colonização total e arbuscular pode, na verdade, representar um gatilho para acionar mecanismos de defesa que irão, por sua vez, garantir que os eventos de colonização posteriores aconteçam (LAMB et al. 1989; BONFANTE; PEROTTO, 1995; LAMBAIS; MEHDY, 1995; READ, 1999). As variação das médias dos tratamentos nas variáveis número de esporos e comprimento micelial devem-se, possivelmente, a comportamentos biológicos de defesa a presença do fungicida no meio e a esporulação é uma forma de garantir a permanência do organismo naquele ambiente, enquanto que o incremento na produção de hifas pode ser uma forma do FMA atingir e permanecer em porções do ambiente menos contaminadas (GIOVANNETTI; AVIO; SBRANA, 2010; LENOIR; FONTAINE; SAHRAOUI, 2016).

Efeitos do Clorotalonil sobre aspectos da simbiose micorrízica foram avaliados *in vitro* por Wan, Rahe e Watts (1998) que, encontraram efeitos sobre a colonização micorrízicas de raízes de cenoura (*Daucus carota*) colonizadas por *Glomus intraradices* a partir da presença de 0,13 ppm (= 0,13 mg kg<sup>-1</sup>) valores CI<sub>50</sub> de 0,05 ppm (= 0,05 mg kg<sup>-1</sup>) e de 0,04 (= 0,04 mg kg<sup>-1</sup>) para as variáveis comprimento de micélio extrarradicular e produção de esporos, respectivamente. Entretanto, as avaliações foram realizadas em duas semanas da inoculação do FMA no meio contaminado, enquanto neste estudo as avaliações foram realizadas após 10 semanas de montagem do experimento. Além disso, embora tenham utilizado o método das raízes transformadas por Ri T-DNA, as espécies tanto de raiz hospedeira, quanto de FMA simbiote foram distintas. A aplicação de diferentes tipos de agrotóxicos, pode modificar reações fisiológicas e metabólicas das diferentes espécies de plantas, o que, por sua vez altera as relações entre os parceiros simbioses e suas respostas a presença do agrotóxico também serão alteradas (DECLERK; STRULLU; FORTIN, 2005; HAGE-AHMED; ROSNER; STEINKELLN, 2019), justificando as diferenças entre os resultados encontrados neste trabalho e no de Wan, Rahe e Watts (1998).

No que tange à utilização do método, nas condições empregadas nesse estudo, para compor um protocolo de nível *lower tier* em esquemas de análise de risco, a metodologia descrita neste capítulo não é considerada como adequada pois: (1) não padronizou-se o número de propágulos, especificamente o número de esporos inseridos em cada unidade experimental; (2) não foi possível garantir um número padrão de repetições entre os tratamentos, dadas as baixas por contaminação, o que incorreu em dificuldade posterior para analisar estatisticamente os dados; (3) embora as variáveis utilizadas não exijam de um avaliador habilidades extremamente complexas, a execução de algumas delas (especificamente o processo de coloração das raízes transformadas) se mostraram extremamente laboriosas e exigiram uma grande quantidade de horas prévias à execução apenas para ajuste da metodologia a ser empregada. Outro ponto, diz respeito à dificuldade de se estabelecer o cultivo de novos táxons *in vitro* (vide Apêndice C).

O sistema de cultivo *in vitro* pode oferecer outras variáveis que poderiam ser exploradas no que tange a avaliação do impacto dos agrotóxicos sobre os FMA e sua simbiose, mas que não foram incluídas nesse estudo, à exemplo de observações não destrutivas de pontos de infecção, arquitetura de micélio extrarradicular, entre outras. De toda a forma, as variáveis selecionadas para avaliação nesse sistema se mostraram promissoras e executáveis. Por isso, é preciso reforçar que, considerando apenas as condições empregadas e apresentadas neste Capítulo, os resultados apontam para a necessidade de aprimoramento dos métodos adotados e da realização de novos experimentos antes da sua utilização como ferramenta padrão empregada na avaliação da simbiose micorrízica.

#### 4.5 CONCLUSÃO

Características relacionadas à colonização radicular, testadas *in vitro* apresentam sensibilidade à presença de Clorotalonil no meio de cultura e constitui uma variável importante a ser usada em protocolos ecotoxicológicos padronizados para a testes de efeitos na fase simbiótica. As variáveis número de esporos e crescimento de micélio extrarradicular, não sofreram efeitos significativos nas condições de teste empregadas.



## REFERÊNCIAS

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAGO, B.; BAREA, J. M. Saprophytic Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In: VARMA, A.; HOCK, B. (eds). **Mycorrhiza**. Berlin: Springer Heidelberg, p. 391 – 408, 1999. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03779-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03779-9_16)

BCCM - Belgian Coordinated Collections of Microorganisms. **Agro-food & Environmental Fungal Collection (MUCL): chicory roots**. Louvain-la-Neuve, Bélgica, 2017. Disponível em: <http://bccm.belspo.be/catalogues>

BECARD, G; FORTIN, J. A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytol.**, v. 108, p. 211–218, 1988. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb03698.x>

BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytol.**, v. 130, p. 3-21, 1995. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb01810.x>

BUYSENS, C.; DUPRE 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. 277–288, 2015. doi: <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0610-7>

CARDENAS-FLORES, A. et al. The sterol biosynthesis inhibitor molecule fenhexamid impacts the vegetative compatibility of *Glomus clarum*. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 5, p. 443–449, 2011. doi: <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0385-z>

CALONNE M, et al., Propiconazole inhibits the sterol 14 alpha-demethylase in *Glomus irregularis* like in phytopathogenic fungi. **Chemosphere**, v. 87, p. 376–383, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.027>

DECLERCK, S; SÉGUIN, S.; DALPÉ, Y. The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for germoplasm collections. In: DECLERCK,S.; STRULLU, D.-G. & FORTIN, J.A.(eds). **In Vitro Culture of Mycorrhizas**. Soil Biology, vol.04. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 17 – 30, 2005.

DECLERCK, S; STRULLU, D. G; FORTIN, J. A (Eds.). **In Vitro Culture of Mycorrhizas**. Springer: Verlag Berlin Heidelberg, Soil Biology, vol.04. 2005. ISSN 1613-3382

EC - Environment Canada. Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests, Method development and applications section. Report EPS 1/RM/46. In: **Environmental Protection Series**. Environment Canada. Environmental Technology Centre, Ottawa, ON, 2005.

HAGE-AHMED, K.; ROSNER, K.; STEINKELN, S. Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. **Pest Management Sci.**, v. 75, p. 583-590, 2019. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.5220>

INVAM – INTERNACIONAL CULTURE COLLECTION OF (VESICULAR) ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. **INVAM Accessions**. Davis College of Agriculture, Natural Resources and Design. Morgantown, West Virginia, EUA. Disponível em: <https://invam.wvu.edu/culture-methods/culture-search>

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, 92:486-505, 1989. doi: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80195-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80195-9)

LAMBAIS, M. R.; MEHDY, M. C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Can J Bot.**, v. 73, p. 533-540, 1995. doi: <https://doi.org/10.1139/b95-293>

LAMB, C. J. et al. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, v. 56, p. 215- 224, 1989. doi: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90894-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90894-5)

LI, X. et al. Effects of prometryn and acetochlor on arbuscular mycorrhizal fungi and symbiotic system. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 57, n. 2, p. 122–128, 2013. doi: <https://doi.org/10.1111/lam.12084>

MALLMANN, G.C. et al. Placing arbuscular mycorrhizal fungi on the risk assessment test battery of plant protection products (PPPs). **Ecotoxicology**. 27, 809–818, 2018. doi:10.1007/s10646-018-1946-0

McGONIGLE, T.P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.L; SWAN, J.A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. **The New Phytologist**, 115 (3):495-501,1990. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x>

MELLONI, R. A. **Quantificação do micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas**. Piracicaba, 1996, 83 p. (Dissertação de mestrado) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MELLONI, R.; CARDOSO, E. J. B. N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas e endófitos: I. Método empregado. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 53-58, Mar. 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06831999000100007>.

MUGNIER, J.; MOSSE, B. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA grown axenically. **Phytopathol.**, v. 77, p. 1045–1050, 1987. doi: <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1045>.

READ, D. J. The State of the Art. In: VARMA, A.; HOCK, B. (eds). **Mycorrhiza**. Berlin: Springer Heidelberg, p. 391 – 408, 1999. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03779-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03779-9_16)

NOVAIS, C. B. et al. Interconnectedness, length and viability of arbuscular mycorrhizal mycelium as affected by selected herbicides and fungicides. **Appl Soil Ecol.**, v. 143, p. 144-152, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.06.013>

SAITO, K.; YAMAZAKI, M.; MURAKOSHI, I. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium* mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. **J. Nat. Prod.**, v. 55, p. 149-62, 1992. doi: <https://doi.org/10.1021/np50080a001>

STATSOFT. **STATISTICA 10.0 (data analysis software system)**. [s.l]. 2011. Disponível em <<http://www.statsoft.com>>.

STRULLU, D. G.; ROMAND, C. Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. **C. R. Acad. Sci.**, v. 303, p. 245-250, 1986.

STRULLU, D. G.; ROMAND, C.; PLENCHETTE, C. Axenic culture and encapsulation of the intraradical forms of *Glomus* spp. **W. J. Microb and Biotec.**, v.7, p. 292-297. 1991. doi: <https://doi.org/10.1007/bf00329394>

WAN, M. T.; RAHE, J. E; WATTS, R. G. A new technique for determining the sublethal toxicity of pesticides to the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Environmen. Toxicol. Chem.**, v. 17, n. 7, p. 1421–1428, 1998. doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5620170728>

ZAMBRYSKI, P.; TEMPÉ, J.; SCHELL, J. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. **Cell**, v. 56, p. 193-201, 1989. doi:[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90892-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90892-1)

ZOCCO, D et al. Effects of two sterol biosynthesis inhibitor fungicides (fenpropimorph and fenhexamid) on the development of an arbuscular mycorrhizal fungus. **Mycol. Res.**, v. 112, n. 5, p. 592–601, 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.11.010>

## APÊNDICE C

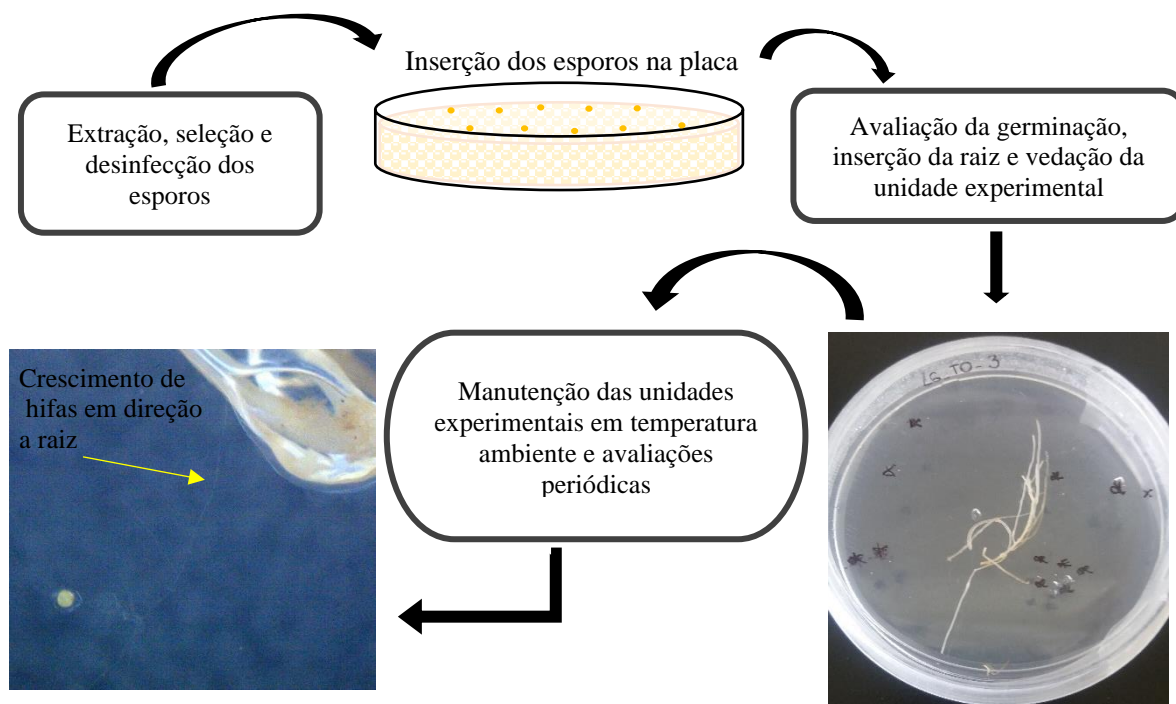
### Experimento *in vitro* 1

Em virtude do maior tamanho e facilidade de manuseio/observação, optou-se por utilizar, inicialmente esporos de *G. albida* SCT200A. Os procedimentos para o manuseio e posterior montagem dos ensaios *in vitro* seguiram conforme orientação e descrição do Protocolo de Procedimentos do Laboratório de Microbiologia - UFSC Campus Curitibanos (não publicado e cedido pela Prof<sup>a</sup> Sonia Purin da Cruz) e a montagem do ensaio ocorreu no mesmo laboratório.

Todo o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar e cada uma das unidades experimentais (UE) foi montada conforme as seguintes etapas (Figura 30):

- Preparação do meio de cultura MSR. Colocou-se quantidade de meio para formar uma camada de aproximadamente 0,7 cm em placas de Petri de plástico estéreis;
- No momento de preparação do meio, adicionou-se o fungicida Clorotalonil diluído ao meio de cultura de forma a compor os tratamentos de 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 mg kg<sup>1</sup> meio de cultura. Para esse ensaio a adição do fungicida ocorreu depois do processo de autoclavagem do mesmo e antes do meio ser vertido nas placas de Petri, a partir de uma solução estoque filtrada (filtro utilizado em seringas, tamanho do poro= 0,22 µm e diâmetro externo de 30 mm), visando eliminar possíveis contaminações. Para cada tratamento foram preparadas 20 placas e para o controle sem contaminação foram preparadas 40 placas, totalizando 200 placas para esse ensaio;
- Extração dos esporos via peneiragem úmida, seleção e desinfecção dos esporos de *G. albida*, através de “banhos” sucessivos de tween 20 (surfactante usado como agente de limpeza), cloramina, antibióticos (estreptomicina e gentamicina) e água destilada;
- Inserção dos esporos desinfectados na placa com o meio de cultura contaminado. Foram inseridos 5 esporos por placa;
- Avaliação da germinação dos esporos; inserção das raízes transformadas de chicória na placa contendo os esporos germinado. Os fragmentos de raízes possuíam aproximadamente 5 cm, coloração esbranquiçada e apresentavam ramificações e após a sua inserção foram UEs eram vedadas com filme plástico de parafina;
- Manutenção das UEs em temperatura ambiente, realizar as avaliações periódicas até a avaliação final.

Figura 30 - Esquema de montagem das unidades experimentais do experimento *in vitro* 1.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Após vedação as UEs foram transferidas para o Laboratório de Ecologia do solo onde as avaliações visuais foram realizadas. Estabeleceu-se um regime de avaliação periódica semanal, com acompanhamento e retirada de contaminação por agentes externos e acompanhamento do processo de estabelecimento da simbiose. Teoricamente considerou-se estabelecer: (1) dias necessários para a germinação dos esporos em meio de cultura; (2) dias necessários para início da produção de micélio extra radicular; (3) dias necessários para início da esporulação; (4) dias necessários para início da redução da taxa de crescimento micelial e redução da esporulação. Ao final do experimento as UEs seriam desmontadas e avaliações referentes às características da simbiose mencionadas e mais taxa de colonização radicular seriam mensuradas.

As principais observações sobre esse experimento foram:

- Para o tratamento com maior concentração do fungicida ( $72 \text{ mg kg}^{-1}$ ) todas as placas foram perdidas por contaminação antes mesmo da inserção dos esporos. Possivelmente por falhas no processo de filtragem da solução estoque incorrendo na contaminação total desse tratamento;
- Em 10 dias, os esporos germinados haviam emitidos hifas além do necessário para seguir com o padrão de validação da germinação da fase pré-simbiótica (quantidade de hifas 5x o

diâmetro do esporo), por isso, a avaliação da germinação pode acontecer em já em 7 dias após a inserção dos esporos na placa;

- As quatro menores concentrações de Clorotalonil apresentaram germinação mais expressiva (pelo menos 3 dos 5 esporos germinados nas concentrações 0 mg kg<sup>-1</sup>, 3, 6 e 12 mg kg<sup>-1</sup>);
- Depois de 10 dias não houve alteração no status de germinação dos esporos. Aqueles que não haviam germinado até esse número de dias, também não germinaram depois disso.

Nas avaliações subsequentes, observou-se apenas o crescimento da raiz e houve um aumento acelerado do número de placas contaminadas e, 11 dias após a inserção das raízes (21 dias após o início do ensaio) todas as placas apresentavam alto grau de contaminação e foram autoclavadas para descarte.

## **Experimento *in vitro* 2**

Foi montado seguindo o descrito para o experimento 1, com as seguintes alterações:

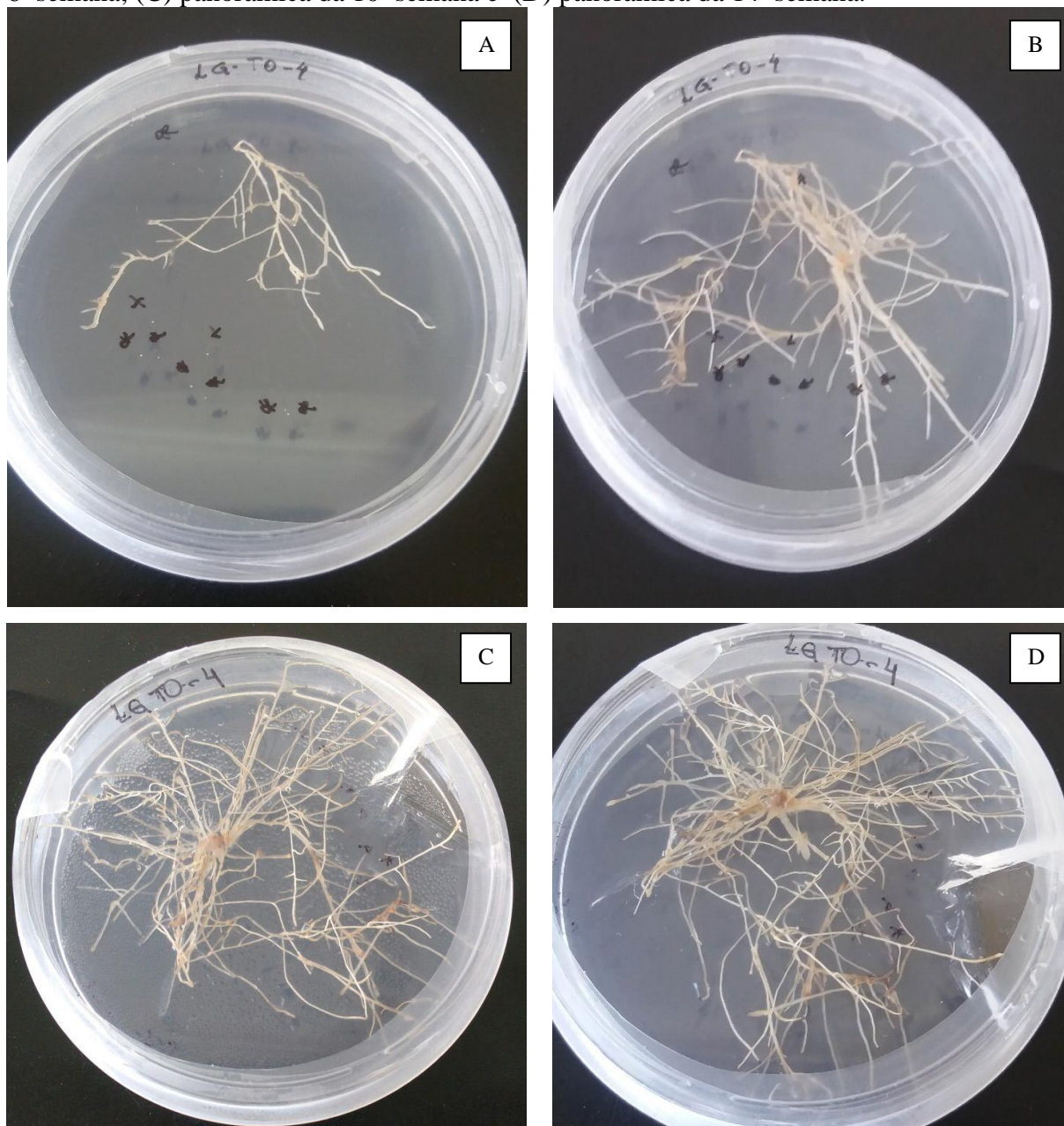
- Aumentou-se o número de esporos de 5 para 10 em cada UE e a avaliação da germinação, seguida da inserção das raízes ocorreram em 7 dias após a inserção dos esporos;
- Ácido bórico foi utilizado como substância teste ao invés de Clorotalonil nos tratamentos de 0, 25, 75 e 150 mg kg<sup>-1</sup>;
- A adição da substância ocorreu imediatamente antes da inserção do fragmento de raiz, para todas as UEs. Novamente para cada concentração foram preparadas 20 placas e 40 placas para o controle;

Após 7 dias da inserção dos esporos nas placas contabilizou-se número de esporos germinados e as placas com diferentes números de esporos germinados foram alocadas para que, em cada concentração da substância, houvesse placas com 5, mas também com 10 esporos germinados. Uma vez inseridas as raízes, as placas foram acompanhadas semanalmente. Durante um período de 7 semanas, três repetições de cada um dos tratamentos eram fotografadas em detalhes (crescimento de hifas, crescimento e formação de estruturas da raiz). A partir da 8ª semana de condução do ensaio, em virtude de problemas no equipamento de imagem utilizado, as fotos passaram a ser panorâmicas e permitiram apenas o acompanhamento do crescimento das raízes. A avaliação visual continuou acontecendo e as observações anotadas. Algumas das imagens obtidas e descrição das estruturas formadas são apresentadas na Figura 31 e Figura 32.

Embora tenha sido possível manter esse experimento por um período prolongado em relação ao 1, o aparecimento de contaminação exógena também o comprometeu. Restaram

apenas 24 UEs intactas (duas do tratamento controle). O Experimento 2 foi mantido por 100 dias e nesse período, a formação de estrutura externa as raízes (micélio extrarradicar e presença de esporos jovens) não foi observada, nem mesmo no tratamento controle. Em virtude do número insuficiente de repetições, o ensaio foi finalizado e as raízes não foram analisadas.

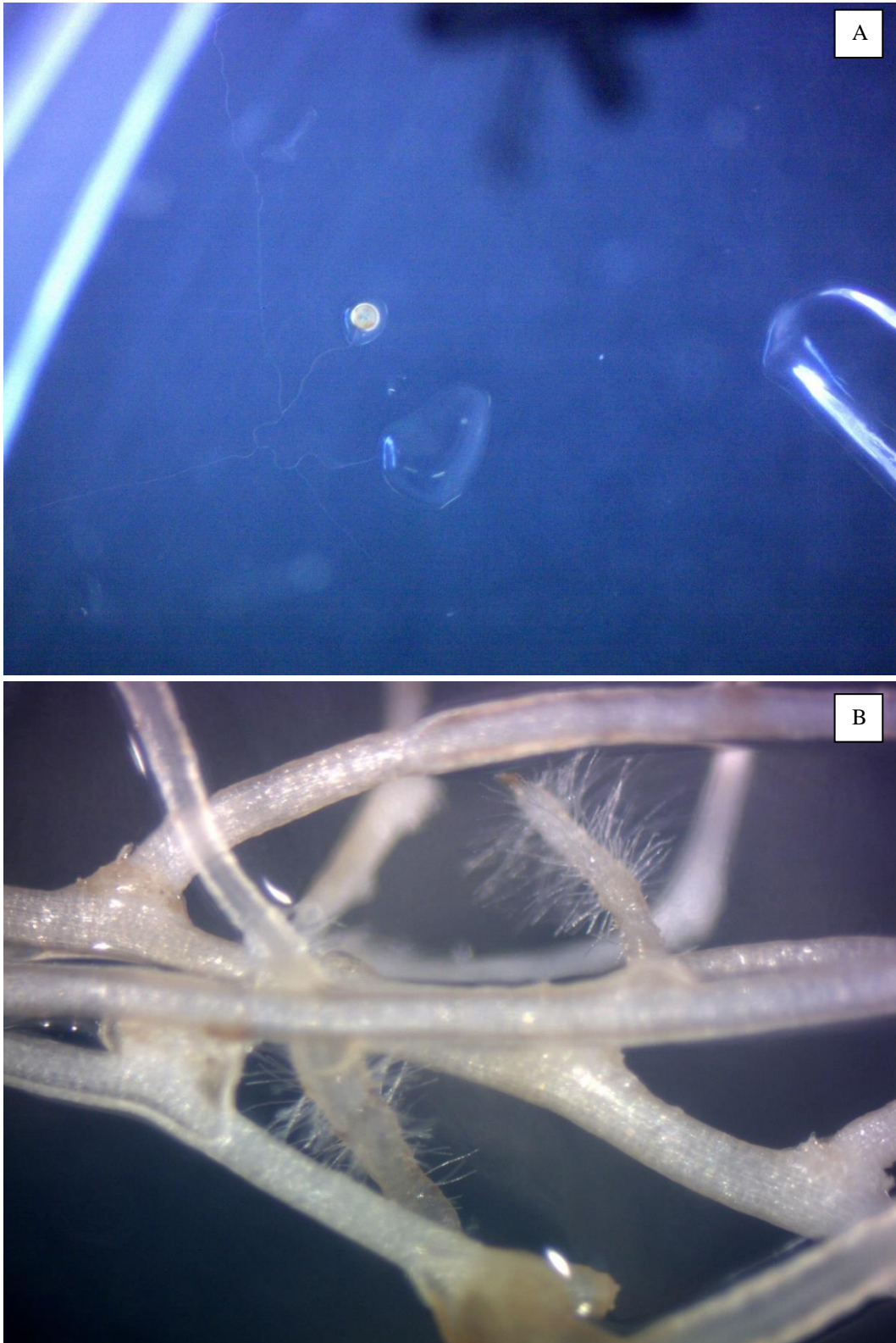
Figura 31 - Visão panorâmicas das unidades experimentais do ensaio *in vitro* para acompanhamento o crescimento das raízes. (A) panorâmica da 1ª semana; (B) panorâmica da 6ª semana; (C) panorâmica da 10ª semana e (D) panorâmica da 14ª semana.

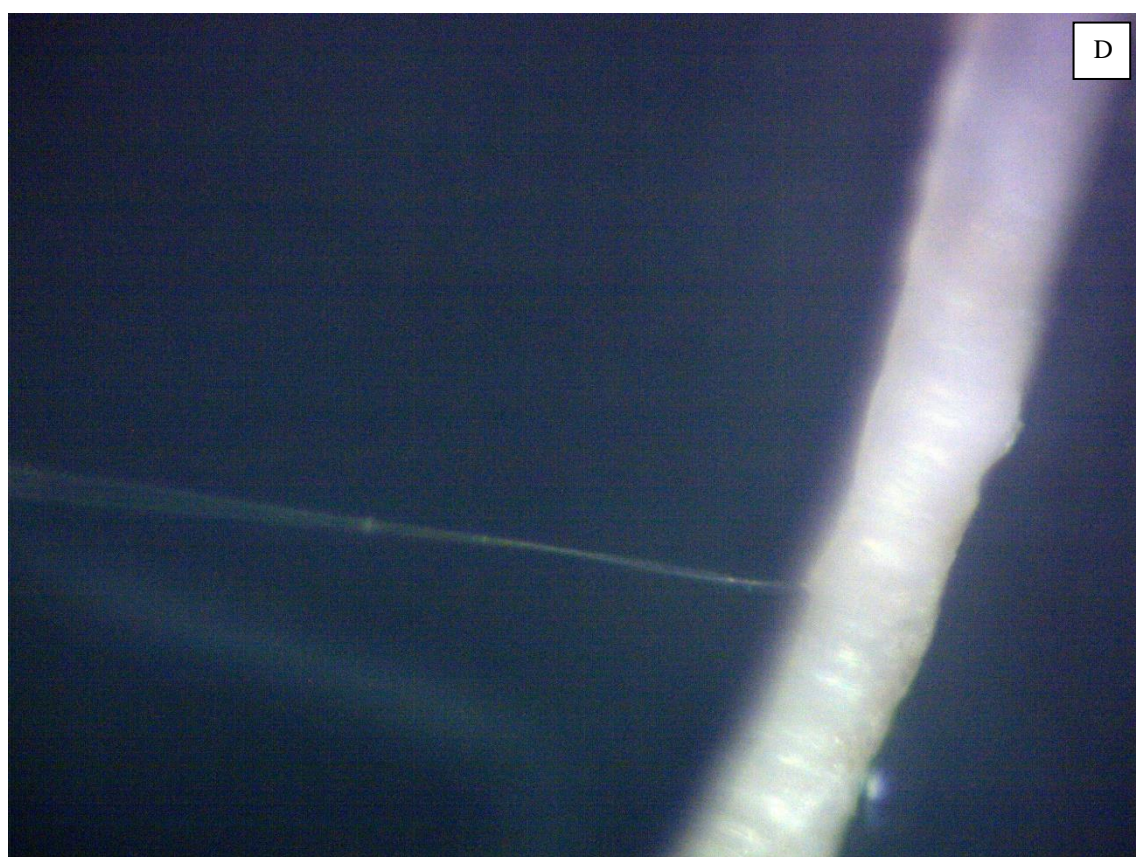
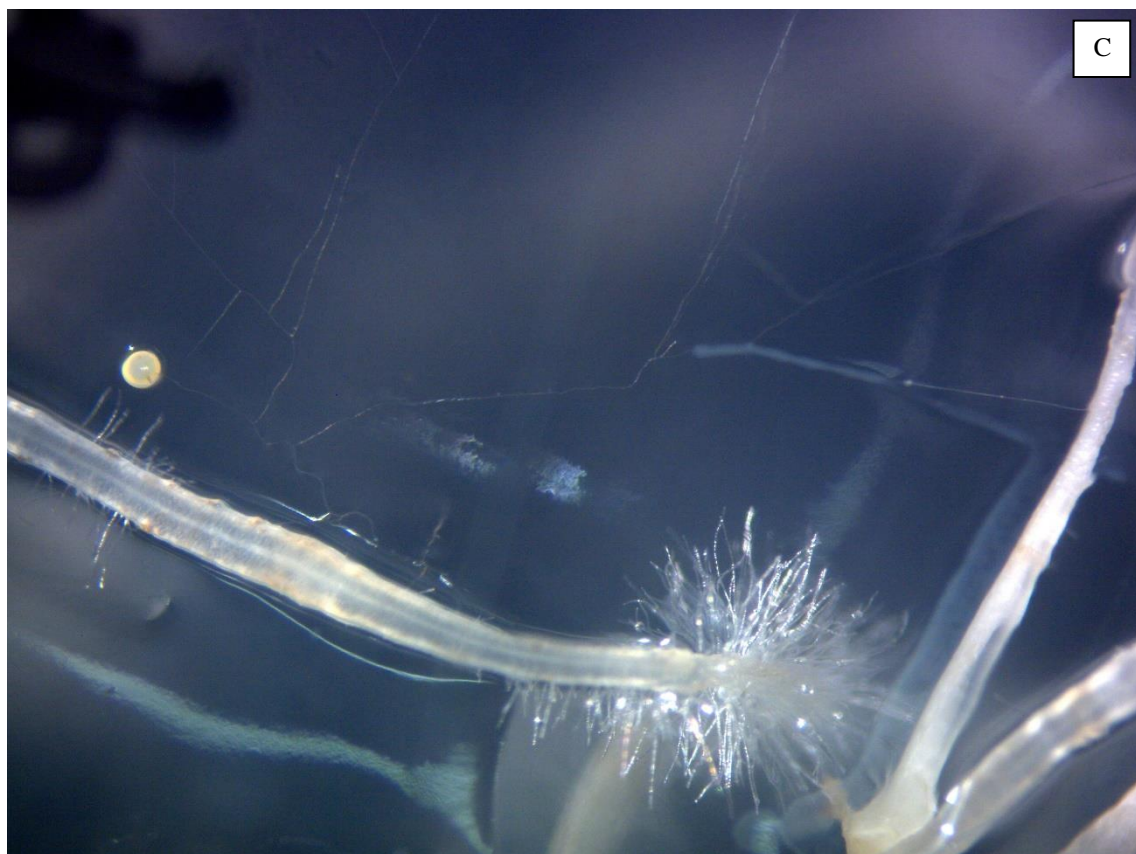


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.



Figura 32 - Estruturas formadas nas unidades experimentais do ensaio *in vitro* 2: (A) Esporo germinado na placa e hifas pré-simbióticas; (B) Formação de pelos radiculares; (C) Hifas crescendo em direção à raiz e (D) Detalhe da hifa pré-simbiótica penetrando a raiz.





Fonte: Elaborada pela autora, 2020.



## 5 CAPÍTULO 4: SISTEMA *IN VIVO* PLANTA-FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES PARA AVALIAÇÃO DO RISCO DE FUNGICIDAS NA SIMBIOSE

### RESUMO

A presença de agrotóxicos no solo, pode provocar efeitos negativos em etapas iniciais do processo de estabelecimento da simbiose micorrízica ou em etapas posteriores à colonização, afetando a permanência destes fungos nos ecossistemas. O objetivo desse estudo foi desenvolver um método *in vivo* de avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre características da fase simbiótica dos fungos micorrízicos arbusculares, empregando a inoculação de esporos de *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus* em soja e braquiária e avaliar a viabilidade desse método ser utilizado como protocolo *lower-tier* em esquemas de análise de risco. Foram montados quatro experimentos (1 – *G. albida* + soja; 2 – *G. albida* + braquiária; 3 – *R. clarus* + soja; 4 – *R. clarus* + braquiária), utilizando solo artificial e concentrações crescentes de Clorotalonil (0; 12; 18; 24; 36; 48 e 72 mg kg<sup>-1</sup>) e avaliadas as seguintes variáveis: percentual de colonização total e arbuscular; número de esporos e comprimento micelial extrarradicular total (CMET). Os experimentos tiveram a duração de 56 dias e os resultados apontaram para efeito do fungicida para as variáveis avaliadas. Para o conjunto dos experimentos a concentração de efeito não observado (CENO) foi < 12 mg kg<sup>-1</sup> para o percentual de colonização total e CMET e variou de < 12 mg kg<sup>-1</sup> a 18 mg kg<sup>-1</sup> nas variáveis colonização arbuscular e número de esporos (exceto para o experimento 3 nessa variável onde CENO > 72 mg kg<sup>-1</sup>). Determinaram-se os valores de CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>, para todas as variáveis e das CI<sub>10</sub> estabelecidas e do cálculo da PEC<sub>inicial</sub>, identificou-se potencial risco da presença do Clorotalonil no ambiente para colonização total e CMET no experimento 1 e número de esporos nos experimentos 1 e 4. O método pode ser considerado adequado para ser empregado como um protocolo *lower-tier*, pois apresenta características desejáveis de um método padronizado.

**Palavras-chave:** Cultivo *in vivo*. Inoculação. Concentração de inibição. Protocolo *lower tier*.

## 5 CHAPTER 4: PLANT-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN *IN VIVO* SYSTEM FOR ASSESSMENT THE RISK OF FUNGICIDES ON SYMBIOSIS

### ABSTRACT

The presence of pesticides in the soil can cause negative effects in the initial stages of establishing mycorrhizal symbiosis or in stages after colonization, affecting the permanence of these fungi in the ecosystems. The aim of this study was to develop an *in vivo* evaluating method for pesticides effects on arbuscular mycorrhizal fungi symbiotic phase, using the inoculation of *Gigaspora albida* and *Rhizophagus clarus* spores in soybean and brachiaria and to evaluate the feasibility of this method being used as a lower-tier protocol in risk analysis schemes. Four experiments were set up (1 – *G. albida* + soybean; 2 – *G. albida* + brachiaria; 3 – *R. clarus* + soybean; 4 – *R. clarus* + brachiaria), using artificial soil and increasing concentrations of chlorothalonil (0; 12; 18; 24; 36; 48 and 72 mg kg<sup>-1</sup>). The following variables were evaluated: percentage of total and arbuscular colonization; number of spores and extraradical hyphal length. The experiments lasted 56 days and the results pointed to the effect of the fungicide for the variables evaluated. For the set of all experiments, the no observed effects concentration (NOEC) was < 12 mg kg<sup>-1</sup> for percentage of total colonization and extraradical hyphal length; varied between < 12 mg kg<sup>-1</sup> and 18 mg kg<sup>-1</sup> for the percentage of arbuscular colonization and number of spores (except for experiment 3 of this variable where NOEC > 72 mg kg<sup>-1</sup>). The inhibition concentration values (IC) was determined for all variables (IC<sub>50</sub>, IC<sub>20</sub> e IC<sub>10</sub>), and with the established IC<sub>10</sub> plus the PEC<sub>initial</sub> calculation, a potential risk of the presence of Chlorothalonil in the environment was identified for total colonization and extraradical hyphal length in the experiment 1 and spore number in the experiments 1 and 4. The method can be considered adequate to be used as a lower-tier protocol, as it presents desirable characteristics of a standardized method.

**Key words:** *In vivo* cultivation. Inoculation. Inhibition concentration. Lower tier protocol.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A grande maioria das pesquisas envolvendo a fase simbiótica dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são realizadas com vistas aos seus benefícios para as plantas hospedeiras. É fato, que, como um organismo obrigatoriamente simbiote, os FMA são diretamente dependentes de plantas suscetíveis à micorrização para completar o seu ciclo de vida, entretanto, a sua relevância para os ecossistemas vai muito além do incremento nutricional e crescimento das plantas (ARAÚJO, 2007), sendo esses organismos cada vez mais associados à qualidade ambiental. Presentes nos sistemas agrícolas, FMAs e sua simbiose, são expostos à diversos insumos, incluindo os agrotóxicos que podem oferecer risco aos eventos que antecedem o estabelecimento da simbiose, em eventos posteriores (consolidação e funcionalidade da simbiose) e na continuidade desses fungos no campo por meio da produção de propágulos (HAGE-AHMED, ROSNER & STEINKELN, 2019).

O caráter de biotrofismo obrigatório dos FMAs é um dos grandes desafios para os estudos com esses organismos e para avaliar aspectos relacionados a simbiose, há a necessidade de se considerar a presença de um hospedeiro. Os efeitos de substâncias químicas como adubos, resíduos e contaminantes sobre a simbiose micorrízica e sua funcionalidade comumente são realizados por meio de experimentos em vasos de cultivo com plantas hospedeiras (sistema *in vivo*), como os trabalhos realizados por Ipsilantis, Samourelis e Karpouzas (2012) e Karpouzas et al. (2014), que avaliaram o impacto das substâncias estudadas sobre a colonização micorrízica. Não há, entretanto, indicação de um método padrão no que tange à tamanho de unidade experimental, tipo de substrato, tempo de condução dos experimentos, tipo de hospedeiro e abordagem estatística empregada. Não existe também, indicações referentes a espécies fúngicas e tamanho de população ou mesmo sugestão de outras características relacionadas à simbiose micorrízica para serem consideradas na avaliação do risco de agrotóxicos e esses são aspectos importantes a serem definidos para um método padrão.

Além do exposto acima, para uma metodologia ser utilizada dentro das etapas inferiores de um esquema de análise de risco, ela precisa apresentar algumas características, dentre elas: (1) a possibilidade de padronização e uniformidade dos organismos-teste; (2) facilidade de manipulação dos organismos-teste; (3) Possibilidade de avaliação da magnitude do efeito sobre o organismo, de forma direta ou indireta; (4) sensibilidade dos organismos aos métodos e (5) facilidade de avaliação (EFSA, 2017).

Propôs-se, nesse Capítulo, um método para a execução de experimentos *in vivo*, envolvendo a inoculação de esporos de *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus* em plantas

hospedeiras para testar os efeitos de agrotóxicos sobre características da fase simbiótica dessas espécies para ser utilizado como protocolo *lower tier*.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Diferentes sistemas *in vivo* foram testados e à medida que falhas foram sendo identificadas, os métodos foram remodelados e reexecutados até se chegar num sistema *in vivo* considerado adequado que é o apresentado a seguir. Uma descrição sucinta desses sistemas experimentais prévios está descrita no Apêndice D

Foram realizados 4 experimentos individuais, envolvendo esporos de FMAs, plantas hospedeiras e um fungicida adicionado ao substrato. Por envolver simbiote e hospedeiro em desenvolvimento, denominamos esse conjunto de experimentos como “experimentos da fase simbiótica *in vivo*”.

### 5.2.1 Material biológico

Foram utilizados esporos da espécie *Gigaspora albida*, isolado SCT200A e da espécie *Rhizophagus clarus*, isolado RJN102A. Estas espécies foram selecionadas pois são as espécies utilizadas nos ensaios envolvendo a fase pré-simbiótica como descrito por Mallmann et al (2018). Como plantas hospedeiras, utilizou-se uma leguminosa e uma gramínea, sementes de soja (*Glycine max*, Nidera 5909) não inoculadas e sementes de braquiária (*Braquiaria brizantha*), respectivamente. A idade dos esporos inferior a 1 ano. As combinações entre FMA e hospedeiro foram: esporos de *G. albida* + sementes de soja, esporos de *G. albida* + sementes de braquiária, esporos de *R. clarus* + sementes de soja e esporos de *R. clarus* + sementes de braquiária.

### 5.2.2 Substrato

Usou-se como substrato o Solo Artificial Tropical – SAT (GARCIA et al., 2004), sem contaminação, composto por 75% de areia fina, 20% de argila branca (caulim), 5% de fibra de coco triturada (OECD, 2016; Niemeyer, 2018) e pH ajustado para 6,0 ( $\pm 0,5$ ) com carbonato de cálcio. O SAT utilizado foi previamente preparado e sua umidade ajustada em função da sua capacidade de retenção de água (CRA) (ISO, 2012) para 50 % da CRA. Uma tabela apresentando as características químicas do substrato pode ser encontrada no Capítulo 1 (Tabela

1). Submeteu-se o SAT à 3 ciclos de congelamento e descongelamento de 24 h, visando eliminar qualquer organismo existente no substrato. As contaminações dos substratos foram realizadas sempre no dia da montagem do experimento. Para a contaminação, um gradiente com concentrações crescentes do fungicida foi preparado, diluindo-se uma solução estoque da referida substância em água destilada.

O recipiente de montagem das UEs possuía aberturas laterais na porção inferior, por onde se perderia substrato. Por esse motivo, adicionou-se vermiculita à montagem das UEs. Esse substrato foi previamente peneirado (somente partículas maiores de 2 mm foram utilizadas) e esterilizado (3 ciclos de autoclavagem de 45 min).

### 5.2.3 Tratamentos com fungicida

Como substância teste, utilizou-se a formulação comercial Bravonil 500<sup>®</sup>, que contém o fungicida Clorotalonil como princípio ativo. Essa formulação foi utilizada nos experimentos *in vivo*, em substituição ao Bravonil Ultrex<sup>®</sup> (utilizado para todos os ensaios da fase pré-simbótica), pois este não possui recomendação para a cultura da soja (já que uma das plantas hospedeiras selecionadas para os experimentos é soja). O Bravonil 500<sup>®</sup> é amplamente utilizado na agricultura e possui as seguintes características: 500 g de ingrediente ativo Clorotalonil por L<sup>-1</sup>, pertencente ao grupo químico das Isoftalonitrilas, possui modo de ação de contato, classificação do potencial de periculosidade ambiental II (produto muito perigoso) e classificação toxicológica 3 (moderadamente tóxico). Além disso, sua recomendação de uso (considerando as espécies vegetais com a maior recomendação, incluindo a soja) é de 3 L ha<sup>-1</sup>.

O material biológico foi utilizado em 4 experimentos assim delineados:

- Experimento 1: Esporos de *G. albida* e soja como planta hospedeira;
- Experimento 2: Esporos de *G. albida* e braquiária como planta hospedeira;
- Experimento 3: Esporos de *R. clarus* e soja como planta hospedeira;
- Experimento 4: Esporos de *R. clarus* e braquiária como planta hospedeira.

Para todos os experimentos, o substrato foi contaminado com concentrações crescentes do fungicida testado, considerando a quantidade de mg do ingrediente ativo por kg de substrato seco. Os tratamentos compreenderam 5 concentrações, mais controle sem aplicação (0, 12, 24, 36, 48 e 72 mg kg<sup>-1</sup> de substrato seco), com seis repetições por tratamento, totalizando 42 unidades experimentais. As concentrações e suas repetições foram distribuídas aleatoriamente pela bandeja de suporte, em um delineamento inteiramente casualizado.



#### 5.2.4 Montagem das unidades experimentais

Para cada espécie de FMA testada, os esporos utilizados foram extraídos do solo-inóculo 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 ou esmagados foram eliminados) e contados sob microscópio estereoscópico e armazenados em copos plásticos, com volume de 50 mL contendo água destilada até a sua utilização. Para cada repetição, foram utilizados 50 esporos. O período compreendido entre a extração e contagem dos esporos sua utilização não ultrapassou 48 h.

As sementes de ambas as espécies passaram por um processo de desinfecção superficial em hipoclorito de sódio 1 % por 5 minutos e após a remoção do hipoclorito, foram mantidas em água destilada até a sua utilização. É importante destacar que esse procedimento foi realizado minutos antes da montagem do experimento.

Foram utilizados como recipiente para a montagem das unidades experimentais, tubetes de plástico com volume de 200 mL, que foram previamente limpos e identificados. Uma vez contaminado o substrato e desinfetadas as sementes, passou-se para a montagem das UEs.

Inicialmente foram adicionados aos tubete 30 mL de vermiculita esterilizada. O SAT contaminado, para cada concentração de repetições, foi pesado diretamente no tubete a fim de completar o volume do recipiente. A pesagem ocorreu de forma a depositar o substrato no tubete, sem pressioná-lo, para evitar compactação e permitir espaço aerado dentro da UE. Utilizando-se a umidade de 50 % da CRA, a quantidade adicionada ao tubete foi de 200 g de substrato contaminado. Sobre o SAT, foram depositados os esporos e realizada a semeadura das espécies hospedeiras. Para a soja foram colocadas 2 sementes e para braquiária 10 sementes em cada UE. Uma vez estando, esporos e sementes, inseridos na UE, uma camada adicional de 20 g do substrato contaminado foi utilizada como cobertura. A Figura 33 apresenta esquema de montagem das UEs e do sistema de ajuste de umidade.

Ao finalizar a montagem das UEs, inseriu-se em cada uma delas, dois fios de barbante de algodão cru nº 10 da superfície até uma profundidade de aproximadamente 3 cm, para permitir que o ajuste de umidade se desse por capilaridade. Os barbantes possuíam comprimento suficiente para alcançar o recipiente com água destilada. A Figura 34 demonstra como o sistema de ajuste de umidade por capilaridade foi implantado durante a condução dos experimentos.

Figura 33 - Esquema de montagem das unidades experimentais para os experimentos *in vivo* e do sistema de ajuste de umidade adotado.

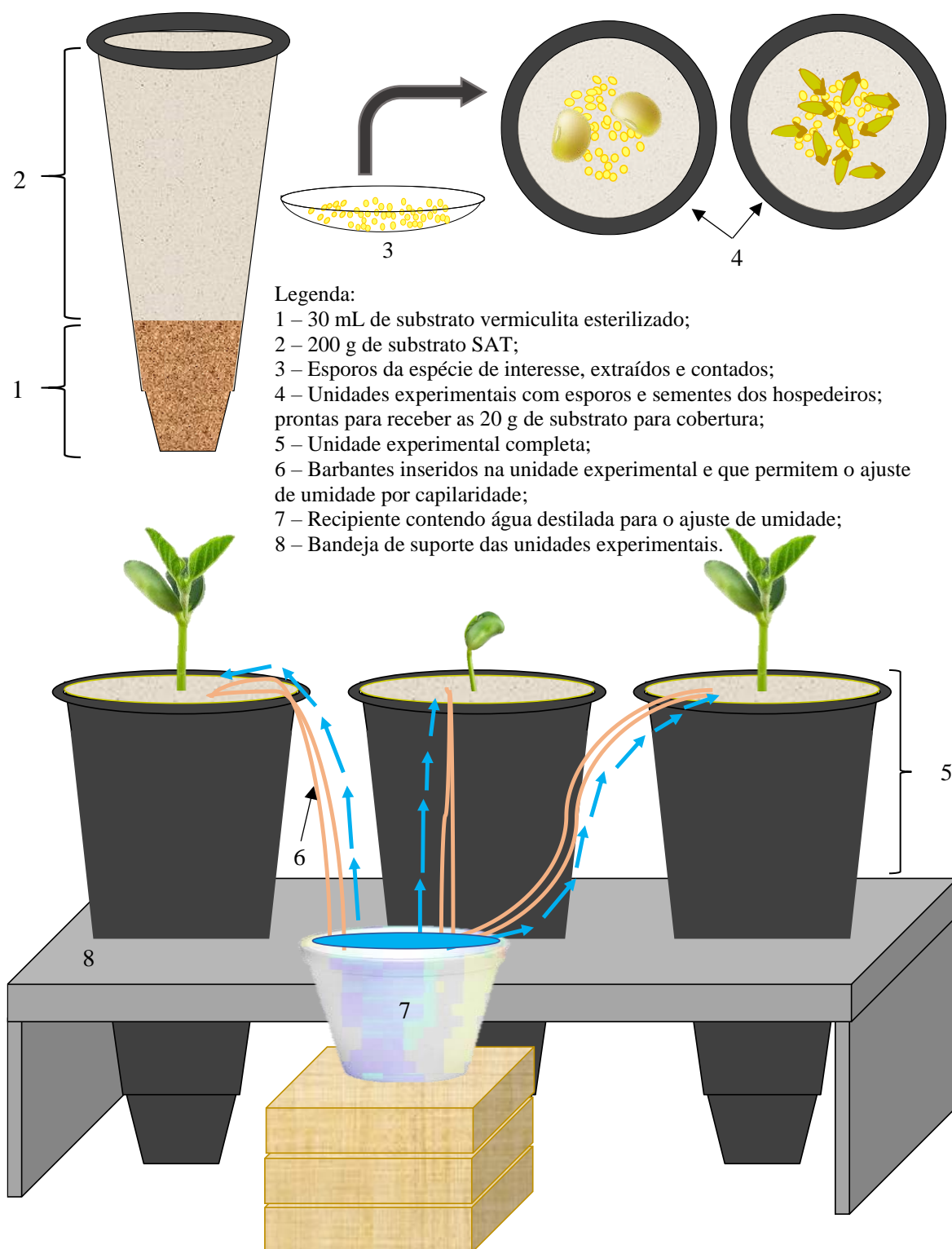
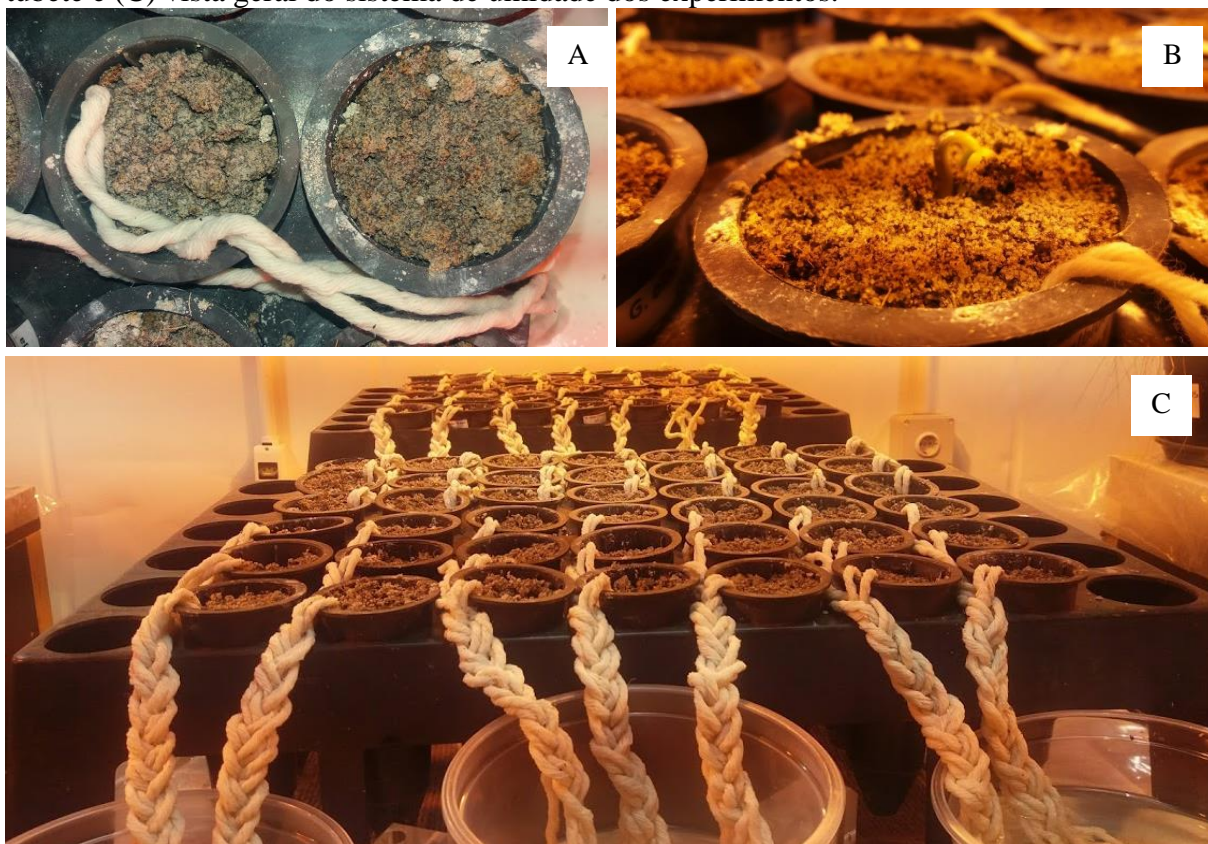


Figura 34 - Sistema de ajuste de umidade por capilaridade foi utilizado durante a condução dos experimentos *in vivo*. (A) Posição de inserção do barbante, (B) vista aproximada do barbante + tubete e (C) vista geral do sistema de umidade dos experimentos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Após instalados, os experimentos tinham sua umidade ajustada de umidade a cada três dias. Para tal, os barbantes eram postos em um recipiente com água destilada e, após 24 h, os barbantes eram retirados do recipiente cessando assim, a reposição de água. Ao longo da primeira semana, 5 tubetes eram pesados para fins de verificar se o sistema de ajuste de umidade supria a demanda de água e esse tempo de permanência na água foi considerado suficiente para manter o substrato em uma umidade próxima daquela da montagem das UEs. À medida que as sementes foram germinando e as plantas crescendo, a demanda por água do sistema aumentou e a partir da 3ª semana de condução o ajuste de umidade passou a ser realizado a cada dois dias.

Aos 14 dias de experimento, tempo suficiente para garantir que todas as UEs tivessem ao menos uma plântula, realizou-se o desbaste. Uma planta foi mantida, quando o experimento possuía a soja como hospedeiro e duas quando o hospedeiro era braquiária.

Após 8 semanas (56 dias) os experimentos foram desmontados. Para cada UE, a parte aérea foi separada do restante da amostra e conteúdo contido no tubete foi todo (raízes, SAT e vermiculita) colocado em uma bandeja. As raízes foram separadas do substrato, lavadas e armazenadas em água destilada até serem avaliadas e o substrato armazenado em sacos

plásticos para posteriores avaliações. Tanto as raízes, quanto o substrato foram armazenados em geladeira a 4 °C a partir da desmontagem dos experimentos.

### 5.2.5 Variáveis simbióticas avaliadas

Raízes e substrato de cada tratamento e repetição foram avaliados para as variáveis de colonização radicular (total e arbuscular); número de esporos e comprimento micelial extrarradicular total do substrato.

#### 5.2.5.1 Percentual de colonização radicular

Após separadas do substrato, as raízes foram lavadas de forma a remover todo o substrato a elas aderido. As amostras foram mantidas em água destilada (que deve ser trocada a cada 7 dias caso as amostras permaneçam por períodos prolongados sem serem avaliadas). O processo de coloração seguiu conforme proposto por proposto por Koske & Gemma (1989) com ajuste de tempo para cada etapa. Inicialmente as raízes foram imersas em solução de KOH 10 % por 50 min em banho-maria à temperatura de 90 °C. Após o KOH, as amostras de raízes foram lavadas abundantemente em água corrente para remover qualquer resíduo da solução. Na sequência as raízes foram colocadas em solução de HCl 2 % e mantidas nessa solução por 60 min. A solução de HCl foi removida e as amostras cobertas com uma solução de glicerol acidificado (500 ml Glicerina, 450 ml água destilada, 50 ml HCL 1%) contendo 0,05% de azul de tripan (0,5 g em 1 L de solução). Entre a remoção do HCl e a imersão em solução de azul de tripan as amostras não foram lavadas. Uma vez imersas na solução de azul de tripan as raízes foram deixadas em banho-maria à 90 °C, por 60 minutos, retiradas do banho-maria e deixadas na mesma solução *overnight*. No dia seguinte, as amostras de raízes foram removidas da solução corante, lavadas superficialmente para a remoção do excesso de solução e acondicionadas em recipientes contendo água destilada. As raízes coradas foram mantidas em geladeira a 4 °C até a montagem das lâminas.

As raízes coradas de cada amostra foram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm e dispostas em lâminas de microscopia. Como cada tratamento contou com 6 repetições, apenas 1 lâmina com 10 fragmentos foi montada por amostra. O percentual de colonização total seguiu o proposto por McGonile et al. (1990). As estruturas foram observadas em microscópio com aumento de 400x, determinando sua presença ou ausência em 50 pontos observados. Foi considerado como ponto colonizado do fragmento, aquele que apresentou a presença de pelo

menos uma estrutura fúngica (hifa, vesícula, arbúsculo ou esporo). O número de pontos observados foi definido em função no número de repetições por tratamentos em comparação prévia com a avaliação em 100 e 200 pontos por lâmina. O percentual de colonização total, colonização por hifas, vesículas e arbúsculos, considerando os valores de fragmentos colonizados em relação aos não colonizados, foi calculado.

#### 5.2.5.2 *Número de esporos no substrato*

Para cada tratamento e repetições uma amostra de 50 g de substrato foi pesada. Os esporos foram extraídos do substrato pelo método de peneiragem úmida (GERDEMANN; NICOLSON, 1963).

1. A amostra foi colocada em um béquer de plástico com capacidade de 2 L, ao qual adicionou-se água da torneira (aproximadamente 1,7 L). Amostra mais água eram agitadas vigorosamente com um bastão de vidro. Após a agitação, a suspensão passava por um processo de decantação e após esse período, o sobrenadante era transferido para duas peneiras sobrepostas, tomando-se o cuidado para que a maioria das partículas de substrato, ficasse retida no béquer. A operação de agitação, decantação e transferência para as peneiras foi repetida por três vezes. Para fins de padronização cronometrou-se o tempo de agitação para 30 s e o de decantação para 1 min;
2. Como se tinha conhecimento de quais eram as espécies de FMA, as malhas das peneiras utilizadas tinham aberturas de 300  $\mu\text{m}$  (peneira de cima) e de 53  $\mu\text{m}$  (peneira de baixo);
3. O material retido na peneira 53  $\mu\text{m}$  era transferido inicialmente para um béquer com capacidade para 50 mL, com a menor quantidade de água possível;
4. Posteriormente o conteúdo do béquer era transferido para tubos Falcon de 50 mL contendo gradiente de sacarose (20 % e 60 %; 15 ml de cada uma das soluções);
5. Os tubos eram então centrifugados por 2 minutos a 2000 rpm para separar partículas mais pesadas do substrato (que sedimentam) dos esporos e partículas orgânicas finas (que ficam suspensos na sacarose);
6. Apenas o sobrenadante do material contido nos tubos Falcon foi vertido novamente na peneira de 53  $\mu\text{m}$  e o material ali retido lavado com água de torneira para remover o excesso de sacarose e transferido para o béquer de 50 mL;
7. Os esporos e extraídos eram armazenados em geladeira (4° C) até sua avaliação.

Os esporos presentes em cada amostra foram contados sob microscópio estereoscópico e os dados anotados.

### 5.2.5.3 Comprimento micelial extrarradicular total no substrato

A quantificação do comprimento de micélio extrarradicular total no substrato (CMET) foi realizada conforme descrito por Melloni (1996) e Melloni & Cardoso (1999).

Pesaram-se três sub-amostras com 10 g de substrato úmido cada; duas foram usadas para a extração do CMET e a terceira foi utilizada para determinação do seu teor de água após secagem em estufa (105 °C durante 24 h). A extração do micélio foi realizada conforme descrito a seguir:

1. Em um béquer de 1 L, adicionaram-se a amostra de substrato e aproximadamente 500 mL de água da torneira. Água e amostra passaram por um processo de agitação manual com bastão de vidro para quebrar os pequenos aglomerados do substrato;
2. Após um período de decantação, peneirou-se a suspensão do substrato em peneiras sobrepostas, com malhas de 1 e 0,25 mm. Abaixo das peneiras sobrepostas foi colocado um béquer com capacidade de 2 L, para recolher o filtrado a ser usado nas etapas seguintes. A operação de agitação manual e posterior filtração foi repetida por três vezes. Para fins de padronização cronometrou-se o tempo de agitação manual para 30 s e o de decantação para 1 min;
3. O volume filtrado pelas peneiras deveria atingir um volume final próximo de 1500 mL. Esse volume foi levado para um liquidificador e agitado durante 30 s;
4. Após a agitação, o filtrado passou por um período de repouso de 2 minutos no próprio recipiente e dali uma alíquota de 500 mL de sobrenadante, foi passado por uma peneira de 0,045 mm;
5. O material retido nesta peneira foi armazenado em recipiente plástico, com tampa e armazenados em congelador até a sua filtração em bomba de vácuo;
6. Antes da filtração em bomba de vácuo, as amostras foram retiradas do congelador e, estando completamente degeladas foram filtradas a vácuo em membrana quadriculada de nitrato de celulose, com diâmetro de 4,7 cm e porosidade de 0,47 µm. Toda a amostra contida no recipiente foi utilizada na filtração. As membranas foram previamente identificadas e um campo contendo 64 campos (8 x 8 quadriculados) foi demarcada;
7. Após a amostra filtrada estar completamente seca, a membrana foi colocada sob lâmina de vidro de 5 x 5 cm, lubrificada com uma gota de óleo de amêndoas para facilitar a visualização no microscópio óptico;
8. Foram avaliados os 64 campos em cada membrana, a partir observação das hifas em um dispositivo reticulado acoplado a umas das oculares do microscópio. O dispositivo

denominado na literatura estrangeira como *'Eye piece Whiplle disc'*, constitui-se de uma *grid* de 10 x 10 quadrículos (cada quadrículo ou retículo possui dimensões de 1mm x 1mm). O número de intersecções das hifas com as linhas horizontais desse *grid* foi contado sob microscópio no aumento de 625 vezes (25x da ocular; 25x da objetiva);

O comprimento do micélio extrarradicular total, é expresso em centímetros de hifa por grama de solo seco e o número de intersecções obtidas anteriormente foi transformado em comprimento de micélio através da equação de Newman (1966). A determinação das incógnitas dessa equação seguiu informações contidas em Cardoso-Filho (1994), Melloni (1996) e Nogueira (1997). A equação de Newman é dada pela fórmula:

$$R = (\pi * A * n) / 2 * H \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

R = comprimento do micélio extrarradicular avaliado nos 64 campos da membrana (mm);

A = área interna avaliada de um reticulado do dispositivo, no aumento considerado (1 mm<sup>2</sup> x 625 x 64 campos na membrana = 40.000 mm<sup>2</sup>);

H = comprimento total das linhas horizontais do *grid* contido no dispositivo, no aumento considerado (1 retículo = 1mm; 1 linha contendo 10 retículos = 10 mm) (10 mm x 10 linhas x 625 = 62500 mm);

n = número de intersecções das hifas nas linhas horizontais do *grid* contido no dispositivo.

Como as intersecções foram obtidas por amostragem em 64 campos da membrana, utilizou-se um fator de correção para extrapolar o valor para a área útil da membrana. Considerou-se como área útil aquela coberta pela amostra (o equipamento de filtração utilizado acoplado a bomba de vácuo possuía diâmetro de 4 cm; logo 1256,64 mm<sup>2</sup> x 625 = 785.400 mm<sup>2</sup>). Temos então:

$$R * (785.400 / 40.000) = 19,635 * R \quad (\text{Equação 2})$$

A quantidade de micélio obtida até então, refere-se a uma alíquota de 5000 mL retirada do liquidificador. Ajustando-se o cálculo para o volume inicial de filtrado, tem-se:

$$19,635 * R (1500/500) = 58,905 * R \quad (\text{Equação 3})$$

É preciso ainda considerar no cálculo a quantidade de água contida no substrato ( $\theta$ ) para se obter o R total (RT). Esse dado foi obtido a partir da terceira amostra inicial pesada e é expressa em g de água por g de substrato. Logo:

$$RT = 58,905 * R / (10 - \theta) \quad (\text{Equação 4})$$

Substituindo a Equação 1 na Equação 4, teremos:

$$RT = \{ 58,905 * [(\pi * A * n) / (2 * H)] / (10 - \theta)$$

$$RT = \{ 58,905 * [(\pi * 40.000 * n) / (2 * 62.500)] / (10 - \theta)$$

$$RT = [58,905 (1,0053*n)] / (10 - \theta)$$

$$RT = 59,2172 *n / 10 - \theta \text{ (expresso em mm g}^{-1}\text{)} \quad \text{(Equação 5)}$$

ou

$$RT = 5,92172 *n / 10 - \theta \text{ (expresso em g}^{-1}\text{)}$$

ou

$$RT = 0,05922 *n / 10 - \theta \text{ (expresso em m g}^{-1}\text{)}$$

### 5.2.6 Análise estatística

Para cada experimento e variável avaliada os dados foram submetidos aos cálculos de média, desvio padrão, bem como a verificação da presença de *outliers*. Foram verificados os pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (Teste de Bartlett). Quando as premissas não foram atendidas, os dados de percentual de colonização foram transformados usando  $[(asen(\sqrt{x}))/180*\pi]$ , os dados de número de esporos usando a transformação  $[(x + 0,5)^{1/2}]$  e os dados de comprimento micelial total usando a transformação  $[\log(x)]$ . Em seguida cada variável foi analisado através de ANOVA (One way) seguido de teste Dunnett ( $p < 0,05$ ) para avaliar a existência de diferenças significativas entre cada concentração testada e o controle permitindo a determinação da concentração de efeito não observado (CENO).

Também foram determinados os valores de  $CI_{50}$  (concentração originando 50 % de inibição na variável analisada) os valores de  $CI_{20}$  e  $CI_{10}$  (concentração originando 20 % e 10 % de inibição na variável analisada, respectivamente), utilizando-se modelos de regressão não linear de acordo com o Environment Canada (EC, 2005) e o software Statistica 10.0 (StatSoft 2011).

Como os experimentos foram propostos como ferramenta para a etapa *lower tier* no esquema de análise de risco, em adição às análises descritas acima calculou-se a Concentração Ambiental Prevista inicial das substâncias testadas no solo ( $PEC_{inicial}$ ). A PEC calculada será comparada com os valores de  $CI_{10}$  calculados para cada variável analisada. A fórmula de cálculo para a  $PEC_{inicial}$  foi proposta por Focus (1997):  $[PEC_{inicial} = A \times (1 - f_{int}) / (100 \times \text{depth} \times \text{bd})]$ , onde A = taxa de aplicação da substância ( $\text{g ha}^{-1}$ );  $f_{int}$  = fração interceptada pelo dossel da cultura; depth = profundidade (cm) e bd = densidade do solo seco ( $\text{g cm}^3$ ).

Embora tenham sido utilizadas plantas hospedeiras nos experimentos, a contaminação foi realizada no momento da montagem do experimento, logo, consideramos que todo o fungicida aplicado atingiu o solo (0% de interceptação pela cultura - pior cenário possível), que o produto foi distribuído homogeneamente na camada superior do solo de 5 cm em um solo



com densidade de 1,5 (FOCUS, 1997). A taxa de aplicação do produto foi calculada em 1500 g ha<sup>-1</sup> e a PEC<sub>inicial</sub> calculada é igual a 2 mg kg<sup>-1</sup>.

### 5.3 RESULTADOS

Os resultados dos experimentos serão apresentados na sequência e para maior clareza na descrição serão apresentados por variável avaliada.

#### 5.3.1 Percentual de colonização radicular

Ao serem tabulados os dados relativos ao percentual de colonização radicular, três pontos foram observados: (1) não houve a presença de esporos nas raízes avaliadas de nenhum dos experimentos, logo essa variável não constará nos resultados; (2) a colonização micorrízica promovida pela espécie *G. albida* (experimentos 1 e 2) não forma vesículas e para não adotar-se variáveis distintas entre os experimentos, a colonização por essa estrutura para os experimentos 3 e 4 não foi considerada; (3) a presença de hifas nas raízes colonizadas gerou percentuais de colonização muito próximos dos calculados para colonização total e por isso, somente os dados dessa última são apresentados. Os arbúsculos são as estruturas fúngicas especializadas na troca de nutrientes entre simbionte e hospedeiro, importantes nos processos envolvendo a eficiência do fungo e por isso, os dados de colonização por arbúsculos foram considerados como uma variável avaliada juntamente com o percentual de colonização total.

##### 5.3.1.1 Percentual de colonização total

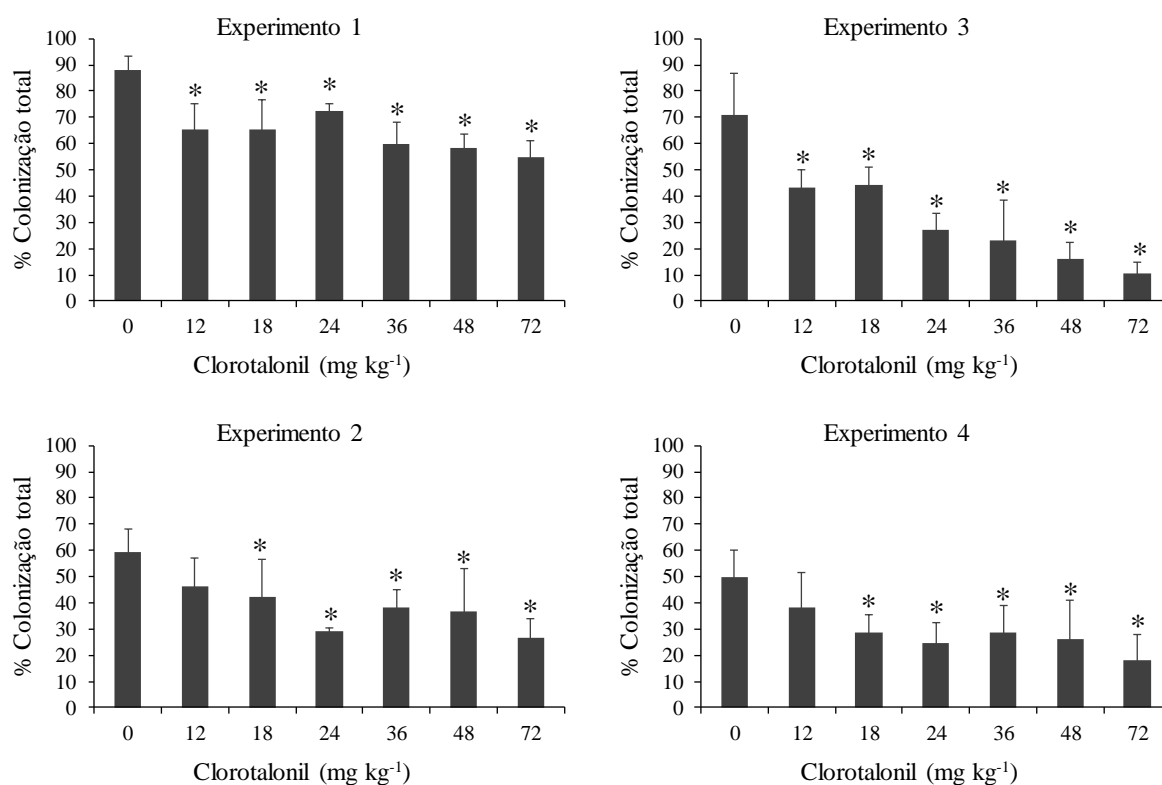
A colonização total foi mais alta nos tratamentos controles dos experimentos 1 e 3 que tinham a soja como hospedeiro em relação aos experimentos 2 e 4 com braquiária. Para os dois primeiros, os percentuais médios de colonização do controle foram de 88 % e 71 %, respectivamente e a concentração de efeito não observado (CENO) foi estimada como sendo < 12 mg kg<sup>-1</sup> para ambos os experimentos. Experimentos 2 e 4 tiveram média de 59 % e 50 % de colonização no tratamento controle, respectivamente e a CENO foi estimada em 12 mg kg<sup>-1</sup>.

A Figura 35 apresenta os gráficos relativos ao percentual de colonização total dos 4 experimentos e representa também os resultados dos Testes de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

Entre os valores de CI calculados para essa variável, o experimento 3 foi o que apresentou os menores valores de CI<sub>50</sub> (17,5 mg kg<sup>-1</sup>) e o experimento 3 os menores valores de

CI<sub>20</sub> (9,6 mg kg<sup>-1</sup>) e CI<sub>10</sub> (1,4 mg kg<sup>-1</sup>). Os demais valores de CI calculadas para essa variável, juntamente com a CENO são apresentados na Tabela 6.

Figura 35 - Percentual de colonização total das raízes dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil. Experimento 1 – *G. albida* + soja; Experimento 2 – *G. albida* + braquiária; Experimento 3 – *R. clarus* + soja; Experimento 4 – *R. clarus* + braquiária.



Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\sigma$  – desvio padrão. Fonte: Produção da autora, 2020.

Tabela 6 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para a variável % de colonização total dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil.

Experimento	CENO	CI <sub>50</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>20</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>10</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico
1	< 12 mg kg <sup>-1</sup>	> 72 mg kg <sup>-1</sup>	<b>9,6</b> [0,1 - 22,2] Logístico	<b>1,4</b> [0,1 - 4,8] Logístico
2	12 mg kg <sup>-1</sup>	<b>69,7</b> [42,8 - 97,0] Linear	<b>28,0</b> [17,1 - 38,8] Linear	<b>13,98</b> [8,6 - 19,4] Linear
3	< 12 mg kg <sup>-1</sup>	<b>17,5</b> [5,0 - 20,1] Hormesis	<b>14,67</b> [12,2 - 17,1] Linear	<b>7,3</b> [6,1 - 8,6] Linear
4	12 mg kg <sup>-1</sup>	<b>56,5</b> [35,9 - 77,2] Linear	<b>22,62</b> [14,4 - 30,9] Linear	<b>11,3</b> [7,2 - 15,4] Linear

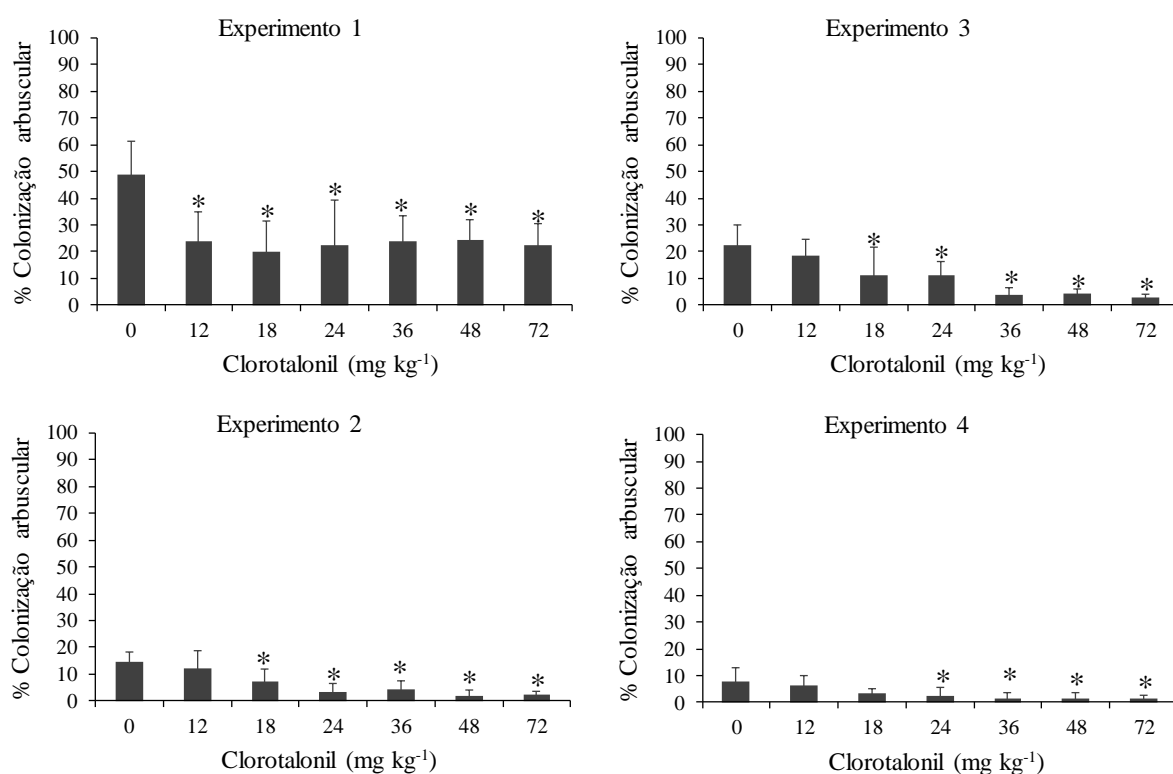
CI<sub>50</sub>, 20 e 10 = concentração de inibição de 50 %, 20 % e 10 % da variável avaliada; IC - intervalos de confiança.

Fonte: Produção da autora, 2020.

### 5.3.1.2 Colonização por arbúsculos

A colonização por arbúsculos seguiu a tendência da colonização total e apresentou maiores valores tratamentos controles dos experimentos 1 e 3. Para esses experimentos, os percentuais médios de colonização por arbúsculos no controle foram de 49 e 22 %, respectivamente e a CENO foi estimada como sendo  $< 12 \text{ mg kg}^{-1}$  para o experimento 1 e em  $12 \text{ mg kg}^{-1}$  para o experimento 2. Experimentos 2 e 4 tiveram em média 18 e 8 % de colonização no tratamento controle e a CENO foi estimada em  $12 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $18 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. O percentual de colonização por arbúsculos dos 4 experimentos e a representação dos resultados dos Testes de Dunnett ( $p < 0,05$ ) são apresentados na Figura 36.

Figura 36 - Percentual de colonização por arbúsculos nas raízes dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil. Experimento 1 – *G. albida* + soja; Experimento 2 – *G. albida* + braquiária; Experimento 3 – *R. clarus* + soja; Experimento 4 – *R. clarus* + braquiária.



Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão. Fonte: Produção da autora, 2020.

O experimento 1 apresentou os maiores valores para as três CIs calculadas. Os experimentos 2, 3 e 4, apresentaram valores de CI numericamente semelhantes. Esses valores, juntamente com a CENO são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para a variável de % de colonização por arbúsculo dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil.

Experimento	CENO	CI <sub>50</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>20</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico	CI <sub>10</sub> [IC <sub>95%</sub> ] Modelo estatístico
1	< 12 mg kg <sup>-1</sup>	> 72 mg kg <sup>-1</sup>	<b>31,9</b> [1,6 - 62,3] Linear	<b>16,0</b> [0,8-31,2] Linear
2	12 mg kg <sup>-1</sup>	<b>17,8</b> [11,4 - 24,2] Linear	<b>11,9</b> [8,1 - 15,6] Hormseis	<b>6,3</b> [4,6 - 8,1] Linear
3	12 mg kg <sup>-1</sup>	<b>20,9</b> [13,1 - 28,8] Logístico	<b>10,6</b> [3,4 - 17,8] Logístico	<b>7,1</b> [0,6 - 13,6] Logístico
4	18 mg kg <sup>-1</sup>	<b>23,8</b> [16,4 - 31,2] Linear	<b>9,52</b> [6,54 - 12,5] Linear	<b>4,8</b> [3,3 - 6,3] Linear

CI<sub>50</sub>, 20 e 10 = concentração de inibição de 50 %, 20 % e 10 % da variável avaliada; IC - intervalos de confiança.

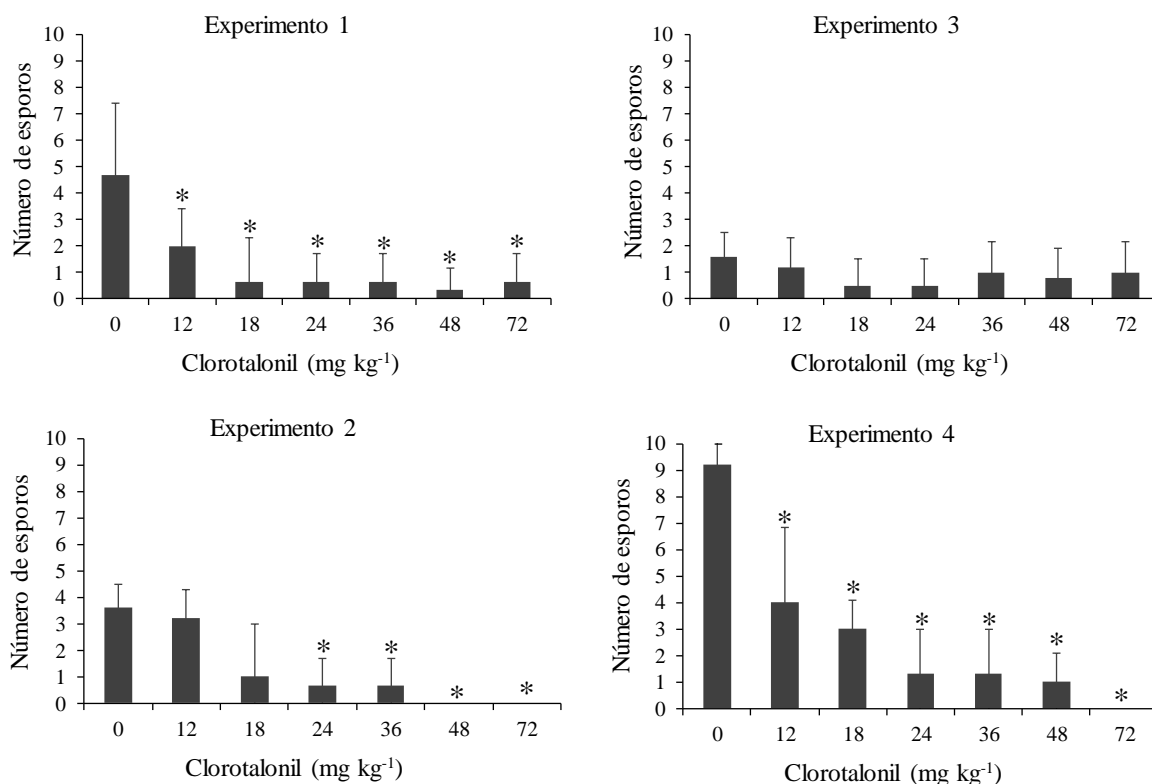
Fonte: Produção da autora, 2020.

### 5.3.2 Número de esporos no substrato

Diferentemente das variáveis descritas acima, o número de esporos no substrato não seguiu a tendência de maior número no controle de determinada espécie de hospedeiro. Para essa variável o maior número médio de esporos foi encontrado no experimento 4, com 9 esporos, seguido do experimento 1 com 5 esporos, experimento 2 com 4 esporos e experimento 3 com uma média de dois esporos. As CENO foram estimadas em < 12 mg kg<sup>-1</sup> para os experimentos 1 e 4, 18 mg kg<sup>-1</sup> para o experimento 2 e > 72 mg kg<sup>-1</sup> para o experimento 3. A Figura 37 apresenta os gráficos referentes ao número de esporos no solo dos 4 experimentos, juntamente com representação dos resultados dos Testes de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

Houve diferenças do efeito do Clorotalonil sobre o número de esporos entre os experimentos. Não foi possível calcular nenhuma CI para o experimento 3 (CI<sub>50</sub>, 20 e 10 > 72 mg kg<sup>-1</sup>). Os valores calculados de CIs para o experimento 2 foram intermediários e os calculados para os experimentos 1 e 4, foram aquelas com menos valor numérico. Os valores são apresentados na Tabela 8.

Figura 37 - Número de esporos no substrato dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil. Experimento 1 – *G. albida* + soja; Experimento 2 – *G. albida* + braquiária; Experimento 3 – *R. clarus* + soja; Experimento 4 – *R. clarus* + braquiária.



Os dados (mostrados não transformados) são médias de 6 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão. Fonte: Produção da autora, 2020.

Tabela 8 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição ( $CI_{50}$ ,  $CI_{20}$  e  $CI_{10}$ ) para a variável n° de esporos no substrato para os experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil.

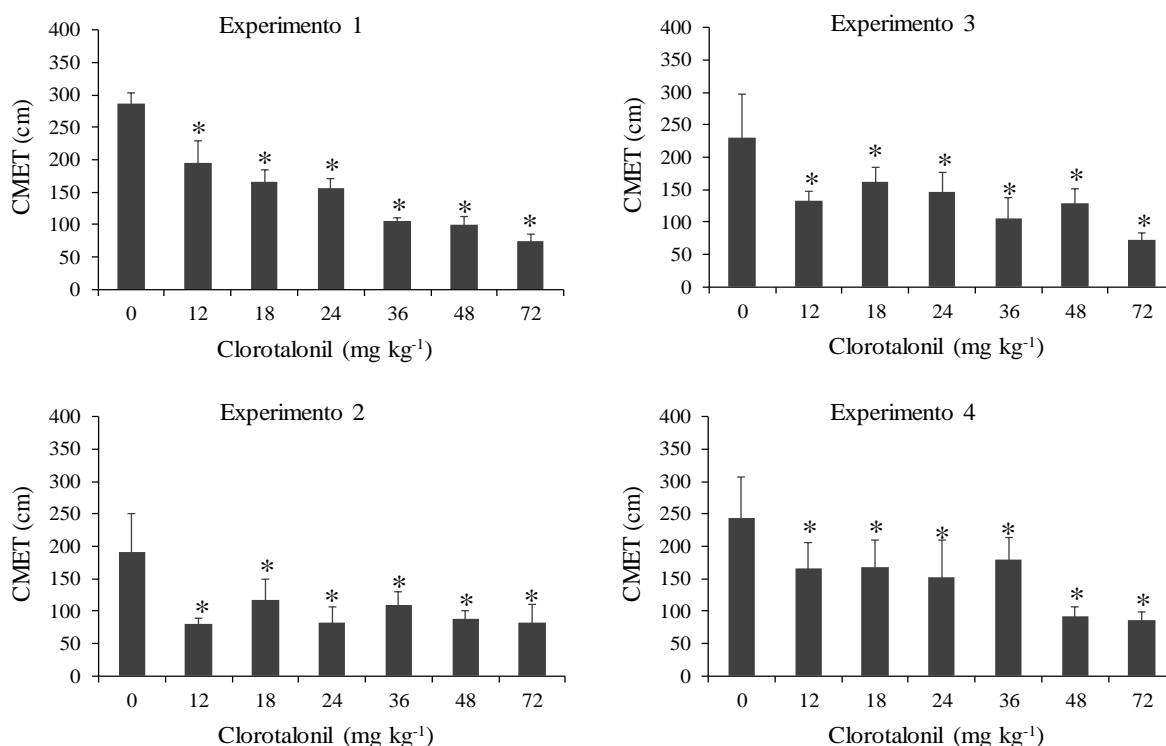
Experimento	CENO	$CI_{50}$ [IC95%] Modelo estatístico	$CI_{20}$ [IC95%] Modelo estatístico	$CI_{10}$ [IC95%] Modelo estatístico
1	< 12 mg kg <sup>-1</sup>	<b>7,4</b> [2,1 - 12,6] Exponencial	<b>3,1</b> [1,0 - 5,1] Exponencial	<b>2,0</b> [0,4 - 3,6] Exponencial
2	18 mg kg <sup>-1</sup>	<b>16,2</b> [12,3 - 20,1] Logístico	<b>11,8</b> [7,1 - 16,5] Logístico	<b>9,9</b> [4,8-15,0] Logístico
3	> 72 mg kg <sup>-1</sup>	> 72 mg kg <sup>-1</sup>	> 72 mg kg <sup>-1</sup>	> 72 mg kg <sup>-1</sup>
4	< 12 mg kg <sup>-1</sup>	<b>10,1</b> [7,0 - 13,1] Exponencial	<b>3,7</b> [2,5 - 4,8] Exponencial	<b>2,0</b> [0,81 - 3,3] Exponencial

$CI_{50}$ ,  $CI_{20}$  e  $CI_{10}$  = concentração de inibição de 50 %, 20 % e 10 % da variável avaliada; IC - intervalos de confiança. Fonte: Produção da autora, 2020.

### 5.3.3 Comprimento micelial extrarradicular total no substrato

Para a variável CMET, os valores médios de comprimento de hifas no tratamento controle foram de 287, 198, 230 e 244 cm g<sup>-1</sup> de substrato seco nos experimentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Em todos os experimentos o efeito do Clorotalonil se deu já sobre a menor concentração testada (12 mg kg<sup>-1</sup>) e, a CENO foi estimada em < 12 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 38). O experimento 1 teve os menores valores de CI determinados para essa variável (CI<sub>50</sub> = 24,8, CI<sub>20</sub> = 6,2 e CI<sub>10</sub> = 2,1 mg kg<sup>-1</sup>). Para os demais experimentos os valores determinados apresentam semelhança numérica e estão apresentados na Tabela 9.

Figura 38 - Comprimento micelial extrarradicular total (cm g<sup>-1</sup> de substrato) no substrato dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil. Experimento 1 – *G. albida* + soja; Experimento 2 – *G. albida* + braquiária; Experimento 3 – *R. clarus* + soja; Experimento 4 – *R. clarus* + braquiária.



Os dados (mostrados não transformados) são médias de 12 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão.

Fonte: Produção da autora, 2020.

Tabela 9 - Valores de concentração de efeito não observado (CENO) e de concentração de inibição (CI<sub>50</sub>, CI<sub>20</sub> e CI<sub>10</sub>) para a variável de comprimento micelial extraradicular total no substrato dos experimentos conduzidos *in vivo*, contaminados com Clorotalonil.

Experimento	CENO	CI <sub>50</sub> [IC95%]	CI <sub>20</sub> [IC95%]	CI <sub>10</sub> [IC95%]
		Modelo estatístico	Modelo estatístico	Modelo estatístico
1	< 12 mg kg <sup>-1</sup>	<b>24,8</b> [22,0 - 27,5] Hormesis	<b>6,2</b> [2,4 - 10,1] Hormesis	<b>2,1</b> [-1,42 - 5,6] Hormesis
2	< 12 mg kg <sup>-1</sup>	<b>69,3</b> [40,2 - 98,3] Linear	<b>27,71</b> [16,1 - 39,3] Linear	<b>13,9</b> [8,6 - 19,7] Linear
3	< 12 mg kg <sup>-1</sup>	<b>55,1</b> [43,9 - 66,3] Linear	<b>22,0</b> [17,6 - 26,5] Linear	<b>11,0</b> [8,8 - 13,3] Linear
4	< 12 mg kg <sup>-1</sup>	<b>53,5</b> [43,0 - 63,9] Linear	<b>21,39</b> [17,2 - 25,6] Linear	<b>10,7</b> (8,6 - 12,8) Linear

CI<sub>50</sub>, 20 e 10 = concentração de inibição de 50 %, 20 % e 10 % da variável avaliada; IC - intervalos de confiança.

Fonte: Produção da autora, 2020.

#### 5.4 DISCUSSÃO

Dentro as características levantadas como desejáveis para um método ser utilizado em etapas inferiores de um esquema de análise de risco, a metodologia descrita neste capítulo pode ser considerada como adequada pois: (1) no que tange a possibilidade de padronização e uniformidade dos organismos utilizados, é possível saber exatamente com que espécie (uma vez que os organismos provêm de Coleções), com que geração e com quantos os organismos está se realizando o trabalho; (2) os esporos de FMA são facilmente manipuláveis; muito embora o processo de multiplicação de FMA possa ser considerado lento em relação a outros organismos, uma vez multiplicados, não são necessários cuidados rigorosos com a manutenção dos organismos que, se estocados em ambiente adequado mantêm-se viáveis por períodos prolongados (Capítulo 1, itens 2.3.3 e 2.4.3) sem a necessidade de manutenção periódica das culturas; (3) o método permite a avaliação da magnitude do efeito de forma indireta (variáveis da simbiose avaliadas) sobre o organismo; (4) os organismos, em maior ou menor escala, demonstraram ser sensíveis a presença do agrotóxico no solo e (5), a magnitude desses efeitos foi possível de determinação, estimando-se as concentrações que causem efeitos (CI<sub>x</sub>) nas variáveis avaliadas, a partir de métodos e modelos estatísticos já desenvolvidos e empregados comumente no âmbito da ecotoxicologia terrestre para outros organismos do solo.

No que diz respeito aos efeitos do agrotóxico, sobre as variáveis da simbiose avaliados nos 4 experimentos realizados, obteve-se resultados que variaram numericamente dependendo da combinação entre as espécies de simbionte e hospedeiro. Sobre esse ponto, é preciso considerar que as espécies de FMA interagem e reagem fisiologicamente de forma distinta, dependendo do seu hospedeiro e que as particulares de cada relação, pode ser fator determinante para que se encontrem efeitos positivos ou negativos das substâncias testadas sobre parâmetros da

simbiose micorrízica (HAGE-AHMED, ROSNER & STEINKELLN, 2019). A variação entre as concentrações calculadas para o CMET, por ser utilizada como exemplo, do que foi exposto acima. O experimento 1, que tinha *G. albida* como espécie simbiote, apresentou CIs ( $CI_{50} = 24,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $CI_{10} = 2,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) consideravelmente inferiores aos experimentos 2, 3 e 4 ( $CI_{50} = 69,3; 55,1; 53,5 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $CI_{10} = 13,9; 11,0; 10,7 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente), um dos quais (o experimento 2), inclusive, tinha a mesma espécie como simbiote. Além de reforçar a existência de particularidades entre interação entre diferentes espécies simbiote/hospedeiro, os dados apontam para a importância de não se utilizar dentro de um grupo-chave, apenas os efeitos sobre uma espécie, como representação do efeito sobre todo o grupo (EFSA,2017).

É evidente nos dados apresentados, principalmente quando se consideram os resultados para os Teste de Dunnett, que houve efeitos a aplicação de doses crescentes de Clorotalonil em todos os experimentos para as variáveis avaliadas (exceto nº de esporos, no experimento 3).

Outros autores encontraram efeitos do Clorotalonil sobre aspectos da simbiose micorrízica. Um estudo avaliou o efeito de Clorotalonil, em experimento de vasos e o seu efeito na inibição da simbiose micorrízica e o crescimento de plantas de *Leucaena leucocephala* em solo natural inoculado e não inoculado com *Glomus aggregatum*. Os autores observaram que o percentual de colonização diminuiu de 80 % no tratamento controle inoculado e 30 % no tratamento controle não inoculado para 15 % e 10 %, respectivamente, na concentração de  $150 \mu\text{g g}^{-1}$  (equivalente a  $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ), causando redução de mais de 60 % da colonização no tratamento com inoculação (AZIZ, HABTE & YUEN, 1991). Hernandez-Dorrego & Pares (2010) avaliaram o efeito de fungicidas sobre a simbiose micorrízica de duas espécies de *Glomus* (*Glomus intraradices* [Schenck & Smith] e *Glomus mosseae* [(Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trape]) inoculadas em plantas de cebola. O experimento em vasos teve a aplicação foliar de Clorotalonil a cada 7 dias na concentração de  $2 \text{ g L}^{-1}$  (de um produto comercial com 75 % de Clorotalonil, em uma concentração equivalente a  $140 \text{ mg i.a. kg}^{-1}$ ) e os efeitos causaram até 50,2 % de inibição da colonização das plantas de cebola. Os efeitos do Clorotalonil encontrados a partir dos experimentos *in vivo* descritos nesse capítulo (exceto para o experimento 1, onde a  $CI_{50}$  não pode ser calculada) se deram em doses inferiores às encontradas pelos autores citados acima. 50 % da colonização foi inibida nas concentrações de  $69,68 \text{ mg kg}^{-1}$  (experimento 2),  $56,5 \text{ mg kg}^{-1}$  (experimento 4) e de  $17,5 \text{ mg kg}^{-1}$  (experimento 3). Nenhuma comparação direta é possível, uma vez que os experimentos citados e os *in vivo*, foram conduzidos de forma distinta e esses últimos em solo artificial, mas reforçam a eficiência do método como modo de obtenção desse tipo de informações.



O Clorotalonil é um fungicida de contato, com ação multi-sítio (BRASIL, 2017; EPA, 2020), com indicação de atuação nas moléculas de tiol, afetando a respiração fúngica via e é considerado de baixo risco (EPA, 2020). No entanto, no que se refere a existência de risco de desse agrotóxico para os FMAs e sua simbiose, não há qualquer regulamentação que prevê um fator de segurança adequado, que indique a necessidade ou não de se dar andamento a uma ARE. A normativa da União Europeia (EFSA, 2015) considera atualmente para organismos da fauna do solo, em ensaios *lower tier*, que existe risco de determinada substância quando a relação entre a toxicidade medida para o organismo (a EFSA adota o valor de  $CI_{10}$ ) e a presença dessa substância no solo ( $PEC_{inicial}$ , aqui calculada em 2) for  $< 5$ . Entretanto, não se pode usar, deliberadamente esse mesmo fator para todos os grupos de organismos do solo, sem estudos prévios e robustez de dados que comportem essa abordagem.

Algumas inferências, no entanto, podem ser feitas. O valor de  $CI_{10}$  da variável % de colonização total do experimento 1 ( $CI_{10} = 1,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) é menor do que a  $PEC_{inicial}$  calculada para o Clorotalonil (igual a 2 para o produto comercial Bravonil 500<sup>®</sup>), indicando que esse produto causará risco para o estabelecimento da colonização radicular de plantas de soja, por esporos de *G. albida*. Os valores de  $CI_{10}$  da variável número de esporos para o experimento 1 ( $CI_{10} = 2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e 2 ( $CI_{10} = 2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e para a variável CMET do experimento 1 ( $CI_{10} = 2,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) são muito próximos do valor da  $PEC_{inicial}$  e indicam que provavelmente, o Clorotalonil oferece risco também para essas variáveis e que a execução de ensaios mais complexos (*higher tiers*) deveria ser considerada.

## 5.5 CONCLUSÃO

As variáveis propostas para avaliação (percentual de colonização total, percentual de colonização por arbúsculos, número de esporos no substrato e comprimento micelial extrarradicular total) apresentam sensibilidade à presença do agrotóxico no substrato e são possíveis de uso como indicadores do efeito de substâncias em testes ecotoxicológicos; a metodologia *in vivo* descrita é eficiente na obtenção de resultados para as variáveis propostas, é replicável e passível de padronização, podendo assim, ser utilizada como método em baterias de testes em etapas inferiores do esquema de análise de risco de agrotóxicos no solo.

## REFERÊNCIAS

AZIZ, T.; HABTE, M.; YUEN, J. E. Inhibition of mycorrhizal symbiosis in *Leucaena leucocephala* by chlorothalonil. **Plant Soil** 131:47-52 (1991).

doi: <https://doi.org/10.1007/BF00010418>

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.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. COORDENAÇÃO-GERAL DE AGROQUÍMICOS E AFINS. Ato n° 45, de 09 de junho de 2017. Disponível em [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/ATO45\\_DE09DEJUNHODE2017.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/ATO45_DE09DEJUNHODE2017.pdf). Acesso em: 05 de janeiro de 2020.

CARDOSO-FILHO, J. A. Quantificação do micélio extramatricial de *Glomus etunicatum* e da sua atividade, em simbiose com o milho. Piracicaba, 1994, 121 p. (Dissertação de mestrado) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

EC - Environment Canada. Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests, Method development and applications section. Report EPS 1/RM/46. In: **Environmental Protection Series**. Environment Canada. Environmental Technology Centre, Ottawa, ON, 2005.

EFSA, European Food Safety Authority. Draft EFSA Guidance Document for predicting environmental concentrations of active substances of plant protection products and transformation products of these active substances in soil. **EFSA Journal**. 2015. Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)

EFSA PPR Panel (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues), OCKLEFORD, C. et al. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. **EFSA J.**, pp 225, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4690>

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Common and trade names of select fungicides currently registered in the United States. disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/how-search-information-about-pesticide-ingredients-and-labels#PPLS>. Acesso em: 05 de janeiro de 2020.

FOCUS - Forum for the Co-ordination of pesticide fate models and their Use, 1997. Soil persistence models and EU registration: The final report of the work of the Soil Modelling

Work group of FOCUS. Contributors: J Boesten, A Helweg, M Businelli, L. Bergstrom, H Schaefer, A Delmas, R Kloskowski, A Walker, K Travis, L Smeets, R Jones, V Vanderbroeck, A Van Der Linden, S Broerse, M Klein, R Layton, O-S Jacobsen & D Yon.

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 Entwicklungen for schung: University of Bonn, 2004.

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. doi:[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)

HAGE-AHMED, K.; ROSNER, K.; STEINKELN, S. Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. **Pest Management Sci.** 75:583-590, 2019. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.5220>

HERNANDEZ-DORREGO, A.; PARES, J.M. Evaluation of some fungicides on mycorrhizal symbiosis between two *Glomus* species from commercial inocula and *Allium porrum* L. seedlings. **Span J Agric Res.** 8:43–50. (2010). doi: <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/201008S1-1222>

IPSILANTIS, I.; SAMOURELIS, C.; KARPOUZAS, D.G. The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biol Biochem.**, v. 45, p. 147 – 155, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.08.007>

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. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.12.004>

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, 92:486-505, 1989. doi: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80195-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80195-9)

McGONIGLE, T.P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.L; SWAN, J.A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. **The New Phytologist**, 115 (3):495-501,1990. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x>

MELLONI, R. A. Quantificação do micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. Piracicaba, 1996, 83 p. (Dissertação de mestrado) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MELLONI, R.; CARDOSO, E. J. B. N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas e endófitos: I. Método empregado. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 53-58, Mar. 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06831999000100007>.

NIEMEYER, J.C.; CARNIEL, L.S.C.; SANTO, F.B.; SILVA, M.; KLAUBERG-FILHO, O. Boric acid as reference substance for ecotoxicity tests in tropical artificial soil. **Ecotoxicol.**, Technical note:1-7 <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1915-7>

NOGUEIRA, A. N. colonização radicular de produção de micélio externos por duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em soja submetida a doses de fósforo. Piracicaba, 1997, 92 p. (Dissertação de mestrado) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (2016) Predatory mite (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) Reproduction test in soil. **OECD guideline for the testing of chemicals No. 226**. Paris, France.

STATSOFT. **STATISTICA 10.0 (data analysis software system)**. [s.l]. 2011. Disponível em <<http://www.statsoft.com>>.

## APÊNDICE D

O substrato utilizado em todos os sistemas experimentais prévio foi o Solo Artificial Tropical – SAT (75 % areia fina, 20 % caulim, 5 % fibra de coco triturada e pH ajustado para  $6,0 \pm 0,5$ ), com umidade ajustada para 50 % sua capacidade de retenção de água (CRA).

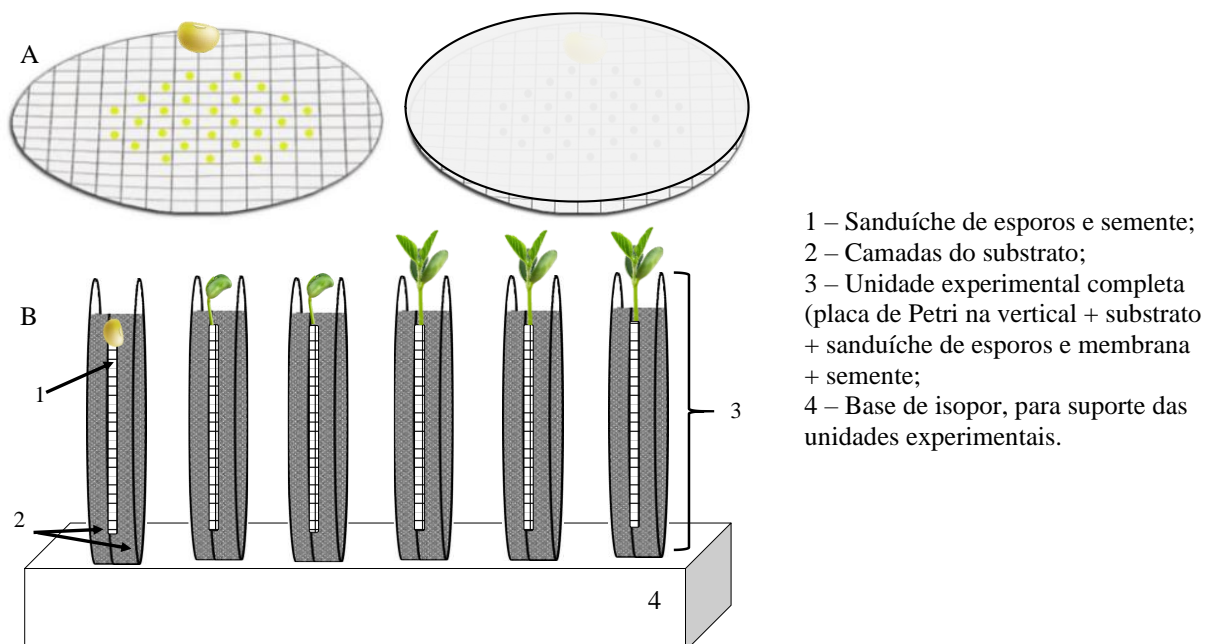
### Experimento *in vivo* 1

A metodologia foi pensada de forma semelhante a já existente para a fase pré-simbiótica, com os esporos dispostos em membranas de nitrocelulose, no número de 30 esporos por membrana. Montaram-se 6 repetições utilizando-se esporos de *Gigaspora albida* e 6 repetições com esporos de *Rhizophagus clarus*. A semente do hospedeiro era adicionada na fração superior da membrana; esporos e sementes eram recobertos por outra membrana, formando o que se denominou de “sanduíche de esporos e semente” (Figura 39A). O sanduíche era então, transferido para placas de Petri de plástico, entre duas camadas do substrato testado (aproximadamente 100 g de substrato foram inseridos em cada UE).

Numa primeira tentativa, utilizou-se como hospedeiro a soja (*Glycine max*, Nidera 5909), colocando-se uma semente por sanduíche. Para permitir o desenvolvimento do hospedeiro, as placas de Petri utilizadas foram adaptadas, realizando-se um ‘corte’ de aproximadamente 6 cm na borda, tanto na tampa, quanto na base da placa (por isso o uso de placas de plástico). Cada placa de Petri contendo o substrato e o sanduíche de esporos e semente constituiu uma unidade experimental (UE) (Figura 39B). Toda a porção inferior das placas foram seladas com filme de plástico (para evitar que o substrato perdesse muita umidade e que a placa se abrisse, desmontando o sistema) e elas foram posicionadas na vertical, com a abertura na posição superior (permitindo o desenvolvimento da plântula) em suportes de isopor. Foram incubadas câmaras de germinação com presença de fotoperíodo (12 h luz/12 h escuro) e correção da umidade realizada diariamente.

Após o período de incubação (foram testados 14, 21 e 28 dias) as UEs foram desmontadas, as plântulas retiradas das placas e as raízes separadas do substrato e lavadas para posterior avaliação. A coloração e posterior avaliação da colonização radicular seria a única variável avaliada. Em uma variação desse experimento prévio, montou-se posteriormente, UEs com sementes de braquiária (*Braquiaria brizantha* – 5 sementes por UE) como hospedeiro. Entraves do método com ambas espécies de hospedeiro: o tipo de iluminação da câmara de germinação utilizado pode não ter sido o mais adequado ao objetivos dos ensaios e provocou o estiolamento da planta; o ajuste de umidade através de adição de água destilada diretamente sobre o substrato acabou por provocar um deslocamento e posterior compactação do substrato na parte inferior na placa de Petri, prejudicando o desenvolvimento das raízes; após a coloração da raízes não observou-se a presença de nenhuma estrutura de colonização micorrízica.

Figura 39 - Esquema de montagem das unidades experimentais para o experimento prévio 1. (A) Montagem do sanduíche de esporos e semente; (B) Suporte e disposição das unidades experimentais.



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

### Experimento *in vivo* 2

Montou-se uma variação experimento *in vivo* 1, com montagem e avaliação aos 21 e aos 28 dias nos mesmos moldes citados anteriormente. Para este, a incubação em câmara de crescimento foi substituída para incubação em uma sala com condições controladas de temperatura (25 °C) e luminosidade (obtida através de lâmpadas com vapor metálico que simulam comprimentos de onda para plantas C3 e C4). As respostas foram as mesmas obtidas para o experimento anterior, não sendo observada nenhuma colonização radicular.

### Experimento *in vivo* 3

Tentando evitar os impasses anteriores e imaginando que um dos causadores no insucesso pudesse ser o tipo de recipiente utilizado para os ensaios, substituíram-se os ensaios de placa de Petri por ensaios em recipientes maiores. Optou-se por frascos de vidros do tipo *snap-caps*, com capacidade para 120 mL. O volume de 100 g de substrato foi mantido (ocupando cerca de 40 % do volume do recipiente). Utilizaram-se esporos tanto de *Gigaspora albida* como de *Rhizophagus clarus* (30 esporos por *snap-cap*) e, em adição às sementes de soja e braquiária, utilizaram-se sementes de sorgo (*Sorghum bicolor*) tipo sacarino e cebola (*Allium*

*cepa*) cultivar bola precoce. O fotoperíodo adotado foi de 12 h/12 h (luz/escuro), a temperatura externa de 25 °C e a umidade ajustada a cada dois dias.

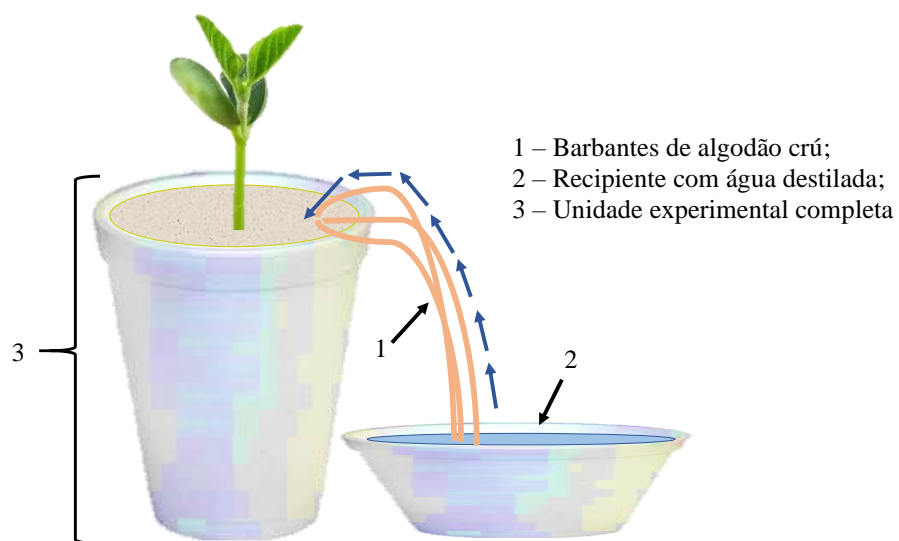
Entraves do método: obteve-se uma germinação muito baixa (< 20 %) tanto do sorgo, quanto da cebola, inviabilizando qualquer tipo de avaliação. Em adição a isso, o substrato passou a ser colonizado por outros grupos de fungos, que não os de interesse, mesmo quando a quantidade de água para a manutenção da umidade foi diminuída. Em função da quantidade de fungos indesejados as UEs foram desmontadas antes de 28 dias e nenhuma avaliação referente à simbiose micorrízica foi possível.

#### **Experimento *in vivo* 4**

Neste, manteve-se soja e braquiária como plantas hospedeiras e optou-se por um recipiente com volume maior e com abertura superior mais ampla que a dos *snap-caps*. As novas unidades experimentais foram montadas em copos de isopor com capacidade para 150 mL. Utilizaram-se esporos tanto de *Gigaspora albida* como de *Rhizophagus clarus* (50 esporos por UE). Foram adicionadas duas sementes para as UEs com soja e 5 sementes para as UEs com braquiária, num total de 24 UEs (6 UEs com de soja + *G. albida*; 6 UEs com braquiária + *G. albida*; 6 UEs com de soja + *R. clarus*; 6 UEs com braquiária + *R. clarus*). Novamente a umidade inicial do substrato foi de 50 % de sua CRA. O fotoperíodo adotado foi de 12 h/12 h (luz/escuro) e a temperatura externa era de 25 °C. Diferentemente dos demais experimentos prévios, neste, a umidade foi corrigida por capilaridade. Três fios de barbante de algodão cru, foram inseridos no substrato e a cada dois dias, os barbantes eram postos em um recipiente com água destilada (

Figura 40

Figura 40 - Esquema de ajuste de umidade por capilaridade para o experimento *in vivo* 4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.





## 6 CAPÍTULO 5: O USO DE MÉTODO DE SEMI-CAMPO PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CLOROTALONIL SOBRE OS FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

### RESUMO

Os *Terrestrial Model Ecosystems* - TMEs são mesocosmos definidos como sistemas controlados e reprodutíveis que buscam simular processos e interações dos componentes edáficos. A realização de experimentos em TME permite o estudo de amostras indeformadas de solo, aliando condições naturais do solo do campo e condições controladas de umidade, fotoperíodo e temperatura de um laboratório. Neste trabalho, avaliou-se em experimento de TME, os efeitos do fungicida Clorotalonil (Bravonil 500® g L<sup>-1</sup>) sobre características ecológicamente importantes da fase simbiótica de populações nativas de fungos micorrízicos arbusculares e verificou-se, a efetividade das variáveis da simbiose micorrízica selecionadas nos métodos de avaliação das fase pré-simbiótica e simbiótica desta tese. O experimento foi coletado em um Cambissolo, no município de Lages/SC em uma área sem histórico de aplicação de agrotóxicos. As amostras foram retiradas do campo com o auxílio de uma retroescavadeira e transferidas para uma sala climatizada, dispostas em carrinhos, com temperatura interior de 12 °C e exterior de 25 °C, simulando um gradiente real de temperatura do solo. As amostras passaram por um período de aclimação, calagem e subsequente plantio de sementes de soja (Coodetec CD 214) inoculadas (Masterfix® Soja). Foram realizadas 2 aplicações do agrotóxico nas concentrações de 0, 375, 750, 1500, 3000, 7500 e 15000 g ha<sup>-1</sup> e cada tratamento contou com 10 repetições. Os resultados indicaram a ausência de efeitos do fungicida para as variáveis relacionadas à colonização das raízes de soja (colonização total, por arbúsculos esporos e vesículas). Já o número de esporos e o comprimento de micélio extrarradicular total do solo foram afetados pelas aplicações de Clorotalonil em doses menores do que a de recomendação para a cultura (1500 g ha<sup>-1</sup> do ingrediente ativo).

**Palavras-chave:** Colonização radicular. Comprimento de hifas do solo. Esporulação. Populações de FMAs nativas. *Terrestrial Model Ecosystems*

## 6 CHAPTER 5: THE SEMI-FIELD METHOD USED FOR THE CHLOROTHALONIL EFFECT EVALUATION OF ON ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI

### ABSTRACT

The *Terrestrial Model Ecosystems* – TMEs are mesocosms defined as controlled and reproducible systems that seek to simulate processes and interactions of the edaphic components. The performance TME experiments allows the study of undisturbed soil samples, combining natural field soil conditions and laboratorial controlled conditions of humidity, photoperiod and temperature. In this study, it was evaluated in a TME experiment, the effects of fungicide Chlorothalonil (Bravonil 500<sup>®</sup> g L<sup>-1</sup>) on important characteristics of the symbiotic phase of native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) populations and it was verified, the effectiveness of the mycorrhizal symbiosis variables selected for the established protocols of the pre-symbiotic and symbiotic phase of this thesis. The experiment was collected in a Cambisol with no history of pesticide application, in the municipality of Lages/SC. The samples were removed from the field with the aid of a backhoe and transferred to an air-conditioned room, arranged in carts, with an indoor temperature of 12 °C and an external temperature of 25 °C, simulating a real gradient of soil temperature, went through a period of acclimatization, liming and subsequent planting of soybean seeds (Coodetec CD 214) inoculated (Masterfix<sup>®</sup> Soybean). Two applications of pesticide were performed with the 0, 375, 750, 1500, 3000, 7500, e 15000 g ha<sup>-1</sup> concentrations in 10 repetitions of each treatment. The results indicated no effects of fungicide on variables related to the colonization of soybean roots (total colonization, arbuscular colonization, spores and vesicles colonization). The number of spores and total extraradical hyphal length were affected by applications of Chlorothalonil in lower concentrations than that recommended for the culture (1500 g ha<sup>-1</sup> of the active ingredient).

**Palavras-chave:** Root colonization. Extraradical hyphal length. Sporulation. Native AMF populations. *Terrestrial Model Ecosystems*.

## 6.1 INTRODUÇÃO

A presença de contaminantes no solo pode afetar, direta ou indiretamente, os organismos expostos, alterando interações específicas entre componentes edáficos e organismos expostos, em uma proporção que não consegue ser medida através de testes com espécies isoladamente (KUPERMAN et al., 2009). Os métodos de semi-campo são uma ferramenta que permite ampliar a compreensão dos mecanismos pelos quais a contaminação pode afetar a estrutura e a função dos elementos do ecossistema solo, ampliando a relevância ecológica dos dados de toxicidade para avaliação de riscos em locais contaminados (WENTSEL et al., 2003; KUPERMAN et al., 2009).

Os métodos de semi-campo podem ser classificados em: (1) Sistemas montados artificialmente, que podem ser conduzidos sob condições ambientais controladas em laboratório ou no campo e que geralmente envolve espécies não nativas; (2) Modelos de ecossistemas terrestres, que envolvem amostras indeformadas de solo e comunidades nativas e podem ser conduzidos sob condições ambientais controladas de laboratório ou condições de campo e (3) Sistemas de campo, realizados com solo não perturbado, delimitando-se cercos no campo que avaliam comunidades nativas ou comunidades nativas e espécies introduzidas concomitantemente (MORGAN; KNACKER, 1994; SCHÄFFER et al., 2011).

Dentre os métodos de semi-campo, os modelos de ecossistemas terrestres (*Terrestrial Model Ecosystem – TME*) são possíveis de uso na avaliação da composição das comunidades naturais, dinâmica populacional, efeitos diretos ou indiretos e interações entre espécies em um modelo de exposição que simula condições reais de campo (SCHÄFFER et al., 2011; EFSA , 2017). Os TMEs são um método com nível de complexidade alta (*higher tier*) e tido como aceitável para a avaliação do risco ecológico de agrotóxicos no solo (KNACKER et al., 2004; SCHÄFFER et al., 2009; EFSA , 2017).

Os TMEs “in door” são mesocosmos definidos como sistemas controlados e reprodutíveis que permitem simular processos e interações entre organismos e demais componentes edáficos, gerando informações mais completas e realísticas do que as observadas nos testes ecotoxicológicos padrões de laboratório, pois utilizam amostras de um ecossistema natural (KNACKER et al., 2004; ANDRÉA, 2010; VAN GESTEL, 2012), aliando, portanto, vantagens de experimentos de laboratório e de campo.

Estudos em TMEs permitem avaliar comunidades microbianas do solo, como no trabalho publicado por Souza et al. (2004) que avaliaram o efeito do carbendazim sobre processos enzimáticos, moleculares e da respiração induzida da microbiota e os de Maccari

(2018) e Segat et al. (2019) que avaliaram as respostas do carbono da biomassa microbiana e respiração basal do solo sob aplicação de resíduos de cama de aves e à dejetos líquido de suínos, respectivamente. Para os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que compõem a microbiota do solo e são um grupo-chave no sistema solo-planta trabalhos conduzidos em TMEs avaliaram a resistência e resiliência desse grupo de fungos às mudanças climáticas e de manejo do solo (BRÖRING, 2017) e também o efeito da aplicação de fungicidas sobre variáveis da simbiose micorrízica estabelecida entre FMAs e plantas de cebola em diferentes tipos de manejo do solo (LOVATEL, 2017).

Efeitos do Clorotalonil em TMEs foram avaliados para a fauna do solo e seus efeitos sob ácaros Oribatídeos, que possuem uma relação trófica importante com fungos, foram demonstrados por Carniel (2019), assim como uma expressiva redução na atividade alimentar avaliada pelo uso de *bait-laminas*. Outro experimento em TME, avaliou o efeito de Clorotalonil em raízes de plantas de cebola (LOVATEL, 2017) e os resultados não apontaram efeito do fungicida para a colonização radicular em aplicações de 825 g de ingrediente ativo por hectare.

Em ecossistemas naturais, o impacto da simbiose micorrízica no solo varia de acordo com características genéticas e fenotípicas inerentes aos organismos e com as características do hospedeiro, mas também se relacionam com o conjunto de fatores bióticos e abióticos do solo uma vez que os FMAs estão distribuídos pelo perfil do solo (LENOIR; FONTAINE; SAHRAOUI, 2016). A presença de potenciais contaminantes no solo pode atingir eventos importantes do ciclo de vida dos FMAs, afetando sua permanência nesses ambientes e promovendo alterações nessas comunidades naturais e provocando efeitos em escalas maiores dentro dos ecossistemas (LENOIR; FONTAINE; SAHRAOUI, 2016; HAGE-AHMED; ROSNER; STEINKELLN, 2019).

Resultados prévios descritos nesta tese indicaram o efeito de fungicidas sobre a fase pré-simbiótica e simbiótica de duas espécies de FMAs, em testes individuais de germinação (espécie + fungicida) e testes *in vitro/ in vivo* (espécie de FMA inoculada + raiz/planta hospedeira + fungicida). Propôs-se nesse capítulo, avaliar os efeitos do fungicida Clorotalonil sobre características importantes da fase simbiótica de populações nativas de FMA em condições de semi-campo, e verificar através desse experimento, se as variáveis da simbiose micorrízica e os resultados obtidos nos métodos empregados para fase pré-simbiótica e simbiótica deste trabalho se confirmam. Os experimentos foram realizados num experimento de mesocosmos do tipo *Terrestrial Model Ecosystems*.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Coleta, condução e desmontagem do experimento

As amostras indeformadas de um Cambissolo foram coletadas no município de Lages – SC, com cobertura vegetal de campo nativo e sem histórico de uso de qualquer tipo de agrotóxico na área. As características químicas e físicas do Cambissolo em condição natural e após a calagem realizada, estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 - Características químicas e físicas do Cambissolo utilizado no experimento de TME.

Características	Condição natural	Pós-calagem
MOS (g kg <sup>-1</sup> )	2,4	2,9
pH (H <sub>2</sub> O)	4,7	6,2
Índice SMP	4,4	6
Ca (cmolc dm <sup>-3</sup> )	2,16	6,08
Mg (cmolc dm <sup>-3</sup> )	0,37	3,15
Al (cmolc dm <sup>-3</sup> )	2,97	0
Al + H (cmolc dm <sup>-3</sup> )	27,40	1,40
P (mg dm <sup>-3</sup> )	35,6	3,5
S (mg dm <sup>-3</sup> )	0	0
Na (mg dm <sup>-3</sup> )	1	1
K (mg dm <sup>-3</sup> )	43	166
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	0	0,2
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	0	1,1
B (mg dm <sup>-3</sup> )	0	0
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	0	29
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )	0	1,2
CTC pH 7 (cmolc dm <sup>-3</sup> )	30,04	11,05
CTC efetiva	5,61	9,65
V (%)	8,79	87,37
m (%)	52,94	0
% C.O	1,39	1,68
Areia (g kg <sup>-1</sup> )	467,7	
Silte (g kg <sup>-1</sup> )	242,3	
Argila (g kg <sup>-1</sup> )	290	

MOS: Matéria orgânica do solo; CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação por bases; m: saturação por alumínio; C.O: Carbono orgânico Semi total. Análises químicas realizadas pelo Laboratório de Análise de Solos - LAS/ UDESC Lages.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A campo foram coletados 80 TMEs, com auxílio de um amostrador de aço e de retroescavadeira. Cada TME consiste em uma amostra de solo indeformada contida em tubos de polietileno de 40 cm altura x 17,5 cm de diâmetro. No processo de coleta a retroescavadeira

empurra o tubo de polietileno dentro de um amostrador de inox para o interior do solo e com o auxílio de uma cinta o amostrador removido para a superfície. A Figura 41 exemplifica as etapas da coleta do experimento de TME.

A coleta foi realizada em uma área de aproximadamente 20 m<sup>2</sup>, com distância aproximada de 40 cm entre amostras, potencialmente reduzindo variabilidade no experimento devido a heterogeneidade do solo. Após a coleta e retirada do amostrador de aço, as amostras foram transportadas e acondicionadas em uma sala climatizada ( $25 \pm 2$  °C) com controle de fotoperíodo (10 h luz/14 h escuro) e sistema de iluminação para plantas C3 e C4. As amostras foram dispostas em carrinhos com capacidade para 12 tubos cada ( $n = 72$ ), com sistema de refrigeração interna (12 °C), simulando condições realísticas da temperatura no interior do solo. Os oito TMEs restantes foram utilizados para análise química do solo, determinação da capacidade de retenção de água (CRA) e umidade.

Figura 41 – Coleta de TMEs à campo: área da coleta (A); tubo coletor de aço sendo empurrado para o interior do solo pela retroscavadeira (B); remoção do TME de dentro do coletor de aço (C); distância entre os pontos de coleta das amostras indeformadas de solo (D).

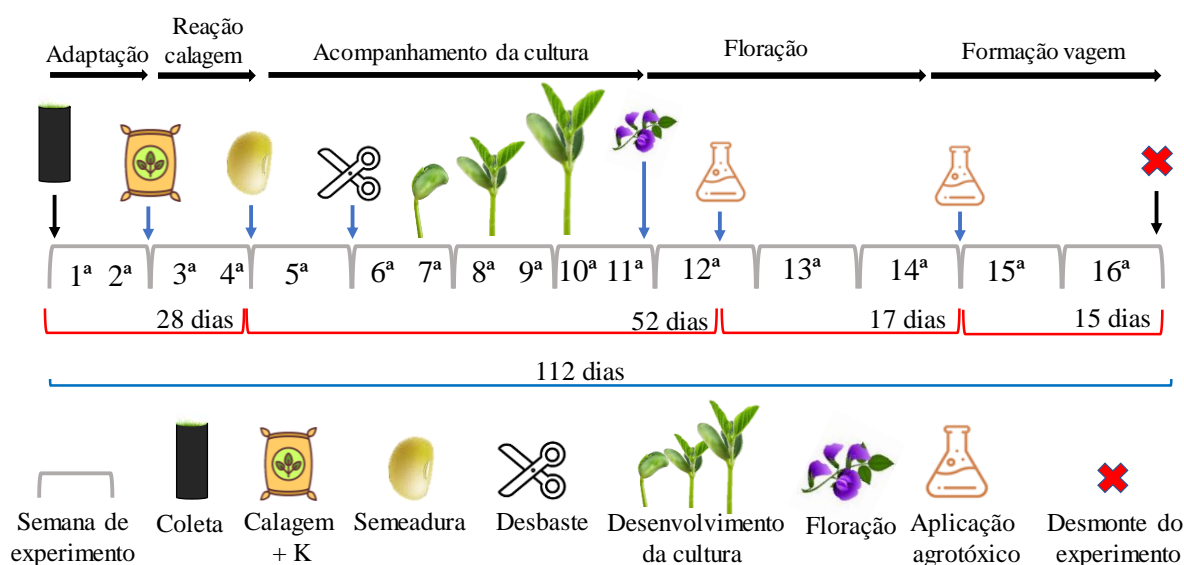


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

A partir dos dados de CRA e umidade, estabeleceu-se um regime de precipitação de 6,25 mm a cada 48 h (correspondente a 150 mL/TME) utilizando-se solução de chuva artificial (VELTHORST, 1993) mantendo o solo entre 50 e 60 % de sua CRA.

Uma vez alocadas nos carrinhos, as amostras passaram por um período de adaptação de duas semanas. Esse tempo também foi necessário para a realização das análises químicas que indicaram acidez do solo (pH = 4,4) e deficiência de potássio (K). Dessa forma, conforme recomendado para a cultura da soja (SBCS, 2016) foram efetuadas adubações de correção em superfície elevando o pH para 5,5 e ajustando o teor de K. A cobertura vegetal de campo nativo foi removida parcialmente antes da correção da fertilidade do solo, que não foi revolvido. Após a calagem a palhada obtida foi devolvida ao respectivo TME. A Figura 42 ilustra as intervenções realizadas no experimento ao longo da sua condução, da coleta até o desmonte.

Figura 42 - Linha temporal de intervenções realizadas no experimento de TMEs ao longo da sua condução.



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Após um período de duas semanas deixado para que as reações entre calcário e o solo ocorressem a cobertura vegetal foi cuidadosamente retirada e 4 sementes de soja (Coodetec CD 214), inoculadas com bactérias fixadora de nitrogênio (Masterfix® Soja), foram semeadas por TME. Depois da sementeira o fotoperíodo foi alterado para 14 h luz/10 h escuro. Sete dias após a germinação, apenas uma planta foi deixada em cada TME.

O experimento foi conduzido de forma a manter a umidade das amostras e temperatura ambiente conforme descrito acima, até que as plantas atingissem o estágio adequado para aplicação do agrotóxico. O agrotóxico utilizado foi o fungicida Bravonil® 500, cujo ingrediente



ativo (i. a.) é a molécula de Clorotalonil (utilizado nos ensaios das fase pré-simbiótica e simbiótica *in vivo* e *in vivo*) que possui em sua formulação comercial 500 g L de i.a. As aplicações seguiram as recomendações agrônômicas para a cultura da soja, considerando tratamento para ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e oídio (*Microspheera difusa*) e foram realizadas diretamente no solo, de forma a cobrir toda a superfície de solo do TME. Foram realizadas duas aplicações com intervalo de 17 dias sendo a primeira quando 50 % + 1 dos TMEs estraram no estágio de floração (Figura 42). Os tratamentos utilizados no experimento (e suas correspondências) são apresentados na (Tabela 11).

As concentrações aplicadas consideraram ainda o volume total que chega ao solo após a taxa de interceptação das plantas de soja durante os momentos de aplicação. Para a floração, de acordo com o BBCH code (EFSA 2015) a taxa de interceptação é de 25%; ou seja, 75% do produto alcança o solo. Cada tratamento contou com 10 repetições e a posição das replicatas, dentro dos carrinhos, foi definida por sorteio (delineamento inteiramente casualizado).

Tabela 11 – Tratamentos utilizados no experimento de semi-campo e suas correspondências em quantidade produto comercial, de ingrediente ativo (i. a.) e por kg de solo.

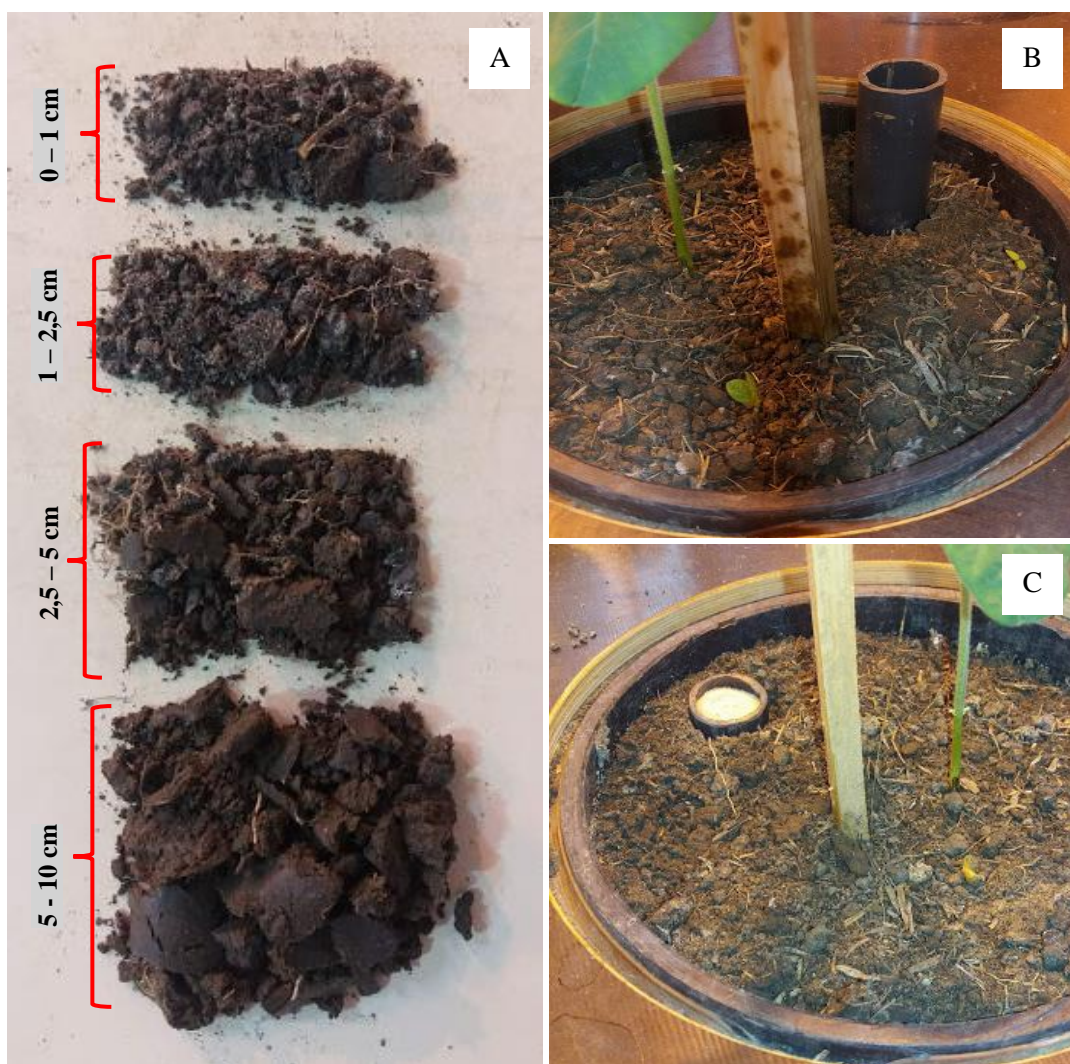
Tratamento referência	Quantidade de produto comercial por tratamento (L ha <sup>-1</sup> )	Quantidade de i.a por tratamento (g ha <sup>-1</sup> )	Quantidade de i.a por kg de solo (mg kg <sup>-1</sup> )
Controle	0	0	0
¼ dose	0,75	375	0,005
½ dose	1,5	750	0,10
1x dose recomendada	3	1500	0,20
2x dose recomendada	6	3000	0,40
5x dose recomendada	15	7500	1
10x dose recomendada	30	15000	2

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Decorridas 24 h de cada umas das aplicações do fungicida, coletas de solo para análise química foram realizadas (resultados ainda não disponíveis). Em cada TME onde houve aplicação de fungicida, inseriu-se um tubo de eletroduto rígido (10 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro) que quando retirado trazia no seu interior a amostra de solo. As amostras de solo retiradas dos eletrodutos foram divididas em camadas de 0 – 1 cm; 1 – 2,5 cm; 2,5 – 5 cm; 5 – 10 cm e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C, para determinação das concentrações analíticas do produto aplicado. Os eletrodutos vazios tiveram uma de suas porções terminais fechadas com estopa e foram reinsertos nos TMEs, preenchidos com areia lavada, objetivando cobrir os espaços gerados pela coleta de análise química. A Figura 43, exemplifica esse processo.

A desmontagem do experimento foi realizada duas semanas após a última aplicação do fungicida. No dia anterior à desmontagem a parte aérea da soja foi removida e o lixiviado acumulado ao longo do experimento foi recolhido e descartado.

Figura 43 – Coleta e separação das análises químicas por camada (A); eletrodutos reinseridos nos TMEs (B) e preenchidos com areia lavada (C).



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Os TMEs foram desmontados com a auxílio de um equipamento desenvolvido pelo Laboratório de Ecologia do Solo (Figura 44A) em ordem crescente dos tratamentos para evitar contaminações. O solo correspondente a profundidade de 10 – 40 cm foi descartado, sendo avaliada a profundidade de 0 – 10 cm. Foram coletadas amostras para a avaliação de densidade do solo (anéis volumétricos,  $n = 3$ ) e as amostras ( $n = 10$ ) foram então ainda divididas em 3 camadas: 0 – 2,5; 2,5 – 5; e 5- 10 cm ( Figura 44B e Figura 44C). Em cada camada as amostras foram tamisadas à 2 mm, uma quantidade de solo (50 g) serviu para determinação química da

presença do agrotóxico e o restante foi armazenado em câmara fria a 4 °C. As raízes da soja foram separadas do solo, lavadas e armazenadas.

Figura 44 – Equipamento utilizado para desmontagem dos TMEs (A); Amostra indeformada de solo (B) e separação profundidade 0 – 10 cm da amostra indeformada em camadas (C).



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

### 6.2.2 Variáveis avaliadas e análise estatística

Para o experimento de semi-campo foram utilizadas as mesmas variáveis da fase simbiótica *in vivo*: percentual de colonização radicular, número de esporos no solo e o comprimento micelial extrarradicular total. As duas últimas variáveis foram avaliadas para cada uma das camadas estabelecidas (0 – 2,5 cm, 2,5 – 5 cm e 5 – 10 cm).

### 6.2.2.1 Percentual de colonização radicular

Após separadas do substrato, as raízes foram lavadas de forma a remover todo o substrato a elas aderido. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia da UFSC Campus Curitibanos para coloração e avaliação.

O processo de coloração seguiu conforme proposto por proposto por Koske & Gemma (1989) com ajuste de tempo para cada etapa. Inicialmente as raízes foram imersas em solução de KOH 10 % por 50 min em banho-maria à temperatura de 80 °C. Após o KOH, as amostras de raízes foram lavadas abundantemente em água corrente para remover qualquer resíduo da solução. Na sequência as raízes foram colocadas em solução de HCl 2 % e mantidas nessa solução por 60 min. A solução de HCl foi removida e as amostras cobertas com uma solução de glicerol acidificado (500 ml Glicerina, 250 ml água destilada e 250 ml de ácido láctico) contendo 0,05% de azul de tripan (0,5 g em 1 L de solução). Entre a remoção do HCl e a imersão em solução de azul de tripan as amostras não foram lavadas. Uma vez imersas na solução de azul de tripan as raízes foram deixadas em banho-maria à 80 °C por 50 minutos. Na sequência as amostras de raízes foram removidas da solução corante, lavadas superficialmente para a remoção do excesso de solução e acondicionadas em recipientes contendo água destilada. As raízes coradas foram mantidas em geladeira a 4 °C até a montagem das lâminas.

As raízes coradas de cada amostra foram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm e dispostas em lâminas de microscopia. Como cada tratamento contou com 10 repetições, apenas 1 lâmina com 10 fragmentos foi montada por amostra. O percentual de colonização total seguiu o proposto por McGonile et al. (1990). As estruturas foram observadas em microscópio com aumento de 400x, determinando sua presença ou ausência em 50 pontos observados. Foi considerado como ponto colonizado do fragmento, aquele que apresentou a presença de pelo menos uma estrutura fúngica (hifa, vesícula, arbúsculo ou esporo). O número de pontos observados foi definido em função no número de repetições por tratamentos em comparação prévia com a avaliação em 100 e 200 pontos por lâmina. O percentual de colonização total, colonização por hifas, vesículas, arbúsculos e esporos, considerando os valores de fragmentos colonizados em relação aos não colonizados, foram calculados.

### 6.2.2.2 Número de esporos e comprimento micelial extrarradicular total

Os métodos utilizados para essas duas variáveis foram exatamente os mesmos empregados e descritos no Capítulo 4, para os experimentos da fase simbiótica *in vivo* (itens

5.2.5.2 e 5.2.5.3), inclusive no que diz respeito à tamanho de amostra e número de repetições de laboratório (especificamente para comprimento micelial extrarradicular total – CMET).

### 6.2.3 Análise estatística

Para cada variável foram verificados os pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Testes de Bartlett). Quando as premissas não foram atendidas, os dados de percentual de colonização foram transformados usando  $[(\text{asen}(\sqrt{x}))/180*\pi]$ , os dados de número de esporos usando a transformação  $[(x + 0,5)^{1/2}]$  e os dados de CMET usando a transformação  $[\log(x)]$ . Em seguida cada variável foi analisada através de ANOVA (One-way) seguido de teste Dunnett ( $p < 0,05$ ) para avaliar a existência de diferenças significativas entre cada concentração testada e o controle, estimando a concentração de efeito não observado (CENO). As variáveis número de esporos e CMET tiveram as médias de cada tratamento submetidas, individualmente, à teste Tukey ( $p < 0,05$ ), para verificação da existência de efeito entre camadas.

Quando possível, determinou-se valores de  $CI_{50}$  (concentração originando 50 % de inibição da variável avaliada) os valores de  $CI_{20}$  e  $CI_{10}$  (concentração originando 20 % e 10 % de inibição da variável analisada, respectivamente), utilizando-se modelos de regressão não linear de acordo com o Environment Canada (EC, 2005) e o software Statistica 10.0 (StatSoft 2011).

Para estimar a presença a longo prazo do agrotóxico nesse solo, com base nas informações do solo, produto e cultura da soja (Tabela 12) foi calculada a Concentração Ambiental Prevista (originalmente *Predicted Environmental Concentration* - PEC) para o período de um ano ( $PEC_{\text{year}}$ ) e de dez anos ( $PEC_{\text{accumax}}$ ) utilizando o software ESCAPE (KLEIN, 2015).

Como dados oficiais do tempo de dissipação (*dissipation time*)  $DT_{50}$  para solos brasileiros não foram encontrados em bancos de dados abertos, esses valores foram fornecidos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) por meio de um canal de comunicação pública do governo on-line (<https://esic.cgu.gov.br/sistema/site/index.aspx>) no ano de 2019. Os valores de  $DT_{50}$  para Clorotalonil fornecidos pelo IBAMA variam de 180 a 360 dias.

Tabela 12 - Características de cultura, produto aplicado e solo utilizadas para cálculo das  $PEC_{year}$  e  $PEC_{accumax}$ .

<b>Características de cultura, produto e solo utilizadas para cálculo de <math>PEC_{year}</math> e <math>PEC_{accumax}</math></b>	
Cultura	Soja
Código BBCH	40 – 89 (Floração)
Interceptação pela cultura	25 %
Ingrediente ativo (i.a)	Clorotalonil
Produto comercial utilizado (PC)	Bravonil 500®
g i.a L <sup>-1</sup> de PC	500
Taxa de aplicação recomendada do PC (L ha <sup>-1</sup> )	3
Quantidade de i.a. aplicado na dose recomendada	1500
Número de aplicações	2
Intervalo de aplicação <sup>1</sup>	15 a 20 dias
Fração da concentração do produto aplicado que atinge o solo	0,75
DT <sub>50</sub>	180 dias
Solo	Cambissolo
Capacidade de Retenção de Água (%)	52,5
Carbono Orgânico (%)	1,54
Densidade (g cm <sup>3</sup> )	1
Temperatura de condução do experimento (°C)	25

<sup>1</sup>No experimento utilizou-se intervalo de aplicação de 17 dias.

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

## 6.3 RESULTADOS

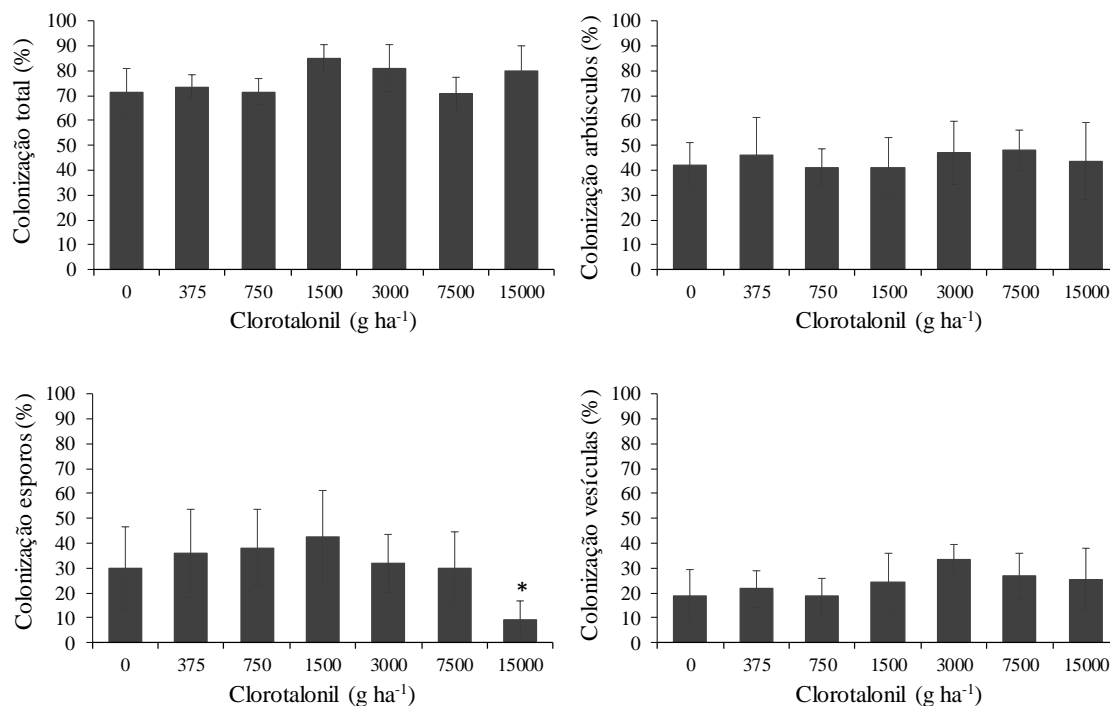
### 6.3.1 Percentual de colonização radicular

Serão apresentados na sequência, resultados para colonização total, colonização por arbúsculos, vesículas e esporos. A colonização por hifas foi também avaliada, mas, seus resultados equivaleram-se ao do percentual de colonização total e por isso, somente esse último será apresentado.

As variáveis colonização total, colonização por arbúsculos e vesículas não apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ) entre concentrações e controle ( $CENO > 15000$  g ha<sup>-1</sup>) e nenhuma concentração de inibição ( $CI_x$ ) pode ser calculada (Figura 45). No tratamento controle (0 g ha<sup>-1</sup>), o percentual de colonização radicular total foi 71 %, a colonização por arbúsculos foi 42 %, a colonização por esporos foi 30 % no controle houve 19 % de colonização por vesículas.

Em relação à presença de esporos na raiz, houve efeito da aplicação do Clorotalonil ( $CENO = 7500$  g ha<sup>-1</sup>) apenas para a maior concentração testada (15000 g ha<sup>-1</sup>) conforme ilustrado na Figura 45.

Figura 45 - Percentual de colonização total, colonização por arbúsculos, esporos e vesículas das raízes de soja, em experimento de semi-campo com aplicação de Clorotalonil.



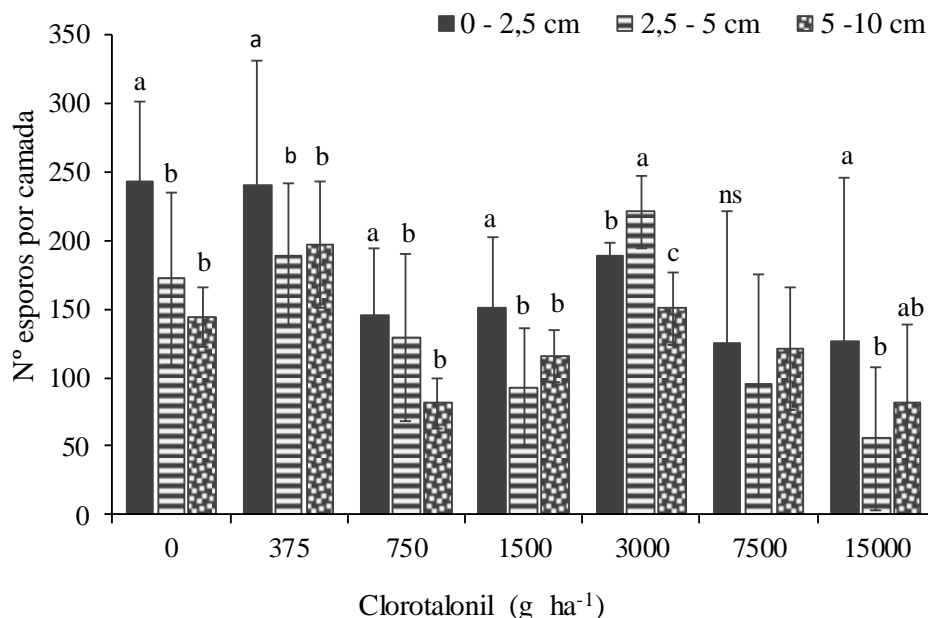
Os dados (mostrados não transformados) são médias de 10 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão. Fonte: Produção da autora, 2020.

### 6.3.2 Número de esporos por camada

Dados relativos ao número de esporos no solo, indicaram através de teste Tukey que as camadas dos tratamentos apresentam diferenças significativas entre si, exceto para as médias das camadas do tratamento com aplicação de 7500 g ha<sup>-1</sup> (Figura 46). O número de esporos no solo na camada de 0 – 2,5 cm foi superior aos das outras camadas em cinco dos sete tratamentos do experimento (0, 375, 750, 1500 e 15000 g ha<sup>-1</sup>).

O número médio de esporos nos tratamentos controles foi de 244 para a camada de 0 – 2,5, 172 para a camada de 2,5 – 5 cm e de 144 esporos para a camada de 5 – 10 cm. O teste Dunnett indicou, para as camadas de 0 – 2,5 e 5 – 10 cm, efeito do Clorotalonil no tratamento de 750 g ha<sup>-1</sup> e, para essas camadas a CENO foi estimada em 375 g ha<sup>-1</sup> (Figura 47). A camada de 2,5 – 5 teve efeito medido por Dunnett, no tratamento de 1500 g ha<sup>-1</sup> e CENO estimada em 750 g ha<sup>-1</sup>. Para esses dados, não foi possível o cálculo de nenhuma das CIs pretendidas, uma vez que nenhum dos modelos convencionalmente utilizados se adequou ao comportamento da resposta dessa variável.

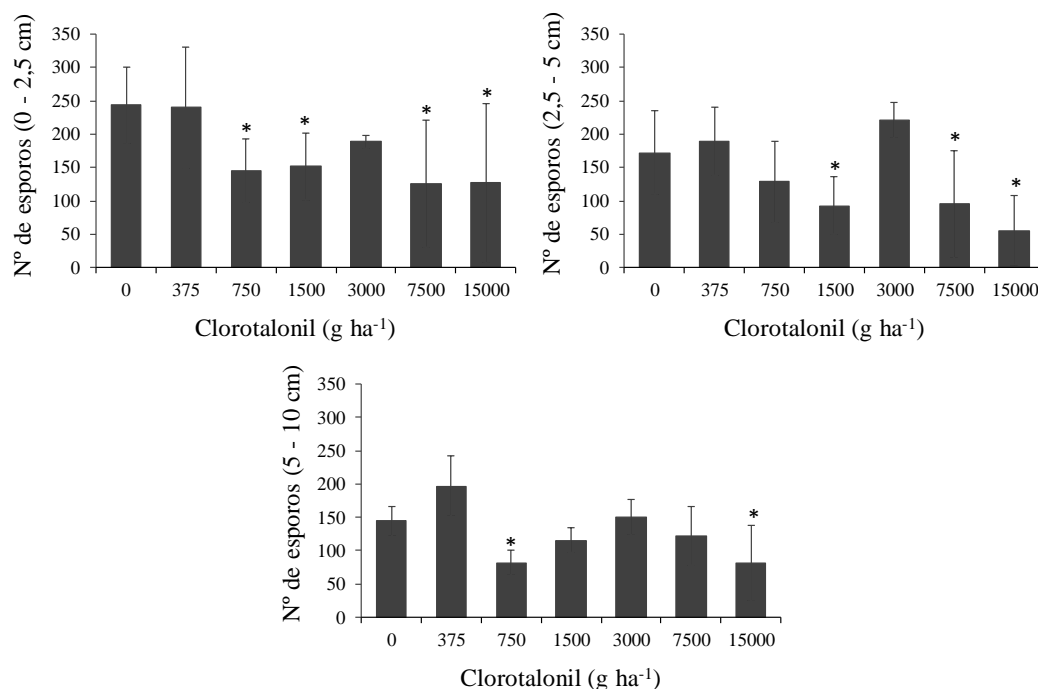
Figura 46 – Número de esporos entre as camadas 0 – 2,5 cm, 2,5 – 5 cm e de 5 -10 cm dos tratamentos com aplicação de concentrações crescentes de Clorotalonil, em experimento de semi-campo.



Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si e indicam diferença entre as camadas avaliadas dentro do mesmo tratamento (concentração de Clorotalonil aplicada), através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ); ns - médias não diferem estatisticamente entre si.

Fonte: Produção da autora, 2020.

Figura 47 – Número de esporos por tratamento, em 50 g de solo das camadas 0 – 2,5, 2,5 – 5 e 5 – 10 cm do experimento de semi-campo com aplicação de concentrações crescentes de Clorotalonil.



Os dados (mostrados não transformados) são médias de 10 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão.

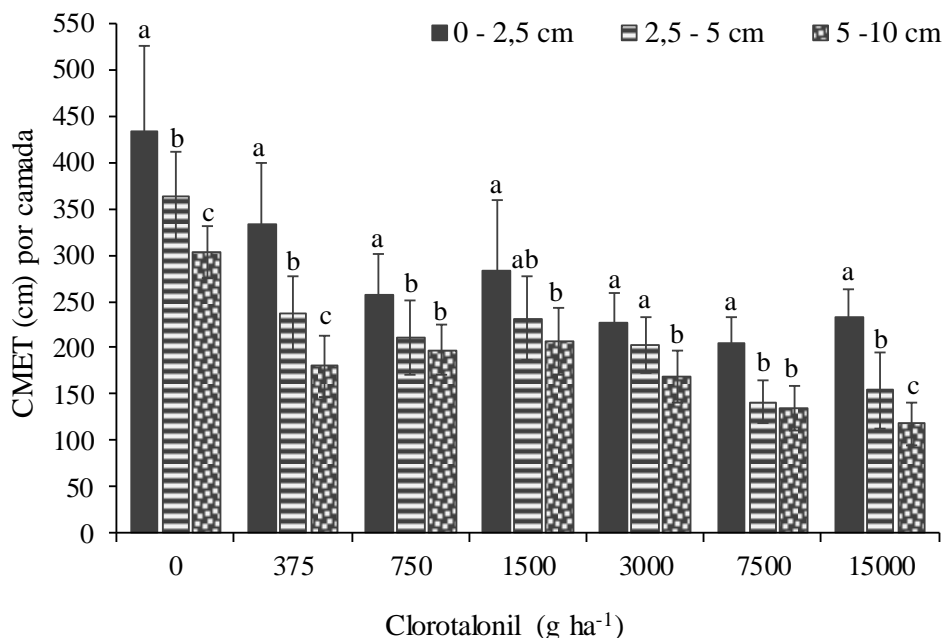
Fonte: Produção da autora, 2020.



### 6.3.3 Comprimento micelial extrarradicular total (CMET)

Os valores médios para a variável CMET entre as camadas de cada um dos tratamentos adotados no experimento, indicaram através de teste Tukey que elas apresentam diferenças estatísticas significativas entre si. Para todos os tratamentos, a camada 0 – 2,5 cm apresentou maior quantidade média de micélio extrarradicular em relação as demais e a camada de 5 – 10 cm apresentou as menores médias (Figura 48).

Figura 48 - Comprimento micelial extrarradicular total do solo (cm de hifas por g de solo) entre as camadas 0 – 2,5 cm, 2,5 – 5 cm e de 5 – 10 cm dos tratamentos com aplicação de concentrações crescentes de Clorotalonil, em experimento de semi-campo.



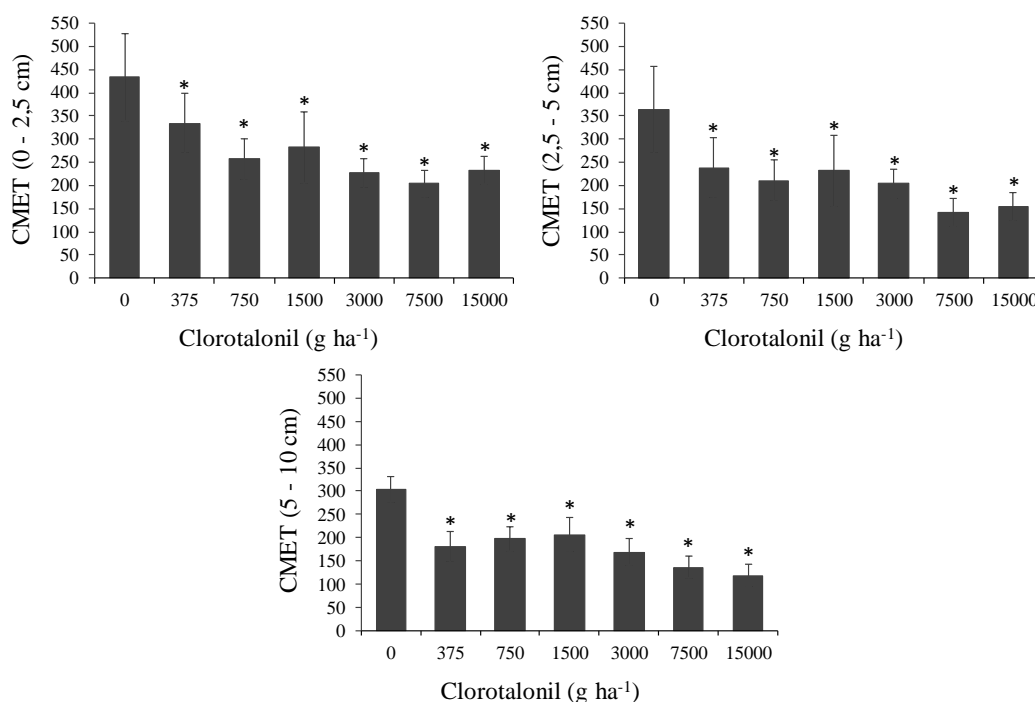
Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si e indicam diferença entre as camadas avaliadas dentro do mesmo tratamento (concentração de Clorotalonil aplicada), através de Teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Produção da autora, 2020.

O CMET médio dos tratamentos controles foi de 433 cm de hifas por g de solo para a camada de 0 – 2,5 cm, 375 cm na camada de 2,5 – 5 cm e 303 cm para a camada de 5 – 10 cm. Para cada camada, as médias entre os tratamentos e o controle indicaram efeito do fungicida já a partir da primeira concentração testada (375 g ha<sup>-1</sup>) (Figura 49). Os dados de CMET para cada camada mostram, depois da queda inicial observada na primeira concentração, um incremento do comprimento de micélio na concentração de 1500 g ha<sup>-1</sup>, concentração equivalente a dose recomendada do Clorotalonil para a cultura da soja. O incremento não foi substancial a ponto de suprimir o efeito do fungicida (em relação ao tratamento controle) mas conferiu aos dados

um comportamento não representado nos modelos de regressões propostos para dados de toxicidade (EC, 2005), tornando inviável o cálculo das CIs pretendidas. Foi possível determinar a dose CENO que, para as todas as camadas é  $< 375 \text{ g ha}^{-1}$ .

Figura 49 - Comprimento micelial extrarradicular total (cm de hifas por g de solo) por tratamento, das camadas 0 – 2,5, 2,5 – 5 e 5 – 10 cm do experimento de semi-campo com aplicação de concentrações crescentes de Clorotalonil.



Os dados (mostrados não transformados) são médias de 20 repetições. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).  $\top$  – desvio padrão. Fonte: Produção da autora, 2020.

### 6.3.4 Predicted Environmental Concentration

Valores para  $PEC_{\text{year}}$  e  $PEC_{\text{accumax}}$  estimados a partir dos dados presentes na Tabela 12, apontam para  $4,3241 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $4,9202 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Considerando a densidade do solo e extrapolada para a área de aplicação de 1 ha, temos  $PEC_{\text{year}} = 4324,1 \text{ g ha}^{-1}$  e  $PEC_{\text{accumax}} = 4920,2 \text{ g ha}^{-1}$ .

## 6.4 DISCUSSÃO

As variáveis referentes a colonização radicular e suas variações (% de colonização total, % de colonização por arbúsculos e por vesículas) não foram afetadas pelas aplicações de

Clorotalonil. Para colonização por esporos, efeitos são observados apenas na concentração mais alta testada - equivalente a 10 vezes a recomendação para a cultura.

Observando-se os valores estimados para  $PEC_{year}$  (4324,1 g ha<sup>-1</sup>) ou mesmo para  $PEC_{accumax}$  (4920,2 g ha<sup>-1</sup>) percebe-se que as concentrações preditas do agrotóxico no ambiente são pelo menos 3x menores do que as concentrações de efeito nas variáveis colonização total, arbuscular e por vesículas (CENO > 15000 g ha<sup>-1</sup>) e 1,5x menor do a concentração de efeito aos esporos na raiz (CENO = 7500 g ha<sup>-1</sup>). Estes dados indicam a ausência de risco do produto nas condições de aplicação deste experimento mensurando estas variáveis resposta.

A ausência de efeito do fungicida sobre essas variáveis pode estar relacionada ao fato da colonização radicular acontecer concomitantemente ao desenvolvimento da planta, sendo possivelmente estabelecida a partir da germinação das sementes (GANGE; BROWN, 2003; CAMERON et al., 2017; ROCHA et al., 2019) e da aplicação do produto ser realizada quando planta já estava em estádios avançados do seu desenvolvimento (floração), portanto, com uma colonização radicular já bem estabelecida. Uma vez que as porções de raiz foram colonizadas, o fungo tem, dentro da raiz, um habitat protegido (SIMARD; JONES; DURALL, 2003; HAGE-AHMED; ROSNER; STEINKELLN, 2019) e as estruturas fúngicas já formadas não são, necessariamente, afetadas pelo agrotóxico. As hifas que colonizam internamente a raiz continuarão desenvolvendo-se, bem como as demais estruturas típicas da micorriza arbuscular, ao menos enquanto houver aporte de energia por parte do hospedeiro (van der HEIJDEN, 2015).

Nas condições de estudo aplicadas no experimento de semi-campo, não houve efeito do Clorotalonil sobre a colonização micorrízica total, presença de arbúsculos e vesículas, diferentemente do que foi observado nos experimentos *in vivo* (Capítulo 3). A sensibilidade dessas variáveis ao produto não se manteve quando testadas em um sistema com maior grau de complexidade envolvendo populações nativas. É importante, entretanto, que a afirmação de não existir efeito do Clorotalonil com o produto comercial específico testado sobre as variáveis analisadas não pode ser estendida para outros produtos comerciais com este ingrediente ativo, uma vez que estes possuem indicações particulares de aplicação. Produtos com indicação de aplicação em fase a anteriores à floração na soja podem apresentar resultados contrários e portanto, diferentes cenários de aplicação agrônômica podem promover alterações e finalmente respostas distintas tanto na planta hospedeira como nos FMAs (HAGE-AHMED; ROSNER; STEINKELLN, 2019). Esse resultado também não pode ser interpretado a luz de outros aspectos da simbiose micorrízica não avaliados no presente trabalho.

O efeito do Clorotalonil sobre o percentual de colonização por esporos que se deu na última concentração testada (15000 g ha<sup>-1</sup>; equivalente a 10 vezes a taxa de aplicação

recomendada), pode estar associado ao fato dos esporos serem formados depois da simbiose micorrízica estar completamente estabelecida e de a esporulação ter como um dos seus indutores a presença de um agente estressor no ambiente.

Os resultados referentes à número de esporos e comprimento de micélio, apresentaram para a maioria dos tratamentos, diferença quando comparados entre si por camada. Inicialmente atribui-se esse comportamento à maior ou menor presença do Clorotalonil em determinada camada. Um estudo realizado em um Inceptisol Indiano, classe de solo equivalente ao Cambissolo (EMBRAPA, 2013) demonstrou através de experimento em colunas de polietileno (50 x 2,28 cm) que, de 50 µg de Clorotalonil inicialmente aplicado nesse solo, 49,5 µg foram detectados por cromatografia gasosa e, do total recuperado, 42,5 µg dos resíduos estavam presentes na camada de 0 – 10 cm de profundidade (19,3 µg na camada de 0 – 5 cm e 23,2 µg na camada até 10 cm) (NEETHU NARAYANAN, 2014). Entretanto, o comportamento de maior quantidade de esporos na camada de 0 – 2,5 cm também foi observado no tratamento controle e essa explicação teve que ser desconsiderada.

Outra explicação para esse comportamento de resultados está relacionada com a abundância natural dos organismos pelo perfil do solo, que por sua vez está associada com o tipo de sistema radicular da cobertura vegetal original da área. O Campo Nativo se caracteriza pela dominância de gramíneas, que tem como característica de raiz, o sistema fasciculado (BOLDRINI; LONGHI-WAGNER; BOECHAT, 2005; BERTOL et al., 2011). Embora não tenham sido realizadas avaliações do sistema radicular nativo da área de coleta, visualmente a maior quantidade de raízes estava presente nos centímetros iniciais do perfil do solo, justificando a maior abundância natural dos esporos na primeira camada avaliada, uma vez que esses organismos estão intimamente associados à presença e atividade das raízes.

No que tange aos efeitos dos tratamentos com aplicação de Clorotalonil sobre a variável número de esporos houve uma tendência de comportamento inicial decrescente, seguido de um aumento nos valores em concentrações intermediárias e nova queda nas concentrações mais altas. Fisiologicamente, o incremento na quantidade de esporos, mesmo na presença de um contaminante no solo pode ser uma reação de defesa dos FMAs para aliviar o efeito negativo do estresse (GIOVANNETTI; AVIO, L; SBRANA, 2010; LENOIR; FONTAINE; SAHRAOUI, 2016).

Para CMET, embora menos pronunciado, uma vez que todos os tratamentos com aplicação apresentaram efeitos em relação ao controle, o aumento em concentrações intermediárias de aplicação de fungicida também aconteceu. Essa resposta de incremento pode

constituir um meio para o FMA evitar microambientes com a presença do "contaminante" e atingir porções de solo menos contaminadas (LENOIR; FONTAINE; SAHRAOUI, 2016).

Comparando os valores de CENO estimados para o número de esporos (camadas 0 – 2,5 e 5 – 10 cm = 375 g ha<sup>-1</sup>; camada 2,5 – 5 cm = 750 g ha<sup>-1</sup>) com os valores de PEC estimados para o experimento, observamos que o efeito sobre a variável se deu em concentrações pelo menos 5,7x menor do que o estimado para PEC<sub>year</sub> e 6,5 vezes menor do que o valor previsto como de risco do produto para em 10 anos (PEC<sub>accumax</sub>). Para CMET (CENO > 375 g ha<sup>-1</sup>) a possibilidade de risco do produto para a variável, acontece em concentrações pelo menos 11x menor que a PEC<sub>year</sub> e 13 vezes menor do que a PEC<sub>accumax</sub> estimada para esse produto.

Efeitos que inibam a produção de novos esporos podem impactar na manutenção dos FMA nos ambientes uma vez que os esporos constituem, junto com fragmentos de raízes colonizadas e hifas do solo, os propágulos desse grupo de organismos (van der HEIJDEN, 2015; HAGE-AHMED; ROSNER; STEINKELN, 2019). Já os efeitos de inibição da emissão ou do crescimento do micélio extrarradicular podem impactar diretamente as funções ecossistêmicas em que essa característica da simbiose micorrízica está envolvida, à exemplo da formação e agregação do solo, aumento dos estoques de carbono no solo e absorção de nutrientes para as plantas hospedeiros (VOS et al., 2013; van der HEIJDEN et al., 2015; RILLIG et al, 2015; DEMENOIS et al., 2018; HAGE-AHMED; ROSNER; STEINKELN, 2019; MCGOWAN, 2019).

Em suma, os resultados indicam, além do potencial risco do Clorotalonil nas variáveis número de esporos e CMET, para populações naturais de FMAs, que essas são medidas relacionadas a simbiose micorrízica passíveis de avaliação tanto em experimentos de semi-campo quanto em etapas anteriores, como observado nos experimentos *in vivo* (Capítulo 4).

## 6.5 CONCLUSÃO

O fungicida Clorotalonil, não causou efeito sobre colonização radicular em plantas de soja por populações nativas de FMAs, nas condições estudadas, mas, causou efeito sobre as variáveis envolvendo número de esporos e emissão de micélio extrarradicular das mesmas populações. Essas variáveis demonstraram ser sensíveis e as ratificam como variáveis possíveis de serem avaliadas também em protocolos estabelecidos para a simbiótica dos FMAs.

## REFERÊNCIAS

ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoologica Mexicana**, sl., n. 2, p. 95-107, 2010. ISSN 0065-1737

BERTOL, I. et al . Erosão hídrica em campo nativo sob diversos manejos: perdas de água e solo e de fósforo, potássio e amônio na água de enxurrada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 4, p. 1421-1430, 2011.  
doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832011000400036>.

BOLDRINI, I. I.; LONGHI-WAGNER, H. M.; BOECHAT, S. C. **Morfologia e taxonomia de gramíneas sul-rio-grandenses**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 96 p. ISBN: 857025-828-3

BRÖRING, J. M. **Diversidade funcional-estrutural de organismos do solo e a prestação de serviços de ecossistema em cenários extremos de regime hídrico**. 2017. 155 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) — Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2015.

CAMERON, J. C. et al. Fungicidal Seed Coatings Exert Minor Effects on Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Nutrient Content. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 3, p. 1005 - 1012, 2017. doi: : <https://doi.org/10.2134/agronj2016.10.0597>

CARNIEL, L. S. C. **Novel approaches and future directions for pesticide ecological risk assessment to in-soil fauna**. 2019. 197 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) — Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2019

DEMENOIS, J. et al. Impact of plant root functional traits and associated mycorrhizas on the aggregate stability of a tropical Ferralsol. **Geoderma**, v. 312, p. 6–16, 2018.  
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.09.033>

EC - Environment Canada. Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests, Method development and applications section. Report EPS 1/RM/46. In: **Environmental Protection Series**. Environment Canada. Environmental Technology Centre, Ottawa, ON, 2005.

EFSA, European Food Safety Authority. Draft EFSA Guidance Document for predicting environmental concentrations of active substances of plant protection products and transformation products of these active substances in soil. **EFSA Journal**. 2015. Disponível online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353p. ISBN 978-85-7035-198-2

GANGE, A. C.; BROWN, V. K. Actions and interactions of soil invertebrates and arbuscular mycorrhizal fungi in affecting the structure of plant communities. In: van DER HEIJDEN, M. G. A.; SANDERS, I. R. (eds) **Mycorrhizal Ecology**. Springer: Berlin, Heidelberg, p. 321 – 344, 2003. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-38364-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-540-38364-2_13)

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.

HAGE-AHMED, K.; ROSNER, K.; STEINKELN, S. Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. **Pest Management Science**, v. 75, p. 583-590, 2019. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.5220>

KLEIN, M. **ESCAPE - Estimation of Soil-Concentrations After Pesticide applications version 2.0**. Fraunhofer-Institut Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, 2015.

KNACKER, T. et al. Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) – an instrument for testing potentially harmful substances: conceptual approach and study design. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 9–27. doi: <https://doi.org/10.1023/b:ectx.0000012402.38786.01>

KUPERMAN, R. G. et al . State of the science and the way forward for the ecotoxicological assessment of contaminated land. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 44, n. 8, p. 811-824, 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009000800004>.

LENOIR, I.; FONTAINE, J.; SAHRAOUI, A.L.H. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: a review. *Phytochemistry* 123, 4–15. 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.002>

LOVATEL, A. C. **Efeitos de fungicidas na atividade de fungos micorrízicos e na fauna edáfica em cultivo de cebola (*Allium cepa* L.)**. 2017. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) — Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2017.

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, 92:486-505, 1989. doi: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80195-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80195-9)

MACCARI, A. P. **Avaliação ecotoxicológica de cama de aves em solos do estado de Santa Catarina**. 2018. 172 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) — Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.

McGONIGLE, T. P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.L; SWAN, J.A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. **The New Phytologist**, 115 (3):495-501,1990. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x>

MCGOWAN, A. R. et al. Soil organic carbon, aggregation, and microbial community structure in annual and perennial biofuel crops. **Agronomy Journal**, v. 111, p. 128-142, 2019. doi:10.2134/agronj2018.04.0284

MORGAN, E.; KNACKER, T. The role of laboratory terrestrial model ecosystems in the testing of potentially harmful substances. **Ecotoxicology**, v.3, p.213-233, 1994. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00117989>

NEETHU, N.; V. T. Leaching behavior of chlorothalonil, chlorpyrifos and pendimethalin in soil: effect of soil organic matter and clay. **Clay Research**, v. 33, n. 1, p. 15 – 25, 2014. ISSN: 0974-4509.

POTTER, T. L.; WAUCHOPE, R. D.; CULBREATH, A. K. Accumulation and decay of chlorothalonil and selected metabolites in surface soil following foliar application to peanuts. **Environmental science & technology**, v. 35, n. 13, p. 2634-2639, 2001. doi: <https://doi.org/10.1021/es002054e>

RILLIG, M. C et al. Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. **New Phytologist**, v. 205, p. 1385–1388, 2015. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.13045>

ROCHA, I. et al. Seed coating with arbuscular mycorrhizal fungi for improved field production of chickpea. **Agronomy**, v. 9, n. 8, p. 1 - 11, 2019. doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy9080471>

SBCS - Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Núcleo Regional Sul, Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC, 2016. 376 p.



- SCHÄFFER, A. et al. **Semi-field Methods for the Environmental Risk Assessment of Pesticides in Soil (PERAS)**. Brussels: SETAC Europe, 2011. 105p
- SEGAT, J. C. et al. Disentangling the effects of the aqueous matrix on the potential toxicity of liquid pig manure in sub-tropical soils under semi-field conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 168, p. 457–465, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.085>
- SIMARD, S. W.; JONES, M. D.; DURALL, D. M. Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. In: van DER HEIJDEN, M. G. A.; SANDERS, I. R. (eds) **Mycorrhizal Ecology**. Springer: Berlin, Heidelberg, p. 321 – 344, 2003. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-38364-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-540-38364-2_2)
- SOUSA, J. P. et al. Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (tme) – an instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazim on soil microbial parameters. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 43–60, 2004. doi: <https://doi.org/10.1023/b:ectx.0000012404.08568.e2>
- SOUZA, A. J. et al. The depleted mineralization of the fungicide chlorothalonil derived from loss in soil microbial diversity. **Scientific Reports**, v. 7, 14646, p. 1 – 8, 2017. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14803-0>.
- STATSOFT. **STATISTICA 10.0 (data analysis software system)**. [s.l]. 2011. Disponível em <<http://www.statsoft.com>>.
- VAN DER HEIJDEN, M. G. A. et al. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the presente, and the future. **New Phytologist**, v. 205, p. 1406 – 1423, 2015. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.13288>
- VAN GESTEL, C. A. M. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. **ZooKeys**, sl, v. 176, p. 275–296, 2012. doi: <https://doi.org/10.3897/zookeys.176.2275>
- VELTHORST, E. J. **Manual for Chemical Water Analysis**. Wageningen: **Agricultural University**. 1993.
- VOS, C. et al. Mycorrhiza-induced resistance against the rootknot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 60, p. 45–54, 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soil.bio.2013.01.013>
- WENTSEL, R. S. et al. Effects of contaminants on soil ecosystem structure and function. In: LANNO, R.P. (Ed.). **Contaminated soils: from soil-chemical interactions to ecosystem management**. Pellston: SETAC, p.117-159, 2003.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

Recentemente os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foram recomendados por comitê da EFSA para uso como organismo chave não alvo em estudo envolvendo risco de agrotóxicos para o solo. Este grupo de fungos ainda não é utilizado em esquemas de análise de risco ecológico e o seu não uso está relacionado a ausência de métodos padronizados para avaliar a toxicidade para esse grupo organismos do solo. Os métodos empregados na geração dos resultados desta tese, podem suprir, em partes, essa lacuna e subsidiar protocolos úteis nas avaliações do risco ecológico de agrotóxicos para FMAs.

Mesmo apresentando particularidades genótípicas e fenotípicas, que não podem ser ignoradas quando usados para fins de avaliação da toxicidade de agrotóxicos, os FMA fornecem respostas significativas e úteis sobre os efeitos dos agrotóxicos sobre os ecossistemas em que estão inseridos. Os esporos de FMA, são organismos de fácil manipulação em solo e ou/substrato permitindo que o número de táxons avaliados em ensaios *lower tier* seja ampliado para além dos utilizadas ao longo desse estudo.

O sistema de cultivo *in vitro* demonstrou ser laborioso e da forma como foi executado neste estudo, demanda aprimoramento dos métodos para dar subsídio a um protocolo *lower tier*, entretanto, indicou que as variáveis selecionadas para avaliação tem potencial para serem indicadoras do efeito de agrotóxicos sobre os FMA.

As variáveis selecionadas para serem indicadoras do efeito de agrotóxicos sobre a simbiose micorrízica, demonstraram ser sensíveis e o método *in vivo* atendeu os requisitos para ser utilizado como método padronizável para esse fim. As espécies *Gigaspora albida* e *Rhizophagus clarus*, recomendadas para a avaliação da fase pré-simbiótica demonstraram ser adequadas também, para avaliações envolvendo a fase simbiótica dos FMAs.

A partir do método *in vivo*, entendido como um protocolo ainda de *lower tier*, métodos de avaliação em níveis complexidade e realismo maior podem ser desenvolvidos. A utilização de solo natural como substrato-teste e populações naturais com estrutura e tamanho conhecidos como organismos-teste comporiam uma avaliação intermediária (*intermediate tier*) entre os protocolos da fase pré-simbiótica e simbiótica com inoculação de espécies cultivadas em laboratório e os experimentos que simulam condições de campo (*higher tier*).

Por fim, a utilização de experimentos de semi-campo do tipo *Terrestrial Model Ecosystems*, demonstrou ser eficientes para a avaliação de características relacionadas aos FMA e sua simbiose em condições realísticas de solo e de populações naturais, além de ratificar o uso das variáveis estabelecidas para os experimentos *in vitro/in vivo*. Experimentos de TME já

são entendidos e recomendados como uma forma de avaliação em escala maior (*higher tier*) dentro dos esquemas de análise de risco de invertebrados do solo e, a avaliação dos FMAs apresenta a facilidade de poder ser conduzida de forma concomitante a esses experimentos.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) constituem um grupo de organismos que estabelecem simbiose do tipo mutualista com a maioria das espécies de plantas, estão associados à diversas funções ecossistêmicas e são considerados um grupo-chave importante na avaliação do risco de poluentes no solo. O objetivo geral deste trabalho foi ampliar o número de informações existentes sobre os protocolos ecotoxicológicos já existentes para a fase pré-simbiótica, além de desenvolver e validar método de avaliação para a fase simbiótica do ciclo de vida dos FMAs, visando contribuir para o uso dos desses fungos na análise de risco ecológico de agrotóxicos no solo.

Orientador: Dr. Osmar Klauberg Filho

Lages, 2020