



Uso da germinação de esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares em ensaios ecotoxicológicos: proposta de adaptação do protocolo ISO/TS 10832:2009⁽¹⁾.

Gilvani Carla Mallmann⁽²⁾; Osmar Klauberg Filho⁽³⁾; Dilmar Baretta⁽⁴⁾; Julia da Silva Machado⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da CAPES e PROMOP/UDESC.

⁽²⁾ Mestranda em Ciência do Solo; Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/CAV); cgilvani@gmail.com; Lages, SC; cgilvani@gmail.com; ⁽³⁾ Pós-Doutor, Professor do Departamento de Solos e Recursos Naturais UDESC/CAV; Lages, SC; ⁽⁴⁾ Pós-Doutor; Professor do Departamento de Zootecnia UDESC/CEO; Chapecó, SC; ⁽⁵⁾ Mestranda em Ciência do Solo; UDESC/CAV; Lages, SC.

RESUMO: Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), simbiotes obrigatórios e componentes da microbiota do solo, possuem distribuição geográfica generalizada, são organismos ecologicamente relevantes para a saúde das plantas além de, apresentam sensibilidade a variações nos muitos fatores que compõem os ambientes. Essas características, dentre outras, os transformam em um grupo-chave na avaliação de risco ambiental de poluentes no solo. No Brasil, não existem protocolos de pesquisa ou normas técnicas que orientem os estudos para avaliação ecotoxicológica com FMAs, sendo por isso utilizado como referência o Protocolo ISO/TS 10832:2009, que avalia a sensibilidade da germinação desses organismos à poluentes do solo com *Funneliformis mosseae* (Nicolson & Gerd.) Walker & Schuessler. Esta é uma etapa preliminar de um estudo que visa inserir o uso de novas espécies de FMAs em ensaios ecotoxicológicos padronizados ISO, que sejam ecologicamente relevantes para solos do Brasil; e determinar outros possíveis parâmetros de crescimento assimbiótico destes fungos, além da germinação. Ensaios realizados com dez isolados de FMAs, incubados em câmara de crescimento do tipo B.O.D à 24°C (± 2°C), durante 7 e 14 dias demonstraram o bom desempenho da germinação *G. margarita* (87,30%), atendendo aos critérios de validação do teste ecotoxicológico proposto pelo protocolo ISO. No entanto, ensaios adicionais com outras espécies de FMAs, além de testes com poluentes e solos naturais são necessários para elaborar uma proposta contundente de adaptação do uso do Protocolo ISO/TS 10832:2009.

Termos de indexação: Microbiota do solo; Risco Ambiental de Poluentes; Ensaios de Ecotoxicidade.

INTRODUÇÃO

Entre os componentes da comunidade microbiana do solo, os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são particularmente importantes. Estes fungos encontram-se amplamente distribuídos na maioria dos ecossistemas, desde florestais aos desérticos,

em regiões tropicais, temperadas e árticas e representam a mais ampla associação entre plantas e fungos encontrada na natureza (Souza & Silva, 1996). São considerados organismos chave nos sistemas solo-planta, pois sua associação com as raízes de cerca de 80% das espécies de plantas vasculares, representa uma ligação direta entre estas e o solo (ISO, 2009).

Os FMAs têm sido estudados com vistas à sua aplicação para a produtividade das culturas, mediante seus efeitos na nutrição das plantas e outros benefícios diretos e indiretos (Araújo, 2008). Esses organismos têm sido cada vez mais associados à qualidade ambiental, tanto por seu papel fundamental na manutenção dos ecossistemas como por sua sensibilidade a variações nos muitos fatores que compõem os ambientes (Silveira & Freitas, 2007).

Embora o ciclo de vida dos FMAs dependa da simbiose, a etapa de germinação pode ocorrer sem a presença de um hospedeiro. Nesta etapa inicial, após a quebra da dormência, ocorre a síntese de ácidos nucléicos e proteínas essenciais que dão suporte a formação e crescimento do tubo germinativo, que pode atingir vários centímetros, seguida da formação de ramificações e agrupamentos de células, indicando um micélio inicial e o estabelecimento da colonização das raízes de plantas (Moreira & Siqueira, 2006; Maia et al., 2010).

A presença de diferentes tipos de poluentes tem efeitos prejudiciais sobre os FMAs e demais organismos do solo. Esses poluentes podem afetar as várias etapas do ciclo de vida dos FMAs, desde a germinação até etapas mais avançadas no processo de simbiose, tornando-os importantes ferramentas para os estudos de avaliação da qualidade de solos (Moreira & Siqueira, 2006; Araújo & Monteiro, 2007).

As avaliações de risco ecológico e periculosidade de poluentes no solo são realizadas utilizando diversos testes com organismos vivos (fauna do solo, plantas, microrganismos, dentre outros). Estes testes estão padronizados internacionalmente por diversas entidades como a ISO, a USEPA, a OECD, dentre outras. A utilização de metodologias normalizadas para avaliações de toxicidade com



substâncias químicas, solos contaminados e compostos diversos tem sido amplamente recomendada, pois permitem a comparação de resultados obtidos em circunstâncias distintas, com maior controle e garantia na geração de dados (Sisinno & Sáfiadi, 2013).

No Brasil, ainda não existem protocolos de pesquisa ou normas técnicas que orientem os estudos para avaliação do efeito ecotoxicológico de poluentes sobre a fase assimbiótica do FMA. Internacionalmente, no ano de 2009 foi publicada a norma ISO 10832 que norteia os estudos dos efeitos de poluentes sobre o aspecto da germinação de esporos de FMAs e tem sido usada como referência. Esta norma internacional, no entanto, aborda apenas a germinação de esporos de FMAs, não considerando outros parâmetros pertinentes da fase assimbiótica desses fungos.

Descrevemos aqui uma etapa preliminar do estudo visa inserir o uso de novas espécies de FMAs em ensaios ecotoxicológicos, que sejam ecologicamente relevantes para solos do Brasil; e determinar outros possíveis parâmetros de crescimento assimbiótico destes fungos, além da germinação de esporos e, como ação consequente, sugerir melhorias e a ampliação de uso do protocolo ISO/TS 10832 em testes ecotoxicológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesta etapa foram avaliadas a germinação de esporos de dez isolados de FMAs: *Acaulospora colombiana* (Spain & N. C. Schenck) Kaonongbua, J.B. Morton & Bever (SCT115A), *A. koskei* (Błaszczowski) (SCT049C e SCT048A), *A. morrowiae* (Spain & N. C. Schenck) (SCT400B, SCT056A e SCT063A), *Claroideoglossum etunicatum* (W. N. Becker & Gerd.) C. Walker & Schuessler (SCT101A), *Gigaspora albida* (N. C. Schenck & G. S. Sm.) (SCT200A), *G. margarita* (Becker & Hall) (SCT077A), *Rizhophagus clarus* (T. H. Nicolson & N. C. Schenck) C. Walker & Schuessler (SCT720A) provenientes da Coleção Internacional de Cultura de Glomerycota – CIG em areia (ISO, 2009) não contaminada.

Os esporos a serem utilizados foram extraídos de culturas puras pelo método de peneiragem úmida (Gerdemann & Nicolson, 1963) seguido por centrifugação em gradiente de sacarose (20% e 60%). Para a montagem dos ensaios, os esporos coletados foram colocados sobre um papel filtro ligeiramente umidificado a fim de aderirem a ele e dali transferidos para filtros de membrana de nitrocelulose (diâmetro 47 milímetros, porosidade de 0,45 µm, branco, quadriculada, 3mm gridline, previamente umidificada com água destilada), no número de 30 esporos por membrana. Os esporos foram cobertos com outra membrana previamente umedecida formando o chamado “sanduíche de esporos” e colocados em placa de Petri de plástico

(9 cm diâmetro), entre duas camadas do substrato. As placas foram seladas com filme de plástico e incubados em câmara de crescimento do tipo B.O.D à 24°C (±2°C), no escuro, exatamente como proposto pelo Protocolo ISO.

Para todos os isolados citados, o número total de esporos recuperados e o número de esporos germinados foram contados para responder ao parâmetro germinação. Para ser contabilizado como esporo germinado, o comprimento das hifas após a germinação deve ser, pelo menos, 5 vezes maior do que o diâmetro do esporo.

Mensurou-se o tamanho do tubo germinativo e o comprimento total de hifas em micrômetros (µm), utilizando-se microscópio estereoscópico e software de imagem (AxioVision 4.8[®]). Estas variáveis, no entanto, não serão comparadas entre si neste momento e estarão disponíveis para correlações posteriores.

Para cada isolado fúngico utilizado, foram montadas 6 repetições. Destas, três repetições foram avaliadas em 7 e as outras três em 14 dias (tempo previsto no protocolo ISO) após o início da incubação.

Esta etapa demandou apenas de análise estatística exploratória. Para cada tempo e réplicas, o número de esporos recuperados e germinados foi estimado. A percentagem de esporos germinados *versus* o número de esporos recuperados é calculada e os resultados foram considerados válidos se: (1) o número médio de esporos recuperados for maior ou igual a 25, no final do ensaio; (2) a porcentagem média de germinação de esporos para o controle for maior ou igual a 75%, no final do ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao 7º dia de incubação, o percentual de germinação não atingiu 75% para nenhum dos isolados fúngicos testados, embora alguns tenham atingido percentuais próximos a esse (Figura 1). Ao 14º dia, as respostas de germinação foram positivas apenas para *G. margarita*, que teve média de 87,30%. Embora tenham apresentado taxa final de germinação insuficiente para validar o ensaio *G. albida* e *A. koskei* (SCT049C) obtiveram percentual de germinação, 33,04% e 16,35%, respectivamente, superior aos demais isolados testados (<10%) (Figura 1).

Taxas baixas de germinação de esporos para *Acaulospora sp.*, *C. etunicatum* e *R. clarus* também foram descritos por Clark (1997) e podem ser influenciadas por vários fatores, entre eles o pH, a temperatura, a umidade e luminosidade (Moreira & Siqueira, 2006).

Estudos com germinação de esporos de FMAs foram conduzidos com temperaturas e tempo de incubação superiores aos adotados neste ensaio, como por exemplo: 7 e 28 dias à 28°C (Maia &



Yano-Melo, 2001), 30 dias à 30°C (Cardoso et al., 2002) e 21 e 28 dias à 28°C (Soares et al., 2009), indicando que testes posteriores devem considerar estes dois fatores de forma individual e/ou conjunta.

Os esporos de FMAs podem também passar por um período de dormência onde a ausência de germinação pode ocorrer, mesmo em condições ideais para tal (Maia et al. 2010). O período de duração dessa fase é variável entre as espécies de FMAs e já foi descrito para representantes de *Acaulospora* (Tommerup, 1987), *Gigasporaceae* (Souza et al., 2005) e *Glomus* (Tommerup, 1983).

Ensaio adicionais com variação na temperatura, período de incubação e substratos devem ser realizados a fim de obter as variáveis ótimas para a germinação assimiótica dos isolados testados, bem como, ensaios adicionais de ecotoxicidade para avaliar o desempenho do isolado de *G. margarita* em solos naturais e contaminados.

CONCLUSÕES

G. margarita foi a única espécie que atendeu os percentuais exigidos pelo protocolo para validação de ensaios e tem potencial para ser usada em substituição à espécie de referência do protocolo ISO.

Uma proposta de adaptação do uso do Protocolo ISO/TS 10832:2009, entretanto, carece de informações e ensaios adicionais outras espécies de FMAs, substratos inertes, poluentes e tipos de solo.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e PROMOP/UDESC pelo apoio financeiro e disponibilização da bolsa de mestrado da primeira autora.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. S. F. de & MONTEIRO, R. T. R. Indicadores Biológicos de Qualidade do Solo. Bioscience Journal. Vol 23, Nº 3, 2007.

ARAÚJO, F. DOS S. Potencial de inoculo de fungos micorrízicos arbusculares em seis sistemas de uso do solo, na região nordeste do semi-árido do Brasil. Patos: O autor, 2008. 50p. (Dissertação de Mestrado).

AXIOVISION. Zeiss (Imaging System Microscope Software), versão 4.8. Alemanha, 2009.

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

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

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

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

MAIA, L. C; SILVA, F. S. B. da & GOTO, B. T. Estrutura, ultraestrutura e germinação de glomerosporos. In: SIQUEIRA, J.O. et al., eds. Micorrizas: 30 Anos de Pesquisa no Brasil. Lavras: UFLA. 1 Ed, 2010. 716 p.

MAIA, L. C. & YANO-MELO, A. M. Germination and germ tube growth of the arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora albida* in different substrates. Brazilian Journal of Microbiology. 32:281-285, 2001. ISSN 1517-8382 281

MOREIRA, F. M. S & SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: UFLA. 2. Ed, 2006. 729p.

SILVEIRA, A. P. D. da & FREITAS, S. dos S., eds. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 312 p.

SISINNO, C. L. S. & SÁFADI, R. S. Controle de qualidade dos resultados de toxicologia ambiental. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C. org. Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2013. 216 p.

SOARES, S. A. G. et al. Efeito de bactérias na germinação de fungos micorrízicos arbusculares e co-inoculação em mudas de abacaxizeiro. Revista Caatinga-Issn 0100-316x. Universidade Federal Rural Do Semi-Árido (Ufersa). v.22, n.2, p.31-38, abril/junho de 2009.

SOUZA, F. A. et al. Life history strategies in Gigasporaceae: insight from monoxenic culture. In: DECLERK, S; STRULLU, D.G. & FORTIN J.A. In Vitro Culture of Mychorrhizas. Springer, 2005.

SOUZA, F.A. & SILVA, E. M. R. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: SIQUEIRA, J. O., ed. Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas. Lavras: UFLA/DCS e DCF, 1996. p.255-290.

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

TOMMERUP, I. C. Physiology and ecology of VAM spore germination and dormancy in soli. In: SYLVIA, D.M.; HUNG, L.L. & GRAHAM, S. H., eds. *Proceedings of the 7TH NACOM*, Gainesville, 1987. p.175-177.

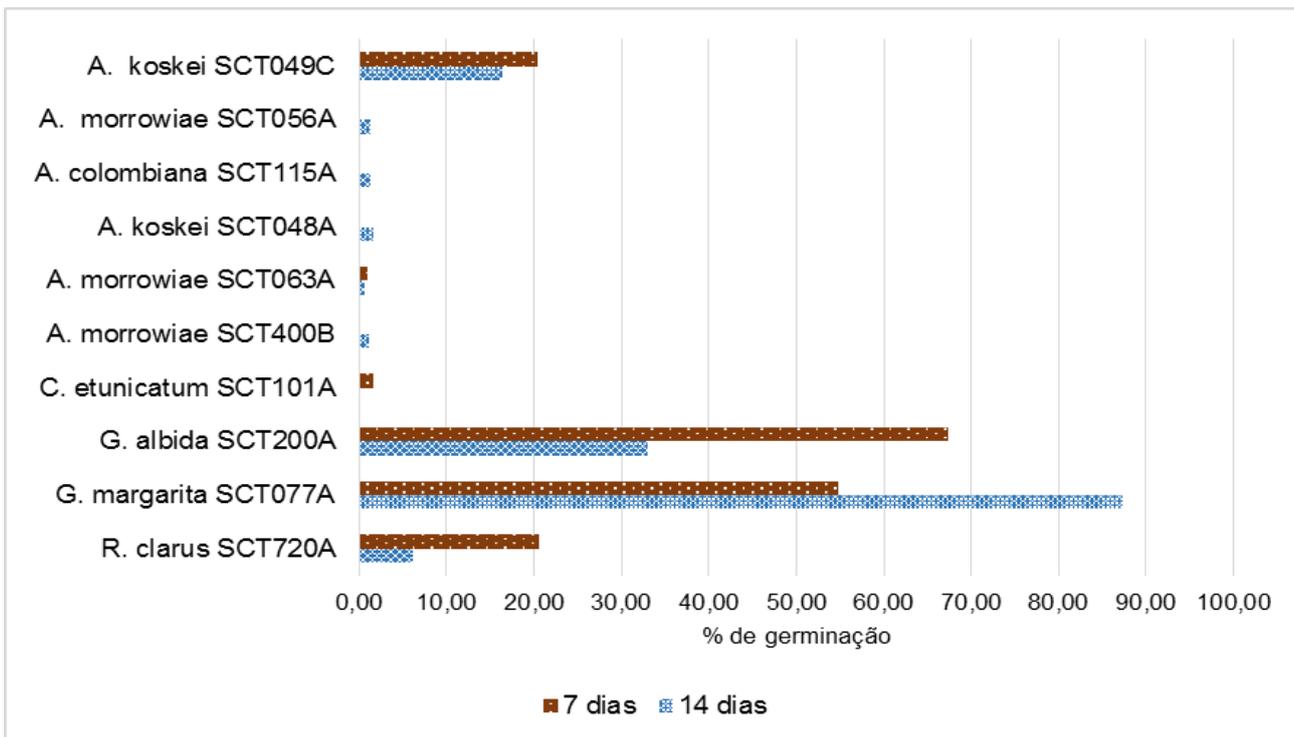


Figura 1 - Percentuais de germinação dos isolados fúngicos após 7 e 14 dias de incubação.