

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

Lídia Alves Antunes

TOLERÂNCIA DE ISOLADOS DE *Pisolithus* sp. A CUPINICIDAS

DIAMANTINA – MG

2016

Lídia Alves Antunes

TOLERÂNCIA DE ISOLADOS DE *Pisolithus* sp. A CUPINICIDAS

2016

Lídia Alves Antunes

TOLERÂNCIA DE ISOLADOS DE *Pisolithus* sp. A CUPINICIDAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Graziotti

DIAMANTINA - MG

2016

A636t 2016	<p>Antunes, Lídia Alves. Tolerância de isolados de pisolithus sp. a cupinícidas / Lídia Alves Antunes. – Diamantina, 2016. 33 p.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Graziotti.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, 2016.</p> <p>1. Ectomicorrizas. 2. Inseticidas. 3. Xenobióticos. I. Graziotti, Paulo Henrique. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 632.951</p>
---------------	--

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lídia Alves Antunes

TOLERÂNCIA DE ISOLADOS DE *Pisolithus* sp. A CUPINICIDAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Graziotti

Aprovada em 19/08/2016

Prof. Dr. Marcus Alvarenga Soares - UFVJM

Prof. Sebastião Lourenço de Assis Júnior - UFVJM

Prof. Dr. Paulo Henrique Graziotti - UFVJM

Diamantina

OFEREÇO

*Á Deus, Nossa Senhora e ao meu Anjo da Guarda,
Por me guiarem, protegerem e por não me deixarem
desistir perante às dificuldades, que não foram poucas.*

DEDICO

*Aos meus amados pais Luiz e Enilde pelo amor e carinho,
Ao meu irmão Guilherme sempre torcer por mim,
Ao meu namorado Diego pelo amor e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus por ter me iluminado, não ter me deixado fraquejar nos momentos difíceis e me mostrar que quando há fé, perseverança e trabalho alcançamos a vitória.

Aos meus pais, Luíz Carlos e Enilde que por muitas vezes deixaram de realizar seus sonhos para que eu pudesse concretizar os meus, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos e conselhos valiosos e por acreditarem sempre em mim. Agradeço, também, ao meu irmão Guilherme pelo apoio e incentivo.

Ao meu namorado Diego, pelo amor e companheirismo dedicados à mim e por participar dos momentos mais importantes da minha vida. Agradeço à sua família, pela torcida e amizade.

À toda minha família pelas vibrações positivas, especialmente ao meu primo e amigo Rafael que sempre me incentivou e acreditou no meu potencial, à minha vizinha e chará Lídia pelo carinho e à minha vó Preta (in memoriam) que ficaria muito feliz com esta minha conquista.

Á todos os meus amigos, que sempre levarei no coração, especialmente à Amanda, Fernanda, Débora Coura, Bárbara, Lariane e ao Arley.

Ao meu orientador professor Paulo Henrique Graziotti, pela orientação desde a iniciação científica, pelos ensinamentos, puxões de orelha, por ter confiado no meu trabalho e potencial e, principalmente, pela paciência.

À UFVJM, instituição da qual tenho muito orgulho, pela minha formação acadêmica e estrutura. Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e à todos os funcionários e professores que fizeram parte da minha formação na UFVJM.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo, especialmente à Laís, Débora, Aline, Leandro, Clériston, Lili, Lucinha, Lidiomar e Andrezza pela ajuda nos experimentos, por fazerem as viagens cansativas e de muito trabalho se tornarem divertidas, pelas risadas e farras nos momentos de descontração. Esta caminhada foi bem mais leve e prazerosa com vocês!

À CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudos.

À APERAM Bioenergia, pela concessão dos produtos utilizados nos experimentos do mestrado.

RESUMO

ANTUNES, L.A **TOLERÂNCIA DE ISOLADOS DE *Pisolithus* sp. A CUPINICIDAS.** 2016. p. (Dissertação - Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

A imersão de mudas de eucalipto em soluções de cupinicidas antes do plantio pode influenciar o desempenho de programas de inoculação com fungos ectomicorrízicos (FEM) em viveiros comerciais, pois estes inseticidas podem interferir na simbiose. O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância de isolados de *Pisolithus* sp. aos cupinicidas thiamethoxam, imidacloprid e fipronil. Discos de 5 mm de meio de cultura com micélio dos isolados D5, D17, D95, D216, D29, D10, D15, C9C, C16 e C13 de *Pisolithus* sp. foram pré-imersos em soluções com 3 g L⁻¹ de thiamethoxam, 7,5 g L⁻¹ imidacloprid e 7,5 g L⁻¹ de fipronil. Após este procedimento foram colocados para crescer por 10 dias em meio de cultura Melin-Norkrans modificado (MNM). Os cupinicidas foram avaliados em experimentos independentes. Em outra série de experimentos, discos 5 mm dos isolados D5, D10 e D216 foram colocados para crescer por 20 dias em meio de cultura contendo 0 (controle), 0,4; 0,8 e 1,6 g L⁻¹ de thiamethoxam, 3; 6 e 12 g L⁻¹ de imidacloprid e 0 (controle); 3; 6 e 12 g L⁻¹ de fipronil. O efeito dos cupinicidas sobre fungos ectomicorrízicos foi dependente do isolado, do princípio ativo, do tempo de exposição e da concentração do cupinicida. Os isolados mais tolerantes a pré-imersão do micélio nos cupinicidas foram o C9C para o thiamethoxam, o D15 para o imidacloprid e o D10 para o fipronil. Os três cupinicidas foram tóxicos aos isolados de *Pisolithus* sp. quando estes foram adicionados ao meio de cultura. Em geral, thiamethoxam foi o menos tóxico para os isolados de *Pisolithus* sp..

Palavras chaves: Ectomicorrizas, inseticidas, Xenobióticos.

ABSTRACT

ANTUNES, L.A.S. *Pisolithus* sp. ISOLATED OF TOLERANCE At TERMITICIDES 2016. 63p. Dissertation (Masters in Vegetable Production) – Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valley, Diamantina, 2016.

The immersion eucalyptus seedlings in termiticides solutions before planting can influence the performance of inoculation programs with ectomycorrhizal fungi (EMF) in commercial nurseries, as these insecticides can interfere with symbiosis. Study aimed at assessing the tolerance of *Pisolithus* sp. isolates to the termiticides thiamethoxam, imidacloprid and fipronil. 5-mm-diameter circular sections of culture medium with the mycelial isolates D5, D17, D95, D216, D29, D10, D15, C9C, C16 and C13 *Pisolithus* sp. were pre-dipped in solutions with 3 g L⁻¹ of thiamethoxam, 7.5 g L⁻¹, 7.5 g L⁻¹ imidacloprid and fipronil. Next were placed let grow for 10 days through the cultured on modified Melin-Norkrans (MNM) solid medium. The termiticides were through independent testing. In another series of experiments, 5-mm-diameter circular sections of culture medium with the mycelial isolates D5, D10 and D216 were placed let grow for 20 days in solid medium containing 0 (control) 0.4; 0.8 and 1.6 g L⁻¹ thiamethoxam 3; 6; 12 g L⁻¹ of imidacloprid and 0 (control); 3; 6; 12 g L⁻¹ fipronil. The effect of termiticides on ectomycorrhizal fungi was dependent of isolated, of active ingredient, of exposure time and concentration of termiticide. The most tolerant isolates the pre-soaking the mycelium in termiticides were C9C for thiamethoxam, the D15 for imidacloprid and D10 for fipronil. The three termiticides were toxic to isolates *Pisolithus* sp. when they were added to the culture medium. In general, thiamethoxam was less toxic to isolates *Pisolithus* sp.

Keywords: Ectomycorrhizas, insecticides, Xenobiotics

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Impacto dos agroquímicos na microbiota.....	2
1.2 Cultura do eucalipto.....	4
1.3 Importância dos fungos ectomicorrízicos na cultura do eucalipto.....	5
1.4 Necessidade da utilização de cupinícidas na cultura do eucalipto.....	6
1.5 Thiamethoxam.....	7
1.6 Imidacloprid.....	8
1.7 Fipronil.....	9
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivos específicos.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Cupinícidas.....	10
3.2 Crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido após a pré- imersão do micélio em soluções de cupinícidas.....	11
3.3 Efeito da adição de cupinícidas ao meio de crescimento de fungos ectomicorrízicos MNM sólido.....	11
4 RESULTADOS.....	12
4.1 Crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido após a pré- imersão do micélio em soluções de cupinícidas.....	12
4.1.1 Thiamethoxam.....	12
4.1.1 Imidacloprid.....	13
4.1.3 Fipronil.....	13
4.2 Efeito da adição de cupinícidas ao meio de crescimento de fungos ectomicorrízicos MNM sólido.....	14
4.2.1 Thiamethoxam.....	14
4.2.2 Imidacloprid.....	16
4.2.3 Fipronil.....	16
5 DISCUSSÃO.....	16
6 CONCLUSÕES	21

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
APÊNDICE.....	31

INTRODUÇÃO GERAL

Embora o setor florestal esteja em crescimento no Brasil, com a utilização de árvores de eucalipto, é necessário buscar tecnologias que promovam melhor qualidade e produtividade dos seus produtos. Desta forma faz-se necessário tecnologias que promovam melhorias nestas questões. A inoculação de fungos ectomicorrízicos é uma biotecnologia promissora que pode trazer muitos benefícios para este setor florestal, incluindo a redução de adubação devido ao melhor aproveitamento do solo pelo sistema radicular, absorção de água mais eficiente, maior proteção das raízes contra danos do sistema radicular causados por patógenos ou insetos e aumento da sobrevivência e crescimento das mudas no campo. Desta forma, os fungos ectomicorrízicos (FEM) podem contribuir com o aumento da produtividade, sustentabilidade e manutenção dos ecossistemas florestais homogêneos.

Embora a inoculação de fungos ectomicorrízicos seja uma realidade em países como os Estados Unidos, no Brasil ainda não é utilizada em larga escala. Isto pode ser devido à falta de pesquisas relacionadas ao melhoramento genético do eucalipto voltado para estabelecimento desta simbiose. São, incipientes, ainda, os estudos sobre as adaptações dos fungos ectomicorrízicos às diferentes condições edafoclimáticas do Brasil, sobre as adaptações destes fungos à adubações e a agroquímicos que são utilizados rotineiramente nos viveiros florestais e a falta de formulações comerciais de inoculantes ectomicorrízicos.

Com relação aos agroquímicos, sabe-se que os FEM possuem tolerância diferenciada a herbicidas e fungicidas mas não existem trabalhos com cupinícidas. É rotina em várias empresas florestais o uso preventivo de cupinícidas por meio da imersão das raízes das mudas antes do plantio no campo. Este tratamento é usado com objetivo de prevenir danos, e evitar a morte das mudas após o plantio. Esse tratamento preventivo é o preferido pelas empresas devido ao menor custo do que o tratamento no campo. No entanto, a falta de conhecimento do efeito dos cupinícidas pode impedir o sucesso de programas de inoculação de FEM previamente selecionados em mudas de eucalipto com objetivo de melhorar a qualidade e o desempenho das mesmas.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Impacto dos agroquímicos na microbiota

Os micro-organismos do solo tem importância vital para a manutenção da qualidade do solo. Contribuem para a agregação e aeração, com a produção de substâncias que atuam como agentes agregantes e cimentantes e, além disso, também, podem produzir substâncias que são utilizadas como fatores de crescimento e hormônios para as plantas. Também, podem ajudar na melhor exploração do solo e na absorção de nutrientes, especialmente aqueles pouco móveis

no solo, auxiliando uso eficiente da água. O uso crescente de agroquímicos utilizados na agricultura tem influenciado a microbiota e suas atividades, uma vez que os micro-organismos do solo respondem de forma variada a estes.

A produtividade e a sustentabilidade dos agroecossistemas depende da biodiversidade microbiana do solo e dos processos exercidos por esta. A preservação da integridade e da capacidade metabólica da microbiota é fundamental para a manutenção da qualidade de solo (ALEF e NANNIPIERI, 1995). As práticas de manejo associadas e a intensificação da agricultura (GILLER *et al.*, 1997) como perturbação do solo (BEARE *et al.*, 1995; CARTER, 1992), adição de fertilizantes (KINNEY *et al.*, 2005) e utilização de agroquímicos (MOORMAN, 1989; WAIWRIGHT, 1978; WARDLE e PARKINSON, 1991) podem alterar a funcionalidade da microbiota, pela influência tanto na quantidade como na atividade dos micro-organismos no solo.

A produtividade e a saúde dos sistemas agrícolas dependem, em parte, dos processos funcionais das comunidades microbianas do solo (DORAN e ZEISS, 2000; KILLHAM, 1994; O'DONNELL *et al.*, 1994; PANKHURST *et al.*, 1997). Algumas práticas agrícolas podem colocar essas comunidades em risco. Por exemplo, a grande utilização de fertilizantes inorgânicos e agroquímicos, além de aumentarem o custo de produção, podem influenciar negativamente o ambiente (PRETTY *et al.*, 2000 e 2003). Assim podem causar mudanças na densidade de fungos e bactérias (BODDINGTON e DODD, 2000; CLEGG *et al.*, 1998; EL FANTROUSSI *et al.*, 1999; ENGELEN *et al.*, 1998; GORLACH-LIRA *et al.*, 1997; MC CAIG, 1999) e a supressão ou a promoção do crescimento e da atividade microbiana (BOLDT e JACOBSEN, 1998; CRECCHIO *et al.*, 2001; HANEY *et al.*, 2000).

Essas alterações podem ocasionar uma perda de diversidade e, ou da função dentro da comunidade microbiana do solo (GIRVAN *et al.*, 2004), influenciando a decomposição da matéria orgânica e a fixação dos nutrientes (MESQUITA, 2005).

Os herbicidas podem causar impactos negativos à microbiota edáfica, devido às diferentes composições, às características físico-químicas e ao comportamento no solo (DA SILVA, *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* revelam que a maioria dos herbicidas, quando utilizados em altas concentrações são potencialmente tóxicos para os micro-organismos, sendo frequente os efeitos inibitórios na quantidade e na atividade da microbiota do solo (CHILDS, 2007). Este efeito é ainda mais acentuado, em especial, pelo uso dos herbicidas aplicados em pré-emergência das plantas daninhas. Estes atingem diretamente o solo, podendo causar prejuízos por aumentarem o risco de exposição dos micro-organismos do solo, especialmente aqueles

benéficos, como os fungos micorrízicos e micro-organismos solubilizadores de fosfatos (DA SILVA, *et al.*, 2014).

A aplicação dos herbicidas sulfentrazone, isoxaflutol e oxyfluorfen, reduziu a colonização radicular do eucalipto por fungos micorrízicos arbusculares e o potencial de solubilização de fosfato inorgânico. Além disso, o sulfentrazone provocou aumento do número de esporos não viáveis de fungos micorrízicos arbusculares no solo avaliado (DA SILVA, 2014).

A adição de 413,8 mg L⁻¹ de glyphosate em meio de cultura sólido, reduziu o diâmetro das colônias de cinco isolados de *Pisolithus* sp. em 5,3% para o isolado D106; 19,3% para o D17; 21,7% para o D118; 22,6% para o D51 e 26,8% para D10. (ANTUNES, *et al.*, 2015). Apenas concentrações maiores que 100 mg L⁻¹ dos herbicidas triclopyr, glyphosate, hexazinone e ácido 2,4 diclorofenoxiacético inibiram o crescimento dos *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma longicaudum* e *Pisolithus* sp. (ESTOK *et al.* 1989; FERNANDES *et al.*, 2014). A ação do herbicida bentazon inibiu o crescimento de bactérias anaeróbicas fixadoras de N₂ (ALLIEVI *et al.*, 1996) e de bactérias e fungos celulolíticos (MARSH *et al.*, 1978). O trifluralina causou inibições de fungos micorrízicos (KELLEY e SOUTH, 1978) e o imazetapyr causou toxidez ao *Rhizobium leguminosarum* pv *viciae* (ROYUELA *et al.*, 1998).

Os inseticidas também são produtos muito utilizados na agricultura para o combate de pragas e podem influenciar a atividade da microbiota não alvo. Em estudo que avaliou o efeito dos inseticidas thiamethoxam, carbosulfam, endosulfam, imadacloprid, diafentiuron, acefato, monocrotofós, deltametrina e fipronil sobre o crescimento de *Aschersonia aleyrodis*, *Bacillus thuringiensis*, *Baculovirus anticarsia*, *Beauveria bassiana*, *Hirsutella thompsonii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces farinosus*, *Sporothrix insectorum* e *Verticillium lecanii*, o endosulfam, monocrotofós e deltametrina foram os que mais prejudicaram ao desenvolvimento do *B. thuringiensis*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *S. insectorum* (BATISTA FILHO *et al.*, 2001). O tratamento do solo com o herbicida glyphosate reduziu o número de bactérias em 82,5% e com paraquat a redução foi de 52,9% (AMPOFO, 2009). Já o inseticida diametoato, no solo, não reduziu esta característica (AMPOFO, 2009). Essa diversidade de resultados dos impactos dos agroquímicos sobre a microbiota e processos biológicos do solo está relacionada com a natureza, heterogeneidade e dinâmica dos efeitos e respostas adaptativas das populações microbianas do solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

1.2 Cultura do eucalipto

Plantas conhecidas como eucalipto, pertencentes aos gêneros *Eucalyptus*, *Corymbia* e *Angophora* compreendem cerca de 700 espécies, sendo muitas delas utilizadas em cultivos comerciais destinados aos mais diversos usos, como: produção de papel, celulose e carvão vegetal, madeira para serraria, construção civil e indústria de móveis, postes e mourões, óleos essenciais, ornamentação, entre outros (DOUROJEAMI, 2004). Este gênero é o mais utilizado no Brasil nos programas de reflorestamento, contribuindo para o estabelecimento e o crescimento das áreas plantadas, pois apresenta rápido crescimento e boa adaptabilidade às condições edafoclimáticas do país. Em 2013, a área brasileira de árvores plantadas no Brasil atingiu 7,7 milhões de hectares, representando um crescimento de 1,8% em relação ao indicador de 2013. O eucalipto ocupa 5,6 milhões desta área representando 72,0% da área total. O consumo brasileiro de madeira de eucalipto *in natura* em 2014 foi de 190,0 milhões de m³ o que representa aumento de 2,6% em relação ao consumo do ano anterior. A estimativa de consumo do Brasil é de 350 milhões de m³ por ano Minas Gerais é o estado com maior área plantada de eucalipto no Brasil com 1,4 milhão hectares (ABRAF, 2013; IBÁ, 2015).

1.3 Importância dos fungos ectomicorrízicos na cultura do eucalipto

Devido à grande demanda de madeira e a dificuldade de expansão dos reflorestamentos causadas pelas dificuldades financeiras, políticas e ambientais (ALVARENGA, 1994), tem surgido a necessidade de tecnologias que melhorem a produtividade das florestas de eucalipto (ALVES *et al.*, 2001). Dentre estas tecnologias, a inoculação de fungos ectomicorrízicos é uma boa alternativa, embora não tenha sido utilizada no Brasil, diferente de países como os Estados Unidos, onde inoculantes tem sido comercializados. A utilização desta tecnologia pode favorecer o crescimento das plantas mesmo em solos com baixos teores de nutrientes (ALVES *et al.*, 2001), pois aumenta da absorção de água e nutrientes (SOUZA *et al.*, 2004; GLOWA *et al.*, 2003; SAWYER *et al.*, 2003) e proporciona maior tolerância a condições de toxidez neste ecossistema e a patógenos do solo (GRAZZIOTTI, *et al.*, 2003; MARX e CORDELL, 1989; SMITH e READ, 1997).

A associação simbiótica entre FEM e espécies arbóreas é comum em *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp. em plantas cultivadas em larga escala no Brasil, como esta associação é rara em viveiros florestais, provavelmente, devido aos altos níveis de adubação fosfatada e nitrogenada (SOARES *et al.*, 1990), e a utilização de substratos compostos de materiais inertes como vermiculita, casca de arroz carbonizada e fibra de coco, o que o torna desprovido dos FEM. A utilização destes micro-organismos em plantios comerciais de eucalipto, tem sido considerada uma alternativa para o uso mais eficiente de fertilizantes, tornando as mudas mais resistentes a patógenos e aumentando a sobrevivência na ocasião do transplântio para o campo (SOUZA *et*

al., 2006), principalmente em solos de baixa fertilidade onde, em geral, são instalados os povoamentos florestais no Brasil.

Com a inoculação de mudas seminais de *Eucalyptus urophylla* e *E. globulus* com esporos de *Scleroderma* spp, em condições controladas, observou-se uma colonização de até 100% das raízes finas (CHEN *et al.*, 2006). Os autores observaram aumentos na produção de massa seca total de até 1,6 vezes em mudas de *E. urophylla* e de 2,0 vezes em mudas de *E. globulus* em relação às mudas não inoculadas.

Mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com o isolado UFSC-Pt24 de *Pisolithus* sp. crescido em uma mistura vermiculita-turfa-meio de cultura apresentaram maior porcentagem de colonização na maior dose de inoculante (10% no substrato de produção de mudas), o aumento da altura (1,3 vezes), diâmetro (1,4 vezes) e massa seca da parte aérea (MSPA) (1,7 vezes) foi observado a partir de 3% de inoculante no substrato de produção de mudas e os maiores conteúdos de P foram a partir de 1 % de inoculante (ALVES *et al.*, 2001). Contudo, estes resultados variam com a planta hospedeira, com as doses de inoculante e fertilizantes, com o manejo adotado, com o isolado e, ou espécie de FEM utilizados (ALVES *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2006; SOUZA, *et al.*, 2004;).

Os FEM têm capacidade diferenciada em colonizar e promover benefícios às espécies vegetais. Em condições específicas, há diferentes respostas, variando em compatibilidade e eficiência (GARBAYE, 1990; SAWYER *et al.*, 2003). Mudas de *E. dunnii* inoculadas com *Pisolithus* sp. isolado UFSC-Pt24 produziram 1,7 vezes maior MSPA do que as não inoculadas (ALVES *et al.*, 2001), com *Scleroderma* sp. isolado UFSC-Sc68 a MSPA foi 3,3 vezes maior (SOUZA *et al.*, 2008), com *P. microcarpus* isolado UFSC-Pt116 foi 1,2 vezes maior e com *Chondrogaster angustisporus* isolado UFSC-Ch163 a MSPA foi 1,3 maior (SOUZA *et al.*, 2004).

A inoculação de isolados de *Pisolithus* sp. em mudas de eucalipto aumentou a sobrevivência em até 42,7%, a altura em até 26,8%, a massa seca total da muda em 26,4%, a massa seca da parte aérea em 15,7%, a massa seca das raízes em até 33%, número e torrões firmes e bem enraizados em até 19% (AVELAR, 2016; CARNEIRO, 2016; COSTA, *et al.*, no prelo; FONSECA, 2013; GOMES, 2016). Estes aumentos proporcionados pela inoculação ectomicorrízica pode ser indicativo de que estas mudas tenham um melhor desenvolvimento no campo e aumento de produtividade. Além disso, a inoculação aumentou também, os teores de Ca, Cu, Fe, Zn, os teores de N em até 57,5%, os de P em até 73% e os de K em até 60 % (AVELAR, 2016; CARNEIRO, 2016; COSTA, *et al.*, no prelo; GANDINI *et al.*, 2015). Estes

aumentos nos teores de nutrientes nas plantas pode promover maior economia no uso de fertilizantes e, conseqüentemente, diminuição do custo de produção destas mudas nos viveiros comerciais.

1.4 Necessidade da utilização de cupinídeos na cultura do eucalipto

As empresas florestais utilizam, comumente, os agroquímicos no manejo das florestas para evitar prejuízos com os insetos, doenças e plantas daninhas e reduzir perdas (FARIA, 2009).

A boa formação do sistema radicular das mudas de eucalipto tem grande importância para o estabelecimento e desenvolvimento destas mudas no campo. Raízes com má formação têm dificuldade na absorção de água e nutrientes em quantidades adequadas para atender a demanda da planta (VOMERO, 2010). O ataque de cupins causa a destruição do sistema radicular e secamento das mudas, atacando-as desde de o plantio até a idade de dois anos (SILVA *et al.*, 2008). O dano provocado por estes insetos pode causar até 70% de mortalidade das mudas transplantadas. Os cupins-de-mudas podem causar redução de 48 m³ há⁻¹ de madeira em florestas de *E. grandis* quando há mortalidade de 20% no plantio (WILCKEN *et al.*, 2002), resultando em perda de US\$ 635,00 ha⁻¹ na colheita. As principais espécies de cupins que atacam as raízes das mudas são: *Cornitermes cumulans*, *Cornitermes bequaerti*, *Syntermes molestus* e *Syntermes insidians* (WILCKEN *et al.*, 2002).

O controle deve ser preventivo, com a imersão das mudas numa calda de cupinídeo durante trinta segundos, encharcando todo o sistema radicular e o caule das mudas até o nível das primeiras folhas. O produto vem na forma de pó e é adicionado à água, na dosagem recomendada pelo fabricante do produto comercial (SILVA *et al.*, 2008). A imersão das mudas em solução de cupinídeo tem as vantagens de reduzir o custo de controle, uso de menor quantidade de inseticida aplicado no solo e maior rendimento do tratamento. Os princípios ativos registrados para o controle dos cupins são: thiamethoxam, imidacloprid e fipronil (AGROFIT, 2016).

1.5 Thiamethoxam

O thiamethoxam (3-(2-clorotiazol-5-ilmetil)-5-metil[1,3,5]oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina) é um inseticida neonicotinoide sistêmico, rapidamente absorvido e transportado a toda a planta com classificação toxicológica III, considerado mediamente tóxico. Atua nos receptores nicotínicos da acetilcolina dos insetos, lesando o sistema nervoso, levando-os a morte (GAZZONI *et al.*, 2008). Os neonicotinoides podem causar efeitos adversos significativos nos organismos não alvos do solo (PISA *et al.*, 2015). O thiamethoxam pode, também, ser a

causa de mortalidade em abelhas (PILLING, *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2015; VANENGELSDORP, *et al.*, 2007). O inseticida thiamethoxam aumentou a duração da fase lag, em que as células não se multiplicam e de alta atividade metabólica, em aproximadamente 4 horas da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, demonstrando ter um leve efeito bacteriostático sobre a mesma (FERNANDES, *et al.*, 2013).

No ambiente aquático o thiamethoxam tem uma meia-vida de 24 a 44 dias sob condições de anaerobiose e com uma meia-vida de 8 a 16 dias, sob condições de aerobiose (UĞURLU, *et al.*, 2015), podendo interferir na biota aquática. Este cupinicida foi altamente tóxico, causando morte ao crustáceo *Gammarus kischineffensis* (UĞURLU, *et al.*, 2015).

O thiamethoxam foi pouco tóxico para os micro-organismos *Aschersonia aleyrodis*, *Bacillus thuringiensis*, *Baculovirus anticarsia*, *Beauveria bassiana*, *Hirsutella thompsonii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces farinosus*, *Sporothrix insectorum* e *Verticillium lecanii* (BATISTA FILHO *et al.*, 2001). Este cupinicida, na concentração de 0,2 g L⁻¹, adicionado ao meio de cultura de batata, dextrose e ágar (BDA), não interferiu no desenvolvimento da microbiota do solo nem do entomopatógeno *Beauveria bassiana* (SOARES, 2011). Quando pulverizado, aos 45 dias após a emergência das plantas de algodão na concentração de 300 g ha⁻¹ foi pouco tóxico para artrópodes inimigos naturais na cultura do algodão (CZEPAK, *et al.*, 2005). A baixa influência do thiamethoxam sobre estes organismos, pode ser pelo fato de que ele é um neonicotinoide que apresenta características de baixa toxicidade, seletividade e eficácia no controle de várias pragas, em diferentes culturas (LARA *et al.*, 2001).

Entretanto, existem, também, alguns micro-organismos como as bactérias *Pseudomonas* sp. e a rhizobactéria *Ensifer adhaerens* que conseguem degradar o thiamethoxam no solo (PANDEY, *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2013).

1.6 Imidacloprid

O imidacloprid (imidacloprid [1- (6-cloro-3-piridil metil) -N-nitroimidazolidin- 2-ilideno amina]) é um inseticida neonicotinoide sistêmico de alta eficiência que atua como um agonista nos receptores nicotínicos de acetilcolina. O imidacloprid tem classificação toxicológica IV, ou seja, é pouco tóxico. É um dos inseticidas mais vendidos do mundo (TOMIZAWA e CASIDA, 2005) e é considerado como um possível substituto para agroquímicos organofosforados em muitos países (JEMEC *et al.*, 2007). O imidacloprid tem elevada persistência no solo e sua meia vida varia de 27 a 229 dias (MILES, 1993). Estudos recentes mostraram que imidacloprid não afetam somente as pragas, mas também podem afetar organismos não-alvo, tais como abelhas (CYCON *et al.*, 2013; GOÑALONS *et al.*, 2015;

YANG *et al*, 2012). Pode, também, induzir estresse oxidativo e causar danos no DNA em *Danio rerio* (peixes-zebra) (GE *et al*, 2015), pode inibir o crescimento adequado e aumentar a mortalidade anelida como de *Eisenia fétida* (GÓMEZ *et al*, 2011), além de provocar mortalidade do anfíbio de água doce *Amphipod Gammarus pulex* (NYMAN *et al*, 2013). O imidacloprid induziu alterações metabólicas em baixa concentração no caramujo de água doce *Lymnaea stagnalis* (TUFI *et al*, 2015). Este cupinicida pode, também, aumentar a mortalidade e diminuir a eficiência de parasitoides importantes no controle biológico de pragas (DESNEUX *et al.*, 2007; GRAFTON-CARDWELL *et al.*, 2008; PAINNE *et al*, 2011; REBEK e SADOFF, 2003; STAPEL *et al*, 2000).

O imidacloprid aplicado em dosagens elevadas pode induzir mudanças nas comunidades microbianas e em suas atividades metabólicas e bioquímicas no solo, isso pode influenciar a manutenção da qualidade do mesmo (CYCON *et al.*, 2013). Em estudo sobre o efeito dos inseticidas thiamethoxam, imidacloprid, fenpropatrina e iprodione sobre o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (ANDALÓ *et al.*, 2004; CAVALCANTI *et al*, 2002; LOUREIRO *et al*, 2002), mostraram que houve compatibilidade do imidacloprid, thiamethoxam com o fungo. O imidacloprid não diminuiu o crescimento das bactérias diazotróficas *Herbaspirillum seropedicae*, na concentração de 250 g L⁻¹, e *Azotobacter chroococcum* na concentração de 0,005g kg⁻¹ de inóculo (FERNANDES *et al.*, 2012; RIVERA *et al.*, 2010). No entanto, existem, também, bactérias e fungos nativos do solo que podem degradar o imidacloprid e usá-lo como fonte de carbono para obtenção de energia (CYCON *et al.*, 2013).

1.7 Fipronil

O fipronil (5-amino-1- [2,6-dicloro-4- (trifluorometil) -fenil] - 4- (trifluorometil sulfonil) -1H-pirazole-3-carbonitrilo) é um inseticida fenilpirazol muito utilizado para a proteção das culturas e permite uma grande flexibilidade nos métodos de aplicação (BONMATIN *et al*, 2015). No entanto, tem classificação toxicológica II, é altamente tóxico para muitas classes de insetos e tem toxidez relativamente baixa para vertebrados quando em comparação com outros inseticidas atualmente em uso (US EPA, 2003). O fipronil provoca a sua toxicidade pelo bloqueio do canal de cloro por meio dos receptores, ácido gama-aminobutírico no sistema nervoso, resultando numa hiper-excitação e morte do inseto (TOMLIN, 2000).

Há uma crescente evidência de que estes inseticidas sistêmicos podem representar sérios riscos de impactos sobre alguns organismos não-alvo. O fipronil inibiu em 94% a reprodução do crustáceo *Amphiascus tenuiremis* com 0,42 mg L⁻¹ e atrasou o tempo de expulsão

dos ovos pelas fêmeas (CHANDLER *et al.* 2004). A concentração do fipronil que matou 50% da população do microcrustáceo *Daphnia pulex* foi de 0,016 mg L⁻¹ (STARK e VARGAS, 2005) e para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foi de 0,248 mg L⁻¹ (US EPA, 1996). O fipronil, também, apresentou toxicidade direta para invertebrados não alvos, como para o díptero *Drosophila melanogaster* e pode afetar o sistema nervoso das abelhas, (PISA *et al.* 2015). Pode causar, também, alta toxicidade para o peixe *Poecilia reticulata* (guarú) (MANRIQUE, 2009) e degeneração da notocorda do peixe *Danio rerio* (paulistinha) (STEHR *et al.*, 2006). É possível que este produto possa afetar negativamente os ecossistemas do solo (CHAGNON *et al.*, 2015). O fipronil foi pouco tóxico para os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (BOTELHO e MONTEIRO, 2011). Entretanto, o fipronil não reduziu a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* crescendo em meio de cultura (FERNANDES *et al.*, 2013).

Alguns micro-organismos como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus firmus* e *Bacillus thuringiensis*, *Paracoccus* sp. (KUMAR *et al.*, 2012; MANDAL *et al.* 2013 e 2014; UNİYAL *et al.*, 2016) e anelidass (*Eisenia fetida*) (QU *et al.*, 2014) podem degradar o fipronil.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foram avaliar a tolerância de isolados de *Pisolithus* sp. aos cupinícidass fipronil, imidacloprid e thiamethoxam.

2.1 Objetivos específicos

- Selecionar isolados de fungos ectomicorrízicos tolerantes aos cupinícidass;
- Avaliar a toxicidade dos cupinícidass a isolados de *Pisolithus* sp. pré-selecionados pela capacidade de promover a sobrevivência e, ou crescimento de mudas clonais de eucalipto ou de tolerarem herbicidas através de ensaios *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados C9C, C13, C16, D5, D10, D15, D29, D87, D95 e D216 de *Pisolithus* sp. pertencem a coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFVJM e foram obtidos de frutificações colhidas em plantações de *Eucalyptus* sp. no Alto Jequitinhonha-MG.

A partir de culturas dos isolados crescidas por 29 dias à 25°C em meio de cultura sólido Melin-Norkrans modificado (MNM) (MARX, 1969) foram retirados discos de 5 mm de diâmetro das bordas das colônias de cada isolado. Em seguida, transferiram-se os discos para placas de Petri contendo o mesmo meio e estes foram incubados por mais três dias sob as mesmas condições para permitir a recuperação do micélio danificado durante a repicagem. Este procedimento inicial foi realizado em todos os ensaios e permitiu confirmar a viabilidade e

comprovar a ausência de contaminações.

3.2 Cupinidas

Os princípios ativos que foram utilizados neste trabalho foram o thiamethoxam, imidacloprid (Evidence[®] 700 wg) e o fipronil (Tuit[®] Florestal). Estes são os únicos princípios ativos registrados atualmente para a cultura o eucalipto no Brasil (AGROFIT, 2014). Os produtos utilizados possuem classificação ambiental, toxicológica e fabricantes diferentes.

Tabela 1. Informações e características dos cupinidas.

Informações/características	Princípio ativo		
	Thiamethoxam	Imidacloprid	Fipronil
Nome comercial	Actara 250 wg	Evidence 700 wg	Tuit Florestal
Fabricante	Syngenta	Bayer	BASF S.A.
Dose comercial	300 g 100L ⁻¹ de água	750 g 100 L ⁻¹ de água	750 g 100 L ⁻¹ de água
Classificação ambiental ¹	III	III	III
Classificação toxicológica	III	IV	II

3.3 Crescimento de fungos ectomicorrízicos em em meio de cultura sólido após a pré-imersão do micélio em soluções de cupinidas

Para cada princípio ativo foi feito um ensaio independente em delineamento inteiramente ao acaso e cada ensaio foi composto por um esquema fatorial 10 x 4 com 8 repetições e, sendo que os discos pré-crescidos de dez isolados de *Pisolithus*, foram pré-imersos em soluções de cupinidas, nas concentrações recomendadas pelo fabricante de cada princípio ativo, por 0, 30, 60 e 120 segundos (s). O tempo de 30 s é o tempo de imersão das raízes das mudas utilizados pelas empresas florestais. Após serem pré-imersos, os discos de meio de cultura contendo o micélio dos isolados foram crescidos em 20 mL de meio de cultura MNM sólido em placas de Petri 100 mm e incubados à 25°C por 10 dias. Ao final deste período, o diâmetro das colônias (DC) dos isolados foi medido e o Índice de tolerância (IT%) calculado pela fórmula: $IT\% = (DC_{imerso} * 100) / DC_{n\grave{a}o-imerso}$, em que DC_{imerso} = diâmetro das colônias dos isolados em que o disco com meio de cultura e micélio foi pré-imerso em solução de cupinida e $DC_{n\grave{a}o-imerso}$ = diâmetro das colônias dos isolados em que o disco com meio de cultura e micélio não foi pré-imerso em soluções de cupinidas (Controle - tempo zero de imersão). Após análise de variância, os IT% foram avaliados pelo teste de Tukey para os tempos de pré-imersão e teste de Skott Knott para os isolados ao nível de significância de 5%. Quando a interação ou apenas o efeito dos tempos de pré-imersão foram significativos pelo teste F foram estabelecidas regressões. A partir das equações de regressão foram calculados a $CI_{50\%}$, que é a concentração não-letal que reduziu o crescimento dos isolados em 50%.

3.4 Efeito da adição de cupinícidias ao meio de crescimento de fungos ectomicorrízicos MNM sólido.

Para cada princípio ativo (thiamethoxam, imidacloprid e fipronil) foi feito um ensaio e cada ensaio foi composto por um esquema fatorial 3 x 4, sendo os isolados D5, D10 e D216 de *Pisolithus* e quatro concentrações dos cupinícidias. Esses isolados foram escolhidos a partir de experimentos anteriores, desenvolvidos pelo Laboratório de Microbiologia no Solo – UFVJM. A escolha foi baseada na eficiência de colonização, por apresentarem bom crescimento *in vitro* e em promover benefícios como aumento na absorção de nutrientes, aumento da sobrevivência das mudas de eucalipto e maior tolerância a agroquímicos (ANTUNES *et al.*, 2015; AVELAR, 2016; CARNEIRO, 2016; FONSECA, 2013). As concentrações dos princípios ativos dos cupinícidias avaliados foram 0 (controle), 0,4; 0,8 e 1,6 g L⁻¹ para o thiamethoxam, 0 (controle); 3; 6 e 12 g L⁻¹ para o imidacloprid e 0 (controle); 3; 6 e 12 g L⁻¹ para o fipronil. Essas concentrações foram obtidas a partir da concentração recomendada pelos fabricantes para a solução de imersão das mudas. Estas concentrações foram obtidas através concentração comercial de cada produto (0,8 g L⁻¹ para o thiamethoxam e 6 g L⁻¹ para o imidacloprid e fipronil), sendo a metade da concentração comercial e o dobro da mesma g L⁻¹. Cada tratamento teve 8 repetições e os ensaios foram dispostos em delineamento inteiramente ao acaso.

O meio de cultura MNM foi esterilizado em autoclave à um atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. Após resfriamento até 45°C em banho-maria recebeu alíquotas dos cupinícidias para as diferentes concentrações utilizadas. Em seguida, foram vertidos 20 mL deste meio em placas de Petri e após solidificação, um disco de cinco 5 mm de diâmetro, contendo micélio previamente crescido por três dias, foi colocado no centro de cada placa com o micélio voltado para cima e incubado nas mesmas condições descritas acima por 20 dias. Ao final deste período, o crescimento radial das colônias dos isolados foi avaliado pela média de dois diâmetros da colônia, obtidos em duas direções e medidos com uma régua.

Os ensaios foram analisados independentemente. O IT% foi calculado pela fórmula: $IT\% = (DC_{cupinícida} * 100) / DC_{sem\ cupinícida}$, em que $DC_{cupinícida}$ = diâmetro das colônias dos isolados em que o disco com o micélio foi colocado em meio de cultura com adição de cupinícida e $DC_{sem\ cupinícida}$ = diâmetro das colônias dos isolados em que o disco com meio micélio foi colocado em meio de cultura sem adição de cupinícida e com água destilada e esterilizada (Controle – meio sem cupinícida). Após análise de variância, os IT% foram avaliados pelo teste de Tukey à 5%. Quando a interação ou apenas o efeito dos tempos das concentrações foram significativos pelo teste F, foram estabelecidas regressões.

4 RESULTADOS

4.1 Crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido após a pré-imersão do micélio em soluções de cupinícidas

O crescimento dos isolados de *Pisolithus* sp. em meio de cultura sólido, após a imersão do micélio em solução dos cupinícidas thiamethoxam, imidacloprid e fipronil, foi dependente da interação isolado *versus* tempo de imersão ($p > 0,05$).

O diâmetro das colônias dos isolados de *Pisolithus* sp. sem a imersão em solução com cupinícida foi: C16 = 27,0 mm; D95 = 25,0 mm; D15 = 23,5 mm; D216 = 21,3 mm; D29 = 21,1 mm; C13 = 21,1 mm; D87 = 20,8 mm; D5 = 20,2 mm; C9C = 18,7 mm e D10 = 14,1.

4.1.1 Thiamethoxam

O C9C foi o isolado mais tolerante ao thiamethoxam, em que a pré-imersão na solução deste cupinícida por até 63 s (tempo calculado através das equações de regressão) estimulou em até 12,7% seu crescimento (Figura 1a). O crescimento do D29 foi pouco influenciado, sendo que a pré-imersão do micélio na solução deste cupinícida teve diminuição do crescimento mais acentuado a partir de 60 s sendo a redução de 18,6% com a imersão de 120 s. O IT% dos isolados D5, C16, D87 e D216 teve comportamento semelhante com o aumento do tempo de pré-imersão e, também, indicou uma pequena redução do crescimento sendo em média de 9,2% no maior tempo de exposição ao cupinícida. Para o isolado D10 a pré-imersão reduziu acentuadamente seu crescimento chegando a 50,1% no maior tempo. Já o isolado D95 não teve ajuste, mas seu crescimento foi pouco influenciado pela pré-imersão no thiamethoxam, sendo que a maior redução foi de 4%, observada no tempo de 30 s. A maior inibição observada para o isolado C13 foi com a imersão do micélio por 60 s, sendo esta de 44,5%. A ordem de tolerância dos isolados submetidos à pré-imersão no tempo de 60 s foi: C9C = 110% > D95 = 101% > D29 = 102% > D216 = 93% > D15 = 92% > C16 = 92% > D5 = 92% > D87 = 85% > D10 = 69% > C13 = 50%.

4.1.2 Imidacloprid

O D15 foi o isolado mais tolerante ao imidacloprid, em que a pré-imersão na solução deste cupinícida por até 31,5 s (calculada a partir das equações de regressão) aumentou em até 26,8% seu crescimento (Figura 1b). O crescimento do isolado C9C foi pouco influenciado, sendo que a redução da pré-imersão do micélio na solução do imidacloprid foi maior no tempo de 120 s, sendo de 10%. Os isolados C16, D29 e D95 foram os mais sensíveis ao cupinícida imidacloprid com o aumento do tempo de pré-imersão em que a redução do crescimento foi em média de 83,5% no maior tempo de exposição ao cupinícida. Para o crescimento do isolado D216, a pré-imersão do micélio na solução do imidacloprid causou

diminuição do crescimento mais acentuado no tempo de 46 s sendo a redução de 66,1% e de 41,7% com a imersão no tempo de 120 s. Para o isolado C13, a pré-imersão reduziu seu crescimento em até 32,1% e para o D87 a redução foi de 47,3%, no maior tempo. Para o isolado D10 a pré-imersão do micélio na solução do imidacloprid causou diminuição do crescimento mais acentuado no tempo de 70,3 s e no tempo de 120 s foi observada redução do crescimento de 15,2%. Para o isolado D5 não houve ajuste, e a redução do crescimento no maior tempo de imersão foi de apenas 4,3%. A ordem de tolerância dos isolados submetidos à pré-imersão no tempo de 60 s foi: D15 = 113% > C13 = 91% > C9C = 91% > D5 = 69% > D87 = 67% > D10 = 62% > D216 = 39% > D29 = 24% > D95 = 23% > C16 = 21%.

4.1.3 Fipronil

O D10 foi o isolado mais tolerante ao fipronil, em que a pré-imersão na solução deste cupinicida por até 38,8 s aumentou em até 10,3% seu crescimento (Figura 1c). O crescimento do isolado D29 foi pouco influenciado, sendo que a redução do crescimento devido a pré-imersão do micélio na solução do imidacloprid foi mais acentuada a partir de 60 s e atingiu uma redução de 22% no tempo de 120 s. O IT% dos isolados C16, D15 e D216 reduziu de forma semelhante com o aumento do tempo de pré-imersão, sendo em média de 31,7% no maior tempo de exposição ao cupinicida. Para os isolados C9C, C13, C16 e D10, a redução do crescimento no tempo de 120 s, foi, em média, de 30,4 %. A maior inibição do crescimento observada para o D5 foi com a pré-imersão do micélio por 65,5 s, sendo esta inibição de 20,6%. Para o D29 a maior inibição do crescimento ocorreu com a pré-imersão do micélio por 59,4 s, sendo esta inibição de 41,8%. A pré-imersão do micélio na solução do fipronil causou diminuição do crescimento mais acentuado no tempo de 71,5 s sendo de 23,7% com a imersão no tempo de 120 s. O D87 foi pouco influenciado, sendo que a redução do crescimento foi de apenas 6,2% na pré-imersão do micélio por 120 s. Para o D95 a maior redução do crescimento foi no tempo de pré-imersão de 72,7 s, sendo esta redução de 33,4%. O isolado mais sensível ao a pré-imersão do micélio no cupinicida fipronil foi o C13 que teve seu crescimento reduzido em 44,6% no maior tempo de pré-imersão. A ordem de tolerância dos isolados submetidos à pré-imersão no tempo de 60 s foi: D10 = 102% > D87 = 94% > D216 = 82% > D5 = 79% > D15 = 76% > C16 = 67% > D95 = 63% > D29 = 62% > C13 = 58% > C9C = 44%.

4.2 Efeito da adição de cupinicidas ao meio de crescimento de fungos ectomicorrízicos em MNM sólido

O crescimento de *Pisolithus* sp. em meio de cultura sólido, com adição dos cupinicidas thiamethoxam, imidacloprid e fipronil, variou em função do isolado e da

concentração destes cupinídeos ($p > 0,05$), mas para todos cupinídeos houve redução a partir da menor concentração.

O crescimento médio dos isolados de *Pisolithus* sp., sem a adição dos cupinídeos no meio de cultura, em ordem decrescente foi, em mm: D10 = 33,3; D216 = 32,0 e D5 = 31,5.

4.2.1 Thiamethoxam

O diâmetro de colônias dos três isolados reduziu linearmente com o aumento da concentração de thiamethoxam no meio de cultura (Figura 2a). O crescimento do isolado D10 reduziu em 13,5% na concentração de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ e em 62,2% na maior concentração com $1,6 \text{ g L}^{-1}$ de thiamethoxam. Para o isolado D5 esta redução foi de 15,9 % na concentração de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ e de 59,9% na maior concentração com $1,6 \text{ g L}^{-1}$ deste cupinídeo. O crescimento do isolado D216 reduziu em 22,3% na concentração de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ e em 66% na maior concentração. A concentração em que o IT% foi de 50% ($CI_{50\%}$) foi $1,34 \text{ g L}^{-1}$ para o D5; $1,3 \text{ g L}^{-1}$ para o D10 e $1,15 \text{ g L}^{-1}$ para o D216. A ordem de tolerância dos isolados na concentração de $1,6 \text{ g L}^{-1}$ foi: D216 = 41% > D5 = 39,1% > D10 = 34,6% e na concentração comercial de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ foi: D10 = 78% > D5 = 74% > D216 = 50%.

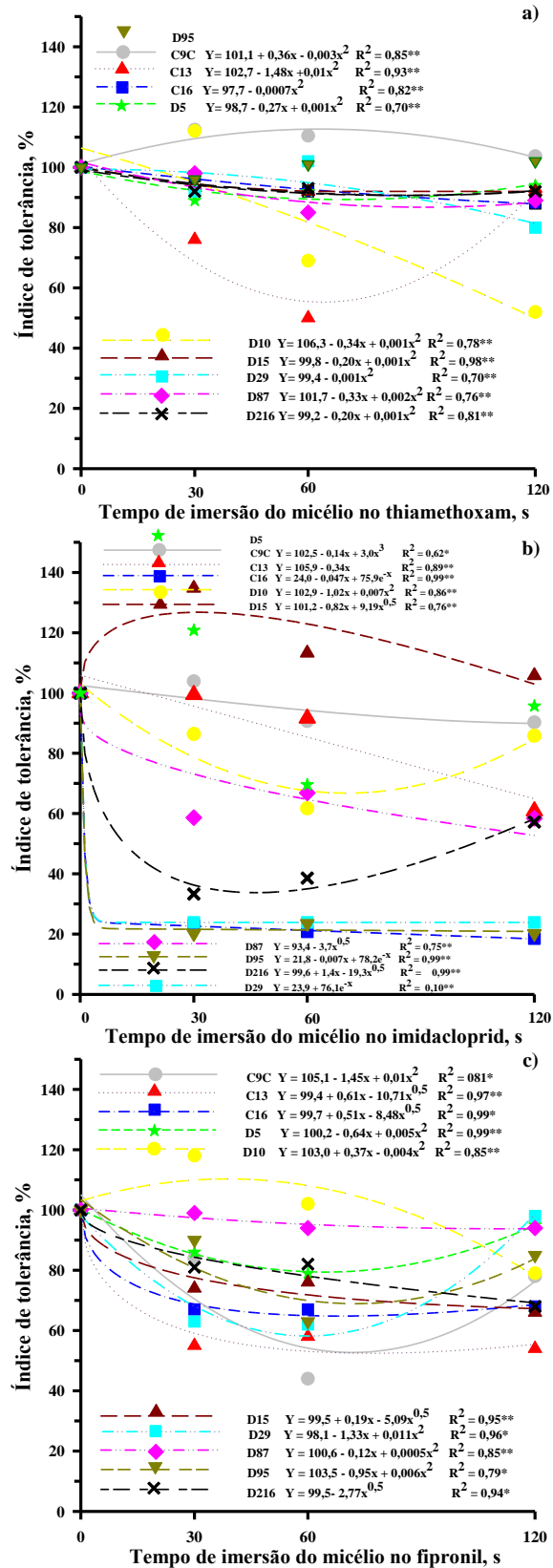


Figura 1. Índice de tolerância (IT %) dos diâmetros das colônias crescidas por 10 dias em meio sólido submetidas a imersão no cupinícidas thiamethoxam (a), imidacloprid (b) e fipronil (c) por diferentes tempos. O IT% é calculado pela fórmula: $IT\% = (DC_{imerso} * 100) / DC_{n\tilde{a}o-imerso}$, em que DC_{imerso} = diâmetro das colônias dos isolados em que o disco com meio de cultura e micélio foi pré-imerso em solução de cupinícida e $DC_{n\tilde{a}o-imerso}$ = diâmetro das colônias dos isolados em que o disco com meio de cultura e micélio não foi pré-imerso em solução de cupinícida (Controle - tempo zero de imersão).

4.2.2 Imidacloprid

O diâmetro de colônias dos isolados D5 e D216 reduziu linearmente com o aumento da concentração do imidacloprid no meio de cultura (Figura 2b). O D10 reduziu o crescimento em 51% já na concentração de 3 g L⁻¹ e de 64% na maior concentração (12 g L⁻¹). O crescimento do isolado D5 reduziu em 40,7% na concentração e uma redução muito expressiva de 74,4% na maior concentração (Figura 2b). O crescimento do isolado D216 reduziu em 15,4% na concentração de 3 g L⁻¹ e em 67,2% na maior concentração de 12 g L⁻¹. A CI_{50%} foi de 6,66 g L⁻¹ para o D5; de 6,52 g L⁻¹ para o D10 e de 9,80 g L⁻¹ para o D216. A ordem de tolerância dos isolados na maior concentração foi: D10 = 36% > D216 = 32% > D5 = 25% e na concentração comercial de 6 g L⁻¹ foi: D216 = 82% > D10 = 59% > D5 = 51%.

4.2.3 Fipronil

O diâmetro de colônias dos três isolados reduziu exponencialmente com o aumento da concentração de fipronil no meio de cultura (Figura 2c). O crescimento do isolado D10 reduziu em 83% na concentração de 3 g L⁻¹ e na maior concentração de 12 g L⁻¹ reduziu 83,4%. O crescimento do isolado D5 reduziu em 74,9% já na concentração de 3 g L⁻¹ e em 84,8% na maior concentração. O crescimento do isolado D216 reduziu 73,1% na concentração de 3 g L⁻¹ e em 81,6% na maior concentração de 12 g L⁻¹ (Figura 2c). A CI_{50%} foi de 0,96 g L⁻¹ para o D5; de 0,84 g L⁻¹ para o D10 e de 1,09 g L⁻¹ para o D216. A ordem de tolerância dos isolados na maior concentração foi: D216 = 17% > D10 = 16% > D5 = 16% e na concentração comercial de 6 g L⁻¹ foi: D216 = 26% > D5 = 17% > D10 = 16%.

5 DISCUSSÃO

A tolerância de isolados de *Pisolithus* sp. aos cupinídeos foi dependente do isolado e do princípio ativo do cupinídeo, da concentração e do tempo de exposição (Figura 1 e 2). A tolerância diferenciada entre os isolados de FEM a metais pesados (GRAZZIOTTI *et al.*, 2001), herbicidas (ANTUNES *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2013) e fungicida (MARX e ROWAN, 1981; SANTOS, *et al.*, 1984) também foi demonstrada. Fungos entomopatogênicos também possuem tolerância variável aos cupinídeos thiamethoxam, imidacloprid e fipronil (SOARES, 2011). Os isolados mais tolerantes a pré-imersão do micélio nos cupinídeos foram o C9C para o thiamethoxam, o D15 para o imidacloprid e o D10 para o fipronil (Figura 1). Estes isolados tiveram o crescimento estimulado em até 12,3% para o C9C, 26,8% para D15 e de 10,3% para o D10 nos tempos iniciais da pré-imersão.

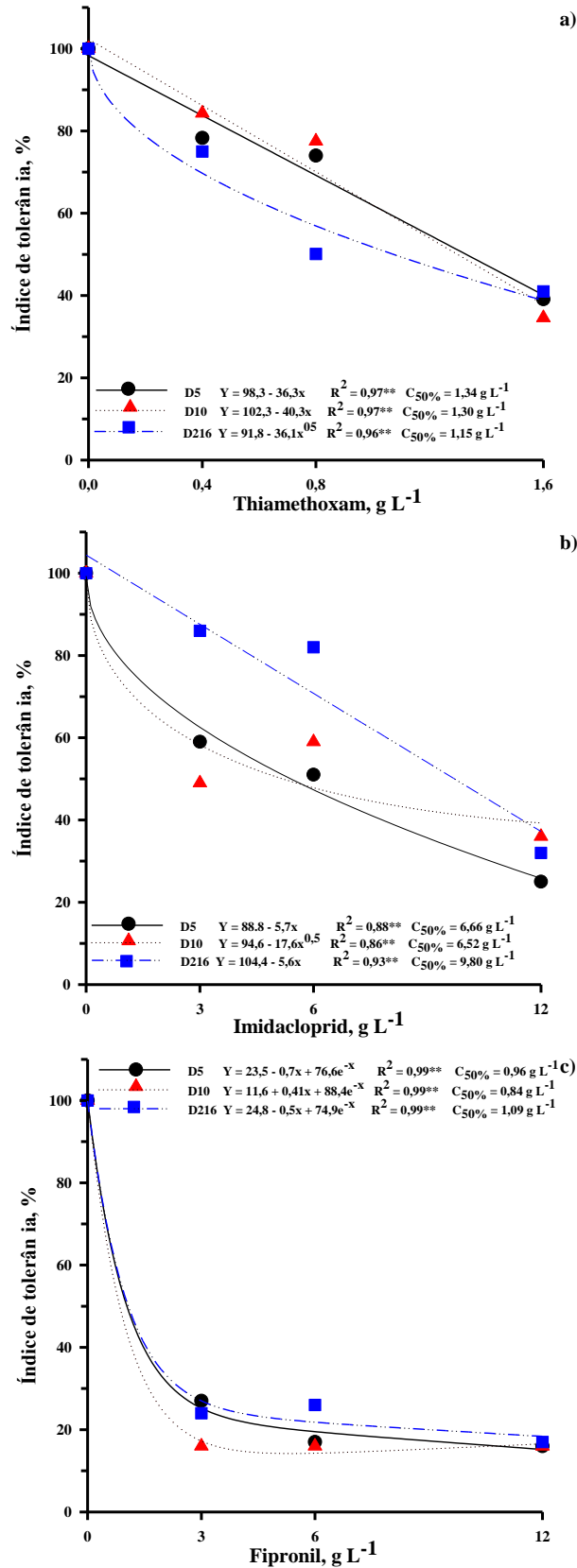


Figura 2 Índice de tolerância (IT %) dos diâmetros das colônias crescidas por 20 dias em meio sólido submetidas a diferentes concentrações dos cupinícidias thiamethoxam (a), imidacloprid (b) e fipronil (c). O IT% foi calculado pela fórmula: $IT\% = (DC_{\text{cupinícidia}} * 100) / DC_{\text{sem cupinícidia}}$, em que $DC_{\text{cupinícidia}}$ = diâmetro das colônias dos isolados em que o disco com o micélio foi colocado em meio de cultura com adição de cupinícidia e $DC_{\text{sem cupinícidia}}$ = diâmetro das colônias dos isolados em que o disco com meio micélio foi colocado em meio de cultura sem adição de cupinícidia e com água destilada e esterilizada (Controle – meio sem cupinícidia).

A capacidade de alguns isolados de FEM de degradarem agroquímicos é conhecida, como demonstrado para 2,4-D (MEHARG *et al.*, 1997; MEHARG e CAIRNEY, 2000) e DDT (HUANG *et al.*, 2007). Outros trabalhos mostram a capacidade das bactérias *Pseudomonas* sp. e a rizobactéria *Ensifer adhaerens* (PANDEY, *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2013) de degradar o thiametoxam no solo, assim como micro-organismos nativos que podem degradar o imidacloprid e usá-lo como fonte de carbono para obter energia (CYCON *et al.*, 2013). O fipronil, também, pode ser degradado por alguns micro-organismos como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus firmus*, *Bacillus thuringiensis* e *Paracoccus* sp. (MANDAL *et al.* 2013 e 2014; UNİYAL *et al.*, 2016; KUMAR *et al.* 2012) e por minhocas (*Eisenia fetida*) (QU *et al.*, 2014). O estímulo no crescimento dos isolados ectomicorrízicos C9C, D15 e D10, após a pré-imersão em soluções dos cupinídeos, não pode ser explicado pelo uso desses produtos como fonte de nutrientes e energia como proposto na literatura para micro-organismos do solo (CHILDS, 2007), pois o micélio foi apenas imerso e depois colocado para crescer em meio de cultura sem os cupinídeos.

A tolerância destes isolados aos cupinídeos pode ocorrer por mecanismos como os propostos para metais pesados em fungos ectomicorrízicos, que incluem processos de precipitação extracelular, biossorção da parede celular por meio de troca iônica, adsorção, complexação e processos internos nas células dos fungos, onde os metais podem ser complexados, compartimentalizados ou volatilizados (GADD, 1993, GRAZZIOTTI *et al.*, 2003).

O maior crescimento dos isolados C9C, D15 e D10, após pré-imersão nas soluções de cupinídeos é importante, pois indica que a imersão das mudas em soluções de cupinídeos poderá não influenciar a simbiose, e, assim, estes isolados podem permanecer nas raízes das plantas após o tratamento. Desta forma, os FEM destinados a programas de inoculação de plantas devem, além de promover benefícios estas, ser tolerantes aos produtos utilizados na produção de mudas necessários para a obtenção da qualidade das mesmas, e que eventualmente podem ser tóxicos. Estes isolados de FEM poderão ser mais eficientes em promover a colonização destas mudas e, conseqüentemente, trazer benefícios, como maior sobrevivência no campo e maior absorção de nutrientes. Sabe-se que, em simbiose, a atividade enzimática extracelular do fungo aumenta expressivamente em relação ao crescimento em cultura pura (ANTUNES *et al.*, 2015). Portanto, a capacidade de degradação do cupinídeo pelo fungo pode

ser potencializada quando em simbiose com a planta pelo aumento da biomassa e da atividade enzimática.

Nos experimentos em que o micélio dos isolados foi pré-imerso nas soluções dos cupinicidas, o thiamethoxam foi o menos tóxico para a maioria dos isolados, seguido do imidacloprid e do fipronil (Figura 1). A menor toxicidade do thiamethoxam em relação ao imidacloprid diverge da classificação toxicológica proposta para esses cupinicidas, pois o thiamethoxam é considerado perigoso ao meio ambiente (III), assim como o imidacloprid e o fipronil (AGROFIT, 2016). O imidacloprid foi o cupinicida que provocou maior variação no crescimento entre os isolados de FEM (Figura 1) e além de promover o crescimento do D15 foi intermediariamente tóxico para os isolados C13, C9C, D10 e D87 (Figura 1b). O imidacloprid estimulou o crescimento dos isolados C9C, D5, D10 e D29 (figura 1c) e reduziu o crescimento dos isolados C16, D10, D15 e D216 no maior tempo. Esta redução foi em média 73,5% maior do que aquela promovida pelo thiamethoxam e 12,7% menor que a promovida pelo imidacloprid, para estes mesmos isolados.

O crescimento dos isolados de *Pisolithus* sp. reduziu mais acentuadamente quando os cupinicidas foram adicionados ao meio de cultura do que quando o micélio dos isolados foi pré-imerso em soluções dos cupinicidas (Figura 1 e 2). Todos os isolados foram sensíveis aos cupinicidas (Figura 2). Para o thiamethoxam os isolados menos sensíveis foram os D5 e D10 e o D216 o mais sensível. Para os D5 e D10 o crescimento reduziu linearmente e para o D216 a redução do crescimento apresentou redução raiz quadrada. Esta maior sensibilidade do D216 também pode ser observada pela menor concentração necessária para reduzir o crescimento em 50 % ($CI_{50\%}$) (o $CI_{50\%}$ para o D5 foi $1,34 \text{ g L}^{-1}$, para o D10 foi $1,30 \text{ g L}^{-1}$ e para o D216 foi $1,15 \text{ g L}^{-1}$). Porém, podemos observar que para os três isolados o $CI_{50\%}$ foi maior que a concentração recomendada para solução de trabalho ($0,8 \text{ g L}^{-1}$), sendo 65,5% maior para o D5. Para o imidacloprid o isolado menos sensível foi o D216 e os mais sensíveis foram os D5 e D10 ($CI_{50\%}$ para o D216 foi $9,80 \text{ g L}^{-1}$, para o D5 foi $6,66 \text{ g L}^{-1}$ e para o D10 foi $6,52 \text{ g L}^{-1}$). Para o D216 a $CI_{50\%}$ foi 63,3 % maior que a concentração de trabalho deste cupinicida (6 g L^{-1}), mas para os outros dois isolados a $CI_{50\%}$ foi próxima da concentração da solução recomendada. Para o fipronil três isolados foram muito sensíveis, em que o crescimento foi inibido exponencialmente e a $CI_{50\%}$ foi em média 81,8 % menor do que a concentração da solução de trabalho (6 g L^{-1}) ($CI_{50\%}$ para o D5 foi $0,96 \text{ g L}^{-1}$, para o D10 foi $0,84 \text{ g L}^{-1}$ e para o D216 foi de $1,09 \text{ g L}^{-1}$).

É recomendado, pelos fabricantes, que as mudas de eucalipto sejam imersas em soluções de cupinicidas por 30 s. No entanto, é necessário que durante o tratamento das mudas

haja controle deste tempo de imersão, pois quando estes isolados ficam expostos ao produto por mais tempo todos os três princípios ativos foram extremamente tóxicos (Figura 2).

O menor efeito do thiamethoxam sobre o crescimento dos FEM nos dois grupos de experimentos indicam que os cupinícidas a base desse produto sejam os mais recomendados para o tratamento de mudas de eucalipto inoculadas com fungos ectomicorrízicos. No entanto, faz-se necessário avaliar a toxicidade deste cupinícida ao isolado de FEM selecionado. Pois, como demonstrado para o isolado C13, este produto também pode reduzir o crescimento mesmo quando apenas o micélio foi pré-imerso por 30 s (Figura 1). O alto custo desses cupinícidas, além das aplicações preventivas, feitas muitas vezes de forma indiscriminada, aumenta os custos de produção e os riscos para o meio ambiente (VALÉRIO *et al.*, 2004). Entretanto, na falta de controle dos cupins, pode acarretar em prejuízos econômicos, causando redução de 48 m³ ha⁻¹ ou 267 árvores por hectare de madeira em florestas de *Eucalyptus grandis* quando há mortalidade de 20% no plantio (WILCKEN *et al.*, 2002), e conseqüentemente gera uma perda de até US\$635,00 por hectare, na colheita. Os outros cupinícidas também podem ser utilizados, porém demonstram maior potencial de reduzir o crescimento dos FEM, havendo, da mesma forma, a necessidade de avaliar o efeito destes produtos sobre o isolado selecionado. Porém, quanto maior é o efeito tóxico do cupinícida maior a probabilidade de influenciar a comunidade de FEM nativos. O imidacloprid aplicado a uma dosagem elevada pode induzir mudanças nas comunidades microbianas e em suas atividades metabólicas e bioquímicas no solo (CYCON *et al.*, 2013).

A inibição do crescimento dos FEM, causada pelos cupinícidas, demonstra a importância de selecionar fungos promissores e tolerantes aos inseticidas nos programas de inoculação em larga escala no setor florestal e a revisão de todos os procedimentos de produção de mudas de eucalipto quando se deseja a produção de mudas micorrizadas. Assim, futuros estudos são necessários para avaliar o efeito dos cupinícidas sobre a simbiose envolvendo os FEM e sobre os benefícios desta para as plantas e os fatores ambientais que afetam a degradação.

É relevante ressaltar que testes *in vitro* mantêm os micro-organismos expostos ao máximo ao inseticida, o que não ocorre em condições de campo, já que podem ocorrer fatores externos que agem sobre o produto, principalmente radiação solar, deriva e ventos, amenizando a ação do princípio ativo (CAVALCANTI *et al.*, 2002). Assim, outros estudos devem avaliar o efeito dos cupinícidas sobre a associação fungo-planta e os benefícios da associação.

O thiamethoxam, imidacloprid e fipronil podem influenciar o ecossistema, pois, interferiram no crescimento dos fungos ectomicorrízicos e podem promover a seleção destes fungos simbiotes. Para a maioria dos isolados a imersão por 60 s na solução dos cupinícidias foi suficiente para reduzir o crescimento e este tempo pode ser considerado mais próximo do que de fato acontece quando as mudas são mergulhadas por 30 s na solução dos cupinícidias, pois ao serem retiradas o substrato sai da solução embebido na mesma e até que esta escorra o tempo de efeito do cupinícida provavelmente é maior que os 30 s de imersão.

Existem poucas informações sobre o impacto do thiamethoxam, imidacloprid e fipronil sobre a atividade e a estrutura das comunidades microbianas do solo, especialmente sobre os fungos ectomicorrízicos, além de trabalhos que avaliem o efeito dos cupinícidias na simbiose e sobre os benefícios desta. Mas, devido a importância dos FEM para uma silvicultura mais sustentável é necessário mais estudos *in vitro* e no campo para que o efeito destes produtos sobre os FEM possam ser melhor compreendidos e assim, se possam propor um tratamento que seja eficiente no controle de cupins mas que não prejudique a simbiose entre os FEM e plantas de eucalipto.

6 CONCLUSÕES

O efeito dos cupinícidias sobre fungos ectomicorrízicos foi dependente do isolado, do princípio ativo, do tempo de exposição e da concentração do cupinícida.

Os isolados mais tolerantes a pré-imersão do micélio nos cupinícidias foram o C9C para o thiamethoxam, o D15 para o imidacloprid e o D10 para o fipronil.

Os três cupinícidias foram muito tóxicos aos isolados de *Pisolithus* sp. quando estes foram adicionados ao meio de cultura.

O thiamethoxam foi o menos tóxico para os isolados de *Pisolithus* sp..

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF. Anuário Estatístico da ABRAF: ano base 2012/ABRAF. p. 145, 2013.

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2016.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. **Academic Press**, London, p. 576, 1995.

ALLIEVI, L. *et al.* Influence of the herbicide bentazon on soil microbial community. **Microbiology Research**, v. 151, n. 1, p. 105- 111, 1996.

ALVARENGA, R.M. Reserva legal e mudanças. **Silvicultura**, São Paulo, v.55, p. 40-41, 1994.

ALVES, J.R. *et al.* Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida no crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 307-313, 2001.

AMPOFO, J.A. *et al.* Impact of commonly used agrochemicals on bacterial diversity in cultivated soils. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 223-229, 2009.

ANDALÓ, V. *et al.* Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: *Pseudococcidae*). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 4, p. 463-467, 2004.

ANTUNES, L.A. *et al.* Tolerance of *Pisolithus* sp. Isolates to Glyphosate in Vitro. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 9, n. 33, p. 405-410, 2015.

AVELAR, D.C.S. **Doses de inoculante ectomicorrízico em viveiro comercial de mudas clonais de eucalipto**. 2016, 42p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – UFVJM, Diamantina, MG.

BATISTA FILHO, A. *et al.* Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 437-447, 2001.

BEARE, M.H. *et al.* A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant And Soil**, Dordrech, v. 170, p. 5- 22, 1995.

BODDINGTON, C.L.; DODD, J.C. The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. I. Field studies in an Indonesian Ultisol. **Plant And Soil**, v. 218, n. 1-2, p.137–144, 2000.

BOLDT, T.S.; JACOBSEN, E.C.S. Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 161, n. 1, p. 29–35, 1998.

BONMATIN, J.M. *et al.* Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35-67, 2015.

BOTELHO, A.A.A.; MONTEIRO, A.C. Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p.361-369, 2011.

CARNEIRO, J.P. **Adubação fosfatada para inoculação ectomicorrízica em mudas de eucalipto**. 2016, 64p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – UFVJM, Diamantina, MG.

CARTER, M. R. Influence of reduced tillage systems on organic matter, microbial biomass, macro-aggregate distribution and structural stability of surface soil in a humid climate. **Soil Tillage and Research**, Washington, v. 23, p. 361-372, 1992.

CAVALCANTI, R.S. *et al.* Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 3, p. 17-22, 2002.

CHAGNON, M. *et al.* Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 119-134, 2015.

CHANDLER, G.T. *et al.* Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 117-124, 2004.

CHEN, Y.L. *et al.* Selecting ectomycorrhizal fungi for inoculating plantations in South China: effect of *Scleroderma* on colonization and growth of exotic *Eucalyptus globulus*, *E. urophylla*, *Pinus elliottii*, and *P. radiata*. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, n. 4, p. 251-259, 2006.

CHILDS, G.M.F. **Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado**. Jaboticabal, 2007. 61p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, SP.

CLEGG, C.D. *et al.* Broad-scale analysis of soil microbial community DNA from upland grasslands. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 1, p. 9-14, 1998.

COSTA, L.S. *et al.* Inoculação de micélio vegetativo de fungos ectomicorrízicos impregnados em gel de alginato em viveiro comercial de estacas enraizadas de eucalipto. (No prelo).

CRECCHIO, C. *et al.* Molecular approaches to investigate herbicide-induced bacterial community changes in soil microcosms. **Biology and fertility of soils**, v. 33, n. 6, p. 460-466, 2001.

CYCON, M. *et al.* Imidacloprid induces changes in the structure, genetic diversity and catabolic activity of soil microbial communities. **Journal of Environmental Management**, v. 131, p. 55-65, 2013.

CZEPAK, C. *et al.* Seletividade de inseticidas ao complexo de inimigos naturais na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 2, p. 123-127, 2005.

DA SILVA, G.S. *et al.* Impacto de sulfentrazone, isoxaflutol e oxyfluorfen sobre a microbiota de dois solos florestais. **Solos e Nutrição de Plantas Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 3, p.292-299, 2014

DESNEUX, N. *et al.* The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81-106, 2007.

DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n. 1, p. 3-11, 2000.

DOUROJEAMI, M. O eucalipto não é vilão. **Sociedade Brasileira de Silvicultura**. 2004. Disponível em: <<http://www.sif.com.br>>. Acesso em: 09 de maio. 2016.

EL FANTROUSSI, S. *et al.* Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 3, p. 982-988, 1999.

ENGELLEN, B. *et al.* Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2814-2821, 1998.

ESTOK, D. *et al.* Effects of the herbicides 2, 4-D, glyphosate, hexazinone, and triclopyr on the growth of three species of ectomycorrhizal fungi. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 42, n. 6, p. 835-839, 1989.

FARIA, A.B.C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência**, 2009.

FERNANDES, M. *et al.* Crescimento e fixação biológica de nitrogênio de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-Açúcar. **Revista de Ciências Agrárias/Amazônica Journal of Environmental Sciences**, 2013.

FERNANDES, M.C.S. *et al.* *Pisolithus* sp. tolerance to glyphosate and isoxaflutole in vitro. **Revista Árvore**, v. 38, n. 3, p. 461-468, 2014.

FERNANDES, M.F. *et al.* Efeitos de Inseticidas Utilizados na Cultura da Cana-de-Açúcar sobre o Crescimento da Bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*. In: **XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 2012

FONSECA, A.J. **Seleção de isolados de Pisolithus para mudas clonais de eucalipto em viveiro comercial**. 2013, 106p. . Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – UFVJM, Diamantina, MG.

GADD, G.M. Interactions of fungip with toxic metals. **New Phytologist**, v. 124, n. 1, p. 25-60, 1993.

GANDINI, A.M.M. *et al.* Growth and nutrition of eucalypt rooted cuttings promoted by ectomycorrhizal fungi in commercial nurseries. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 1554-1565, 2015.

GARBAYE, J. Utilisation des mycorhizes em sylviculture. In: STRULLU, D. G. (Ed.). **Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées**, p.197-250, 1990.

GAZZONI, D.L. *et al.* Tiametoxam: uma revolução na agricultura brasileira. **Vozes**, São Paulo, 2008.

GE, W. *et al.* Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1856-1862, 2015.

GILLER, K.E. *et al.* Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, p. 3-16, 1997.

GIRVAN, M.S. *et al.* Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2692-2701, 2004.

GLOWA, K.R. *et al.* Extraction of potassium and/or magnesium from selected soil minerals by *Piloderma*. **Geomicrobiology Journal**, v. 20, n. 2, p. 99-111, 2003.

GORLACH-LIRA, K. *et al.* The response of forest soil microflora to the herbicide formulations Fusilade and Roundup. **Microbiological research**, v. 152, n. 4, p. 319-329, 1997.

GOMES, A.L. **Seleção de fungos ectomicorrízicos em viveiro comercial de mudas de eucalipto**. 2016, 34p.. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – UFVJM, Diamantina, MG.

GÓMEZ, M.F. *et al.* Impact of imidacloprid residues on the development of *Eisenia fetida* during vermicomposting of greenhouse plant waste. **Journal of hazardous materials**, v. 192, n. 3, p. 1886-1889, 2011.

GOÑALONS, C.M. *et al.* Effects of Sublethal Doses of Imidacloprid on Young Adult *Honeybee* behaviour. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0140814, 2015.

GRAFTON-CARDWELL, E.E. *et al.* Role of imidacloprid in integrated pest management of *California citrus*. **Journal of economic entomology**, v. 101, n. 2, p. 451-460, 2008.

GRAZZIOTTI, P. H. *et al.* Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 25, n. 4, p. 839-848, 2001.

GRAZZIOTTI, P.H. *et al.* Espécies arbóreas e ectomicorrizas em relação ao excesso de metais pesados. **Tópicos Ciências do Solo**, Viçosa: SBCS, v.3, p.55-105, 2003.

HANEY, R.L. *et al.* Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. **Weed Science**, v. 48, n. 1, p. 89-93, 2000.

HUANG, J. *et al.* Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**, v. 18, n. 10, p. 105104, 2007.

IBÁ. Indústria Brasileira de Árvores. **Indicadores de desempenho do setor nacional de árvores plantadas referentes ao ano de 2013**.p.94, 2014

JEMEC, A. *et al.* Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 68, n. 8, p. 1408-1418, 2007.

KELLEY, W.D.; SOUTH, D.B. In vitro effects of selected herbicides on growth and mycorrhizal fungi. **Weed Science Society of America Meeting**. Auburn, Alabama. p. 38, 1978.

KILLHAM, K. Soil ecology. **Cambridge University Press**, Cambridge, United Kingdom, 1994.

KINNEY, C. A. *et al.* Laboratory investigations into the effects of the pesticides mancozeb, chlorothalonil, and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.37, p. 837-850, 2005.

KUMAR, R. *et al.* Biodegradation of fipronil by *Paracoccus* sp. in different types of soil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 88, n. 5, p. 781-787, 2012.

LARA, R.I.R. *et al.* Uso de thiamethoxam no controle de *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) biótipo B (Hemiptera, Aleyrodidae) em cultura de jiló (*Solanum gilo*) (Solanaceae), no Município de Ribeirão Preto, SP. **Arquivos do Instituto de Biologia**, p. 83-87, 2001. Disponível em: <http://www.biologico.br/arquivos/v68_2/lara.pdf>. Acesso em: 01/01/2016.

LOUREIRO, E.S. *et al.* Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 2, 2002.

MANDAL, K. *et al.* Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 93, p. 87-92, 2013.

MANDAL, K. *et al.* Bioremediation of fipronil by a *Bacillus firmus* isolate from soil. **Chemosphere**, v. 101, p. 55-60, 2014

MANRIQUE, W.G. **Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do fipronil para o guaru (*Poecilia reticulata*) e Dissipação no ambiente aquático.** 2009. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2009.

MARSH, J. A. P. *et al.* Simultaneous assessment of various responses of the soil microflora to bentazone. **Weed Research**, Oxford, v. 18, p. 293, 1978.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, p. 153-163, 1969.

MARX, D.H.; CORDELL, C.E. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. Biotechnology of fungi for improving plant growth. **Academic Press**, p.1-25, 1989.

MARX, D.H.; ROWAN, S. J. Fungicides influence growth and development of specific ectomycorrhizae on loblolly pine seedlings. **Forest Science**, v. 27, n. 1, p. 167-176, 1981.

MC CAIG, A.E. *et al.* Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1721-1730, 1999.

MEHARG, A. A.; DENNIS, G. R.; CAIMEY, J. W. G. Biotransformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) by ectomycorrhizal basidiomycetes. **Chemosphere**, v. 35, n. 3, p. 513-521, 1997.

MEHARG, A.A.; CAIRNEY, J.W.G. Ectomycorrhizas - extending the capabilities of rhizosphere remediation? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11, p. 1475-1484, 2000.

- MESQUITA, C.M. **Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos na microbiota do solo. Estudo de caso.** 2005. Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental) - Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2005.
- MILES, I. Imidacloprid: Pesticide Leaching Potential Model. **Report No.**, 1993.
- MOORMAN, J. B. A review of pesticide effects on microorganisms and microbial processes related to soil fertility. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v. 21, p. 14-23, 1989.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Transformações bioquímicas e ciclos dos elementos do solo. Microbiologia e bioquímica do solo.** Editora UFLA, Lavras, 2002.
- NYMAN, A.M. *et al.* The insecticide imidacloprid causes mortality of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* by interfering with feeding behavior. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62472, 2013.
- O'DONNELL, A.G. *et al.* Theoretical and practical aspects of the quantification of biodiversity among microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 345, n. 1311, p. 65-73, 1994.
- PAINNE, T. D. *et al.* Potential risks of systemic imidacloprid to parasitoid natural enemies of a cerambycid attacking *Eucalyptus*. **Biological Control**, v. 56, n. 2, p. 175-178, 2011.
- PANDEY, G. *et al.* Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas* sp. 1G. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 380, n. 3, p. 710-714, 2009.
- PANKHURST, C.E. *et al.* Biological indicators of soil health. **CAB International, Wallingford**, United Kingdom, 1997.
- PILLING, E. *et al.* A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77193, 2013.
- PISA, L. *et al.* Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68-102, 2015.
- PRETTY, Jules N. *et al.* An assessment of the total external costs of UK agriculture. **Agricultural systems**, v. 65, n. 2, p. 113-136, 2000.
- PRETTY, J.N. *et al.* Reducing food poverty by increasing agricultural sustainability in developing countries. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 95, n. 1, p. 217-234, 2003.
- QU, H. *et al.* Enantioselective toxicity, bioaccumulation and degradation of the chiral insecticide fipronil in earthworms (*Eisenia fetida*). **Science of the Total Environment**, v. 485, p. 415-420, 2014
- REBEK, E.J.; SADOFF, C.S. Effects of pesticide applications on the euonymus scale (Homoptera: Diaspididae) and its parasitoid, *Encarsia citrina* (Hymenoptera: Aphelinidae). **Journal of economic entomology**, v. 96, n. 2, p. 446-452, 2003.

RIVERA, D. *et al.* Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 12, n. 1, p. 94-102, 2010.

ROYUELA, M. *et al.* Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. **Pesticide Science**, v. 52, p.372-380, 1998.

SANTOS, M.M. de LS. **Efeito de fungicidas sobre os fungos ectomicorrizicos *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris* e ação sistêmica de Benomyl em mudas de *Pinus caribaea* var. hondurensis.**1984. Tese (Doutorado). ESALQ, Piracicaba, SP.

SAWYER, N.A. *et al.* Utilisation of inorganic and organic phosphorus sources by isolates of *Amanita muscaria* and *Amanita* species native to temperate eastern Australia. **Australian Journal of Botany**, v.51, p.151-158, 2003.

SILVA, J.C. *et al.* Cartilha do fazendeiro florestal. Viçosa, Minas Gerais. Viçosa: UFV, p. 14-15, 2008.

SMITH, S.E.; READ, D.J. Mycorrhizal symbiosis. **Academic Press**, p.605, 1997.

SOARES, F.B. Impacto de fungicidas e inseticidas na densidade populacional de *Beauveria bassiana* no solo sob efeito da microbiota nativa. **UNESP Jaboticabal** ,2011.

SOARES, I. *et al.* Níveis de fósforo na formação de ectomicorrizas em mudas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Campinas, v.14, p.327-332, 1990.

SOUZA, L.A.B.; SILVA FILHO, G.N.; OLIVEIRA, V.L. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, 349-355, 2004.

SOUZA, L.A. *et al.* New isolates of ectomycorrhizal fungi and the growth of eucalypt. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.2, p.235-241, 2008.

SOUZA, V.C. *et al.* Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v.10, n.3, p.612-618, 2006.

STAPEL, J.O. *et al.* Disruptive sublethal effects of insecticides on biological control: altered foraging ability and life span of a parasitoid after feeding on extrafloral nectar of cotton treated with systemic insecticides. **Biological Control**, v. 17, n. 3, p. 243-249, 2000.

STARK, D. J.; VARGAS, I.R. Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.62, p.11-16, 2005.

STEHR, C. M. *et al.* The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. **Toxicological Sciences**, v. 92, n.1, p.270-278, 2006.

TAVARES, D.A. *et al.* In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 135, p. 370-378, 2015.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J.E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, v. 45, p. 247-268, 2005.

TOMLIN, C.D.S. The Pesticide Manual, XIIth edition, a world compendium. **British Crop Protection Council**, UK, 2000.

TUFI, S. *et al.* Metabolomics to explore imidacloprid-induced toxicity in the central nervous system of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Environmental science & technology**, 2015.

UĞURLU, P. *et al.* The toxicological effects of thiamethoxam on *Gammarus kischineffensis* (Schellenberg 1937) (Crustacea: Amphipoda). **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 720-726, 2015.

UNIYAL, S. *et al.* Degradação de fipronil por *Stenotrophomonas acidaminiphila* isolado do solo rizosférico de *Zea mays*. **Biotech**, v. 6, n. 48, 2016. DOI 10.1007/s13205-015-0354-x.

U.S. EPA. Environmental Protection Agency. New Pesticide Fact Sheet. PB96-181516.EPA737-F-96-005. U.S. **EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances**, p.1-10, 1996.

U.S. EPA. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs. **Decision documents for atrazine, 2003.** Available: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/atrazine_combined_docs.pdf. Acessado em 09 de maio de 2016.

VALÉRIO, J.R. *et al.* Cupins em pastagens, cana-de-açúcar e plantações florestais. **Pragas de solo no Brasil. Passo Fundo: Embrapa Agropecuária Oeste**, p. 409-456, 2004.

VANENGELSDORP, D. *et al.* Estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: A report commissioned by the Apiary Inspectors of America. **American Bee Journal**, 2007.

VOMERO, P.A.S.Z. **Efeito da imersão de mudas com fertilizante e Cupinicida no crescimento de dois clones de eucalipto sob duas condições de umidade no substrato.** 2010, 5 p. . Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – UNESP, Butucatu, 2010.

YANG, E.C. *et al.* Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49472, 2012.

WAIWRIGHT, M.A. Review of the effect of pesticides on microbial activity in soil, **Journal Soil Science**, Oxford, v. 29, p. 287-298, 1978.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Relative importance of the effects of 2,4-D, glyphosate and environmental variables on the soil microbial biomass. **Plant And Soil**, Netherlands, v. 134, p. 209-219, 1991.

WILCKEN, C.F. *et al.* Termites in *Eucalyptus* forests of Brazil. **Sociobiology**, v.40, n.1, p.179-190, 2002.

ZHOU, G. *et al.* Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting rhizobacterium *Ensifer adhaerens* strain TMX-23. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 9, p. 4065-4074, 2013.

APÊNDICE A. Quadrado médio e sua significância obtidos na análise de variância dos dados coletados nas avaliações do índice de tolerância (IT %) dos diâmetros das colônias dos isolados de *Pisolithus* sp. submetidos a diferentes tempo de imersão nos cupinícidas Thiamethoxam, Imidacloprid e Fipronil.

	Fonte de variação				Coeficiente de variação, %
	Isolado	Tempo	Isolado X Tempo	Resíduo	
Thiamethoxan	1812,8**	2493,6**	1107,3**	403,3	21,2
Imidacloprid	22411,4**	27529,0**	3340,8**	866,6	40,3
Fipronil	3192,4**	11091,2**	1223,7*	745,0	32,8

* = significativo a 5%, ** = significativo a 1%

APÊNDICE B. Índice de tolerância (IT %) dos diâmetros das colônias crescidas por 10 dias em meio sólido submetidas a imersão no cupinícida thiamethoxam por diferentes tempos. O IT % é calculado pela multiplicação do diâmetro das colônias dos isolados nos diferentes tempos de imersão do cupinícida por cem e dividindo pelo diâmetro da colônia no tempo zero.

Isolado	Tempo				Média	Regressão	R ²
	0	30	60	120			
	10 dias						
C9C	100 aA ⁽¹⁾	112 aA	110 aA	104 aA	107	Y= 101,1 + 0,36x - 0,003x ²	0,85**
D95	100 aA	96 bA	101 aA	102 aA	100	Sem ajuste	
D15	100 aA	94 bA	92 aA	92 aA	95	Y= 99,8 - 0,20x + 0,001x ²	0,98**
D216	100 aA	92 bA	93 aA	92 aA	94	Y= 99,2 - 0,20x + 0,001x ²	0,81**
C16	100 aA	97 bA	92 aA	88 aA	92	Y= 97,7 - 0,0007x ²	0,82**
D29	100 aA	92 bA	103 aA	80 aA	94	Y= 99,4 - 0,001x ²	0,70**
D5	100 aA	89 bA	92 aA	84 aA	94	Y= 98,7 - 0,27x + 0,001x ²	0,70**
D87	100 aA	98 bA	85 aA	89 aA	93	Y= 101,7 - 0,33x + 0,002x ²	0,76**
D10	100 aA	112 aA	69 bB	52 bB	83	Y= 106,3 - 0,34x + 0,001x ²	0,78**
C13	100 aA	76 bA	50 bB	93 aA	80	Y= 102,7 - 1,48x + 0,01x ²	0,93*
Média	100	96	89	89	93		

⁽¹⁾Médias entre tempos de imersão seguidas de letras iguais maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de significância; e as médias entre isolados fúngicos seguidas de letras iguais minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste Skott Knott à 5% de significância. * = significativo a 5%, ** = significativo a 1%

APÊNDICE C. Índice de tolerância (IT %) dos diâmetros das colônias crescidas por 10 dias em meio sólido submetidas a imersão no cupinicida imidacloprid por diferentes tempos. O IT % é calculado pela multiplicação do diâmetro das colônias dos isolados nos diferentes tempos de imersão do cupinicida por cem e dividindo pelo diâmetro da colônia no tempo zero.

Isolado	Tempo				Média	Regressão	R ²
	0	30	60	120			
D15	100 Aa ⁽¹⁾	134,8 aA	113,3 aA	105,8 aA	113,5	$Y = 101,2 - 0,82x + 9,19x^{0,5}$	0,76**
D5	100 aAB	120,8 aA	69,6 bB	95,7 aAB	96,5	Sem ajuste	
C9C	100 aA	103,9 bA	90,7 aA	90,3 aA	96,2	$Y = 102,5 - 0,14x + 3,0x^3$	0,62*
C13	100 aA	99,4 bA	91,6 aAB	60,8 bB	88,0	$Y = 105,9 - 0,34x$	0,89**
D10	100 aA	86,4 bAB	61,7 bB	85,8 aAB	83,5	$Y = 102,9 - 1,02x + 0,007x^2$	0,86**
D87	100 aA	58,6 cB	66,8 bAB	58,4 bB	71,0	$Y = 93,4 - 3,7x^{0,5}$	0,75**
D216	100 aA	33,3 dB	38,6 cB	57,2 bB	57,3	$Y = 99,6 + 1,4x - 19,3x^{0,5}$	0,99**
D29	100 aAB	23,9 dB	23,9 cB	23,9 cB	42,9	$Y = 23,9 + 76,1e^{-x}$	0,10**
D95	100 aA	20,1 dB	23,5 cB	20,1 cB	40,9	$Y = 21,8 - 0,007x + 78,2e^{-x}$	0,99**
C16	100 aA	22,9 dB	20,8 cB	18,5 cB	40,6	$Y = 24,0 - 0,047x + 75,9e^{-x}$	0,99**
Média	100	70,4	60,0	61,7	73,0		

⁽¹⁾ Médias entre tempos de imersão seguidas de letras iguais maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de significância; e as médias entre isolados fúngicos seguidas de letras iguais minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste Skott Knott à 5% de significância.

APÊNDICE D. Índice de tolerância (IT %) dos diâmetros das colônias crescidas por 10 dias em meio sólido submetidas a imersão no cupinicida fipronil por diferentes tempos. O IT % é calculado pela multiplicação do diâmetro das colônias dos isolados nos diferentes tempos de imersão do cupinicida por cem e dividindo pelo diâmetro da colônia no tempo zero.

Isolado	Tempo				Média	Regressão	R ²
	0	30	60	120			
D10	100 aAB ⁽¹⁾	118 aA	102 aAB	79 bB	100	$Y = 103,0 + 0,37x - 0,004x^2$	0,85**
D87	100 aA	99 aA	94 aA	94 aA	96	$Y = 100,6 - 0,12x + 0,0005x^2$	0,85**
D5	100 aA	86 aA	79 aA	95 aA	90	$Y = 100,2 - 0,64x + 0,005x^2$	0,99**
D95	100 aA	90 aAB	63 bB	85 aAB	85	$Y = 103,5 - 0,95x + 0,006x^2$	0,79*
D216	100 aA	81 aA	82 aA	68 bA	83	$Y = 99,5 - 2,77x^{0,5}$	0,94*
D29	100 aA	63 bB	62 bB	98 aA	81	$Y = 98,1 - 1,33x + 0,011x^2$	0,96*
D15	100 aA	74 bA	76 aA	66 bA	79	$Y = 99,5 + 0,19x - 5,09x^{0,5}$	0,95**
C9C	100 aA	84 aA	44 bB	78 bAB	77	$Y = 105,1 - 1,45x + 0,01x^2$	0,81*
C16	100 aA	67 bA	67 bA	68 bA	75	$Y = 99,7 + 0,51x - 8,48x^{0,5}$	0,99*
C13	100 aA	55 bB	58 bB	54 bB	67	$Y = 99,4 + 0,61x - 10,71x^{0,5}$	0,97**
Média	100 a	82	73	79	83		

⁽¹⁾ Médias entre tempos de imersão seguidas de letras iguais maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de significância; e as médias entre isolados fúngicos seguidas de letras iguais minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste Skott Knott à 5% de significância.

APÊNDICE E. Quadrado médio e sua significância obtidos na análise de variância dos dados coletados nas avaliações do índice de tolerância (IT %) dos diâmetros das colônias do isolados de *Pisolithus* sp. submetidos a diferentes concentrações dos cupinicidas thiamethoxam, imidacloprid e fipronil e crescidos por 20 dias.

Variáveis	Fonte de variação			Resíduo	Coeficiente de variação, %
	Isolado	Concentrações	Isolados x Concentrações		
Thiamethoxan					
IT %	528,2*	15959,9**	505,6**	140,9	16,7
Imidacloprid					
IT %	2412,5**	19107,2**	908,3**	111,9	16,3
Fipronil					
IT %	199,1 ^{ns}	39276,7**	105,5**	21,45	11,7

* = significativo a 5%, ** = significativo a 1%, ^{ns} = não significativo

APÊNDICE F. Índice de tolerância (IT%) dos isolados obtido pelo diâmetros das colônias crescidas por 20 dias em meio sólido submetidas a diferentes concentrações dos princípios ativos Thiamethoxam, Imidacloprid e Fipronil. O IT % foi calculado pela multiplicação do diâmetro das colônias dos isolados nos diferentes tempos de imersão do cupinicida por cem e dividindo pelo diâmetro da colônia no tempo zero.

Isolados	Thiamethoxan, g L ⁻¹				Média	Regressão	R ²
	0	0,4	0,8	1,6			
D10	100 aA ⁽¹⁾	84 aB	78 aB	35 aC	74	Y = 102,3 - 40,3x	0,97**
D216	100 aA	75 aB	50 bC	41 aC	67	Y = 91,8 - 36,1x ^{0,5}	0,96**
D5	100 aA	78 aB	74 aB	39 aC	73	Y = 98,3 - 36,3x	0,97**
Média	100	79	67	38	71		
	Imidacloprid, g L ⁻¹				Média	Regressão	R ²
	0	3	6	12			
D216	100 aA	86 aB	82 aB	32 aC	75	Y = 104,4 - 5,6x	0,93**
D10	100 aA	49 bBC	59 bB	36 aC	61	Y = 94,6 - 17,6x ^{0,5}	0,86**
D5	100 aA	59 bB	51 bB	25 aC	59	Y = 88,8 - 5,7x	0,88**
Média	100	65	64	31	65		
	Fipronil, g L ⁻¹				Média	Regressão	R ²
	0	3	6	12			
D216	100 aA	24 aB	26 aB	17 aC	42	Y = 24,8 - 0,5x + 74,9e ^{-x}	0,99**
D5	100 aA	27 aB	17 bC	16 aC	40	Y = 23,5 - 0,7x + 76,6e ^{-x}	0,99**
D10	100 aA	16 bB	16 bB	16 aB	37	Y = 11,6 + 0,41x + 88,4e ^{-x}	0,99**
Média	100	22	19	16	39		

⁽¹⁾ Médias entre tempos de imersão seguidas de letras iguais maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de significância; e as médias entre isolados fúngicos seguidas de letras iguais minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de significância.