

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

EDUARDO OLIVEIRA DA SILVA LUNARDI

**EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE O CICLO DE VIDA DE FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLO SUBTROPICAL**

LAGES

2023

EDUARDO OLIVEIRA DA SILVA LUNARDI

**EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE O CICLO DE VIDA DE FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLO SUBTROPICAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho

LAGES

2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Lunardi, Eduardo Oliveira da Silva
EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE O CICLO DE
VIDA
DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLO
SUBTROPICAL / Eduardo Oliveira da Silva Lunardi. -- 2023.
65 p.

Orientador: Osmar Klauberg-Filho
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Lages,
2023.

1. Ecotoxicologia. 2. Latossolo. 3. Rhizophagus. 4. Micélio
extrarradicular. I. Klauberg-Filho, Osmar . II. Universidade do
Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência do
Solo. III. Título.

EDUARDO OLIVEIRA DA SILVA LUNARDI

**EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE O CICLO DE VIDA DE FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLO SUBTROPICAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho

UDESC Lages

Membros:

Dr^a Letícia Scopel Camargo Carniel

BASF S.A.

Prof. Dr. Luís Carlos Iuñes de Oliveira Filho

UDESC Lages

Lages, 30 de agosto de 2023

AGRADECIMENTOS

À toda minha família pelo apoio, em especial à minha companheira Fernanda.

Ao professor Osmar Klauberg pelos ensinamentos e compreensão.

Ao professor Luís Iuñes pela amizade e companheirismo.

À Aline Malfatti, Rafaela Peron, bolsistas e voluntários pela imensa ajuda nas análises.

A todos os amigos do Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia do Solo pelos momentos compartilhados.

Aos demais professores e membros do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo do CAV-UDESC.

Ao PAP/FAPESC pelo apoio financeiro e à CAPES pela concessão da bolsa.

Muito obrigado.

RESUMO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são organismos do solo que participam de serviços ecossistêmicos fundamentais, como a ciclagem de carbono e melhoria da nutrição das plantas. O crescente interesse pela preservação do grupo e uso dos organismos como indicadores em avaliações de risco ecológico de agrotóxicos tem motivado pesquisadores a aprimorarem os métodos ecotoxicológicos existentes. No Brasil, informações acerca dos efeitos de agrotóxicos sobre FMAs em solos naturais são escassas. O objetivo, através desse trabalho, foi avaliar o efeito de concentrações de fungicidas à base do ingrediente ativo piraclostrobina (0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 mg kg⁻¹) e inseticida fipronil (0; 25; 50; 100; 250; 500; 750 mg kg⁻¹) sobre a germinação de esporos de *Rhizophagus clarus* (RJN120A), *Gigaspora albida* (SCT200A) e *Gigaspora margarita* (SCT077A) e, ainda, os efeitos do fungicida mancozebe (0; 1,5; 3; 9; 27; 54; 81 mg kg⁻¹) sobre o ciclo de vida das mesmas espécies, em ensaios conduzidos em um Latossolo Vermelho. Os resultados demonstraram que a piraclostrobina afetou negativamente as três espécies, sendo *G. albida* a mais sensível (Cl₅₀: 61,23 mg kg⁻¹). O inseticida fipronil reduziu a germinação de esporos de *R. clarus* e *G. margarita*, sem efeitos sobre *G. albida*. A menor concentração de efeito observada entre as espécies foi de 250 mg kg⁻¹ em *G. margarita*. Considerando as concentrações ambientais previstas (PEC – *Predicted environmental concentration*) estimadas em 0,27 mg kg⁻¹ para piraclostrobina e 0,033 mg kg⁻¹ para fipronil, a menor taxa de toxicidade-exposição (TER – *Toxicity to exposure ratio*) encontrada foi de 226,8 para piraclostrobina em *G. albida*. A magnitude das TERs encontradas sugerem que o risco das substâncias para as espécies testadas deva ser mínimo em condições de campo em Latossolos brasileiros. Nos ensaios com o fungicida mancozebe, o ingrediente ativo (i.a.) reduziu a germinação de esporos das três espécies, sendo *G. albida* a mais sensível (Cl₅₀: 18,88 mg kg⁻¹). Nos ensaios de fase simbiótica, a colonização radicular de plantas de alho-poró, no entanto, não foi afetada pelo fungicida para nenhuma espécie. Para o comprimento total do micélio extrarradicular (CMET) apenas *R. clarus* sofreu inibição, a partir de 27 mg kg⁻¹, com Cl₅₀>81 mg kg⁻¹. A massa seca de parte aérea (MSPA) também foi reduzida nas mesmas concentrações em que houve inibição do CMET, possivelmente em função da diminuição dos benefícios da

simbiose. Todas as espécies apresentaram maior sensibilidade na fase pré-simbiótica do que nas variáveis de fase simbiótica, indicando que a germinação de esporos é um *enpoint* protetivo. A espécie *G. albida*, que apresentou maior sensibilidade na fase pré-simbiótica, não reproduziu o padrão na fase simbiótica, onde *R. clarus* foi o mais sensível, evidenciando possíveis diferenças morfofisiológicas e de comportamento existentes entre as espécies. Através do estudo, também se demonstrou a aplicabilidade de uma metodologia prática e padronizável para ensaios ecotoxicológicos utilizando um solo natural.

Palavras chaves: Fungicida; Ecotoxicologia; Micélio extrarradicular; *Gigaspora*; *Rhizophagus*.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMFs) are soil organisms that participate in key ecosystem services such as carbon cycling and improving plant nutrition. The growing interest in the preservation of the group and the use of organisms as indicators in ecological risk assessments of pesticides has motivated researchers to improve existing ecotoxicological methods. In Brazil, information about the effects of pesticides on AMF in natural soils is scarce. The objective, through this work, was to evaluate the effect of concentrations of the fungicide pyraclostrobin (0; 2.5; 5; 10; 25; 50; 100 mg kg⁻¹) and the insecticide fipronil (0; 25; 50; 100; 250; 500; 750 mg kg⁻¹) on the germination of spores of *Rhizophagus clarus* (RJN120A), *Gigaspora albida* (SCT200A) and *Gigaspora margarita* (SCT077A) and, also, the effects of the fungicide mancozeb (0; 1 ,5; 3; 9; 27; 54; 81 mg kg⁻¹) on the life cycle of the same species, in tests conducted on an Oxisol. The results showed that pyraclostrobin negatively affected the three species, with *G. albida* being the most sensitive (IC₅₀: 61.23 mg kg⁻¹). The insecticide fipronil reduced the germination of spores of *R. clarus* and *G. margarita*, with no effect on *G. albida*. The lowest observed effect concentration among the species was 250 mg kg⁻¹ in *G. margarita*. Considering the predicted environmental concentrations (PEC) estimated at 0.27 mg kg⁻¹ for pyraclostrobin and 0.033 mg kg⁻¹ for fipronil, the lowest toxicity-exposure ratio (TER) found was 226.8 for pyraclostrobin for *G. albida*. The magnitude of the calculated TERs suggests that the risk of the substances for the tested species should be minimal under field conditions in Brazilian Oxisols. In the tests with the fungicide mancozeb, the active ingredient reduced spore germination in all three species, with *G. albida* being the most sensitive (IC₅₀: 18.88 mg kg⁻¹). In the symbiotic phase tests, the root colonization of leek plants, however, was not affected by the fungicide for any species. For total extraradical mycelium length (CTME), only *R. clarus* was inhibited, at 27 mg kg⁻¹, with IC₅₀>81 mg kg⁻¹. The shoot dry mass (MSPA) was also reduced at the same concentrations in which there was inhibition of the CMET, possibly due to the decrease in the benefits of the symbiosis. All species showed greater sensitivity in the pre-symbiotic phase than in the symbiotic phase variables, indicating that spore germination is a protective endpoint. The species *G. albida*, which showed greater sensitivity in the pre-symbiotic phase, did not reproduce the

pattern in the symbiotic phase, where *R. clarus* was the most sensitive, evidencing possible morphophysiological and behavioral differences between the species. The study also demonstrated the feasibility of a practical and standardized methodology for ecotoxicological tests using a natural soil.

Palavras chaves: Fungicide; Ecotoxicology; Extraradical mycelium; *Gigaspora*; *Rhizophagus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Percentagem de germinação de esporos de (A) *Rhizophagus clarus*, (B) *Gigaspora albida* e (C) *Gigaspora margarita* em SAT contaminado com concentrações crescentes de ácido bórico. Asteriscos indicam diferença significativa para o controle pelo teste de Dunnet ($p<0,05$). Barras indicam o desvio padrão da média. 23
- Figura 2 - Gráficos de dispersão do efeito de doses crescentes de piraclostrobina e fipronil sobre (A)(B) *Rhizophagus clarus*, (C)(D) *Gigapsora albida* e (E)(F) *Gigaspora margarita*, respectivamente, sob Latossolo. Linha vermelha representa modelo de regressão não-linear que melhor se ajustou aos dados, indicado em cada gráfico. As médias da resposta de germinação estão representadas pelos quadrados. Quadrados preenchidos significam diferença estatística para o controle pelo teste de Dunnet ($p<0,05$). Quando não houve diferença estatística em nenhuma concentração testada, não houve ajuste de modelo. 25
- Figura 3 - Esquema visual do procedimento experimental utilizado. A numeração crescente indica a sequência das etapas. 38
- Figura 4 - Gráficos de dispersão do efeito de doses crescentes de mancozebe sobre a germinação de esporos de (A) *Rhizophagus clarus*, (B) *Gigapsora albida* e (C) *Gigaspora margarita*. Linha vermelha representa modelo de regressão não-linear que melhor se ajustou aos dados. As médias da resposta de germinação estão representadas pelos quadrados. Quadrados preenchidos significam diferença estatística para o controle pelo teste de Dunnet ($p<0,05$). 43
- Figura 5 - Efeito de concentrações crescentes de mancozebe sobre a massa seca de parte aérea (MSPA) e volume de raiz de plantas de alho-poró em tratamento sem presença de inóculo fúngico. Linhas no topo das colunas indicam desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa do controle pelo teste de Dunnet ($p<0,05$). 44
- Figura 6 - Efeito de concentrações crescentes de mancozebe sobre o comprimento total do micélio extrarradicular (CTME) e colonização radicular de (A)(D) *Rhizophagus clarus*, (B)(E) *Gigaspora albida* e (C)(F) *Gigaspora*

margarita, respectivamente. Linhas no topo das colunas indicam desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa do controle pelo teste de Dunnet ($p<0,05$) 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características químicas e físicas do Latossolo vermelho.....	18
Tabela 2 - Concentrações testadas dos ingredientes ativos para cada espécie fúngica.....	20
Tabela 3 - Menor concentração de efeito observada (CEO), concentração de inibição para 50% da população (CI ₅₀), concentração ambiental prevista (PEC), e taxa de toxicidade-exposição (TER) para germinação de esporos em ensaios com piraclostrobina e fipronil.....	28
Tabela 4 - Características químicas e físicas do Latossolo vermelho submetido a correção de pH.....	36
Tabela 5 - Menor concentração de efeito observada (CEO), concentração de inibição para 50% da população (CI ₅₀), concentração ambiental prevista (PEC) dos ingredientes ativos no solo após uma aplicação, simulando o pior cenário possível, e taxa de toxicidade-exposição (TER) para endpoints fúngicos de fase pré-simbiótica e simbiótica em ensaios com mancozebe.	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	HIPÓTESES	12
3	OBJETIVOS	12
4	EFEITOS DA PIRACLOSTROBINA E FIPRONIL SOBRE TRÊS ESPÉCIES DE FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR EM SOLO SUBTROPICAL.....	14
4.1	INTRODUÇÃO.....	14
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.2.1	Organismos, solo e substâncias teste.....	18
4.2.2	Procedimentos experimentais	20
4.2.3	Análise estatística.....	21
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.4	CONCLUSÃO	30
5	EFEITOS DE MANCOZEBE SOBRE O CICLO DE VIDA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM UM LATOSSOLO.....	31
5.1	INTRODUÇÃO.....	31
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.2.1	Solo e organismos.....	35
5.2.2	Testes <i>in vitro</i>	36
5.2.3	Testes <i>in vivo</i>	37
5.2.4	Análise estatística.....	41
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.3.1	Ensaio de fase pré-simbiótica	42
5.3.2	Ensaio de fase simbiótica	44
5.3.3	Comparação entre a fase pré-simbiótica e simbiótica	47
5.4	CONCLUSÃO	50

1 INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são considerados um grupo-chave de organismos do solo pelas diversas funções ecossistêmicas prestadas. Dentre as funções mais conhecidas dos FMAs estão sua contribuição na estocagem do carbono (Treseder; Allen, 2000; Jansa; Treseder, 2016) e melhoria na nutrição do fósforo para as plantas, com crescentes evidências apontando seu papel na nutrição do nitrogênio (Hodge et al., 2010; Bücking; Kafle, 2015). Ainda, participam da regulação de ciclos de nutrientes e influenciam a estruturação do solo e a multifuncionalidade dos ecossistemas (Rillig; Mumme, 2006; Leifheit et al., 2014; Van der Heijden et al., 2015). Além disso, a diversidade de FMAs modela as comunidades de plantas, causando impacto sobre a produtividade dos ecossistemas em que estão presentes (Van der Heijden et al., 1998).

Dispersos pelo globo, as mais de 340 espécies (AMF PHYLOGENY, 2023) de FMAs estão presentes nos mais variados ecossistemas, incluindo aqueles de intenso uso agrícola, onde sofrem pressões seletivas de acordo com os tipos de manejos realizados e sua intensidade. Práticas de preparo do solo, diferentes espécies de plantas, fertilizações e aplicações de agrotóxicos podem alterar a dinâmica da comunidade fúngica (Oehl et al., 2010; Liu et al., 2023; Ramana et al., 2023), influenciando grupos funcionais e interferindo na prestação de serviços ecossistêmicos (Mathimaram et al., 2007). Oehl et al. (2017) demonstraram que a riqueza de espécies de FMAs foi maior em solos de pastagens comparativamente a solos com culturas anuais. Além do efeito de diferentes características do solo (e.g.: matéria orgânica, biomassa, disponibilidade de nutrientes), algumas espécies também foram afetadas pelos diferentes usos e intensidade do uso do solo (Oehl et al., 2017).

Dentre as práticas agrícolas frequentemente empregadas, a aplicação de agrotóxicos ganha destaque, dado seu potencial de causar efeitos negativos sobre esse grupo de organismos (Rivera-Becerril et al., 2017; Riedo et al., 2021;). Avaliando 150 pontos de solos cultivados com cereais e 60 pontos de pastagens ao longo de um gradiente espacial na Europa, Edlinger et al (2022) demonstraram que a eficiência de absorção de fósforo por comunidades de FMAs oriundas de pastagens foi superior à das oriundas de áreas cultivadas. A redução da riqueza das espécies, advinda da aplicação de fungicidas em áreas de cultivo, foi o melhor fator

explicativo para redução de 43% no “uptake” de fósforo pelas espécies de áreas cultivadas.

Apesar dos FMAs constituírem um grupo de organismos não-alvo, é sabido que herbicidas (Druille et al., 2013), inseticidas (Malfatti et al., 2023) e fungicidas (Zocco et al., 2008) podem causar efeitos negativos sobre diferentes etapas do ciclo de vida desses organismos. Considerando o potencial prejuízo que a perda das funções desse grupo de organismos representa para os ecossistemas, a Agência de Segurança Alimentar da Europa (EFSA, *European Food Safety Agency*) emitiu uma opinião científica recomendando a inclusão desse grupo de organismos em esquemas de avaliação de risco ecológico de pesticidas no bloco (Ockleford et al., 2017). Apesar da existência de um protocolo padronizado ISO 10832:2009 (ISO, 2009) e dos recentes avanços no tema (ver Mallmann et al., 2018; Malfatti et al., 2023), é notável que a ecotoxicologia de FMAs ainda carece de métodos adequados e validações científicas robustas, que levem em consideração novas espécies, cenários de exposição, moléculas e *endpoints*.

Na União Europeia, métodos específicos para avaliar o potencial risco de agrotóxicos aos organismos do solo foram estabelecidos em 2002 (EC, 2002). No Brasil, o conhecimento dos efeitos de agrotóxicos sobre espécies de FMAs sob solos representativos é escasso. Para o registro de novos agrotóxicos no país, a substância candidata deve passar pela avaliação do potencial de periculosidade ambiental e avaliação do risco ambiental (IBAMA, 1996). Dentre os ensaios necessários para a caracterização do risco ambiental estão os testes físico-químicos, testes de destino do produto e testes ecotoxicológicos (Niva et al., 2016). Apenas ensaios ecotoxicológicos com minhocas e “microrganismos envolvidos na ciclagem de nutrientes” são exigidos pela atual legislação. É notável, portanto, que outros grupos de organismos do solo devam ser inclusos nas avaliações, a exemplo dos FMAs, dado sua fundamental contribuição na provisão de serviços ecossistêmicos. A inclusão de novos grupos de organismos está condicionada não só aos esforços governamentais e sociais, mas também pelo avanço da ciência no tema.

Simbiontes obrigatórios, o ciclo de vida dos FMAs é comumente dividido entre a fase pré-simbiótica ou assimbiótica (antes da associação com o hospedeiro) e simbiótica (a partir da associação com hospedeiro). Na ecotoxicologia de FMAs, *endpoints* de ambas as etapas são utilizados para caracterizar o risco de

substâncias aos organismos. Na fase pré-simbiótica, os esporos representam a unidade fundamental para sobrevivência e dispersão nos ambientes (Koske & Gemma, 1990), além de estarem atrelados ao futuro sucesso da simbiose (Klironomos & Hart, 2002). A capacidade de germinação dos esporos em meios contaminados é frequentemente utilizada para avaliar a toxicidade de substâncias. Na literatura, são conhecidos os efeitos negativos que fungicidas (Chiocchio et al., 2000; Zocco et al., 2008; Mallmann et al., 2018), inseticidas (Menendez et al., 1999; Malfatti et al., 2023) e herbicidas (Pasaribu et al., 2013; Malfatti et al., 2021) podem causar sobre a germinação dos esporos de diferentes espécies de FMAs.

Na etapa simbiótica do ciclo de vida, a dependência da planta para o desenvolvimento do fungo introduz maior complexidade aos esquemas experimentais. As variáveis simbióticas frequentemente avaliadas nesse tipo de ensaio compreendem características do micélio extrarradicular, como o comprimento (Campagnac et al., 2009), densidade e taxa de anastomose do micélio (De Novais et al., 2019). Tratando-se de estruturas fúngicas internas na planta, a colonização radicular e arbuscular são bastante conhecidas e utilizadas (Buysens et al., 2015; Jakobsen et al., 2021). Diversos métodos visando avaliar tais *endpoints* podem ser conduzidos, como sistemas *in vitro* com raízes modificadas, *rhizoboxes* com compartimentos de raiz e hifas separadas, ensaios em vasos ou estudos de campo, todos possuindo vantagens e limitações (Hage-Ahmed et al., 2019).

Apesar dos recentes avanços, a ecotoxicologia de FMAs enfrenta desafios para o estabelecimento de protocolos experimentais padronizáveis e replicáveis, como as diferenças marcantes existentes entre os métodos utilizados, que tornam difíceis as comparações entre resultados de diferentes estudos (Hage-Ahmed et al., 2019) e as configuram como obstáculos para o estabelecimento de premissas robustas na área. Nesse sentido, pesquisadores têm investido na busca de adaptações aos métodos correntes, dispondo-se de diferentes *endpoints*, moléculas, substratos, espécies e diferentes condições experimentais (Mallmann et al., 2018; Hage-Ahmed et al., 2019). Na fase pré-simbiótica, a germinação de esporos tem tido sucesso em caracterizar respostas dose-dependentes, mas a representatividade dos resultados é geralmente limitada, uma vez que a maior parte dos ensaios são conduzidos em meios artificiais, por exemplo. Na etapa simbiótica, o desafio se torna ainda maior, haja vista a maior complexidade em função da obrigatoriedade do componente vegetal. Apesar disso, da mesma forma que para a fase pré-simbiótica,

o estabelecimento de esquemas experimentais padronizáveis colaboraria para dar suporte a comparações mais assertivas entre resultados de diferentes estudos. Dentre outras características fundamentais para ensaios “lower tier”, a utilização de solos naturais também seria fator positivo, dado que imbui maior relevância prática aos resultados (Niemeyer et al., 2017) e maior subsídio para extrações teóricas (Sweeney et al., 2022).

No Brasil, as informações sobre efeitos de agrotóxicos sobre FMAs em Latossolos são escassas e muitas vezes inexistentes. Essa é a ordem de solos mais representativa do país, cobrindo cerca de 39% do território e distribuída em quase todas as regiões (EMBRAPA, 2023), além de abrigar uma grande variedade de espécies de micorrizas arbusculares (Ferreira et al., 2012; Fernandes et al., 2015; Moraes et al., 2019). A necessidade de informações acerca dos efeitos de pesticidas sobre FMAs se tornam mais críticas, uma vez que os Latossolos predominam no bioma Cerrado, onde se concentra 42% da agricultura brasileira e metade da área destinada ao cultivo da soja no país (MAPBIOMAS, 2021). A cultura é a campeã de área tratada com produtos químicos no país, atingindo cerca de 108,9 milhões de hectares tratados em 2022 (SINDIVEG, 2023). O fungicida mancozebe, por exemplo, registrado na década de 1940 nos EUA (USEPA, 2005) e aprovado pela primeira vez no Brasil em 1984 (IBAMA, 2023), foi o fungicida mais comercializado no Brasil em 2021, com mais de 50,3 mil toneladas (IBAMA, 2023). Apesar do vasto tempo de utilização e de seu uso disseminado, seus efeitos sobre FMAs em condições de solos brasileiros continuam desconhecidas. Nesse sentido, informações acerca da dinâmica do efeito de diferentes agrotóxicos sobre FMAs em solos naturais brasileiros aprimorariam o entendimento sobre o potencial risco que essas substâncias podem representar para espécies de FMAs.

Para elucidar tais questões, o presente trabalho está dividido no formato de dois artigos científicos independentes. O primeiro, “Efeitos da piraclostrobina e fipronil sobre três espécies de fungo micorrízico arbuscular em solo subtropical”, irá explorar como e o quanto um fungicida e um inseticida podem impactar a fase pré-simbiótica das espécies fúngicas sob um solo representativo do Brasil – e se os efeitos podem ou não se configurar em um potencial risco para o grupo de organismos. Além disso, a própria aplicabilidade de um ensaio de germinação de esporos utilizando um solo natural é colocada em prática.

O segundo artigo, denominado “Efeitos do mancozebe sobre o ciclo de vida de fungos micorrízicos arbusculares em um Latossolo” reflete a investigação acerca dos efeitos do ingrediente ativo fungicida mais comercializado no Brasil sobre as fases pré-simbiótica e simbiótica de três espécies fúngicas, identificando potenciais riscos e buscando compreender as relações existentes entre diferentes variáveis das etapas do ciclo de vida dos FMAs. Partindo de uma interpretação abrangente, envolvendo características de planta e fungo, um modelo experimental para estudo *in vivo* replicável e padronizável é colocado a prova. Os resultados permitem inferências acerca das espécies testadas em um solo de expressivo uso agrícola no Brasil. Por fim, ambos os artigos trazem conclusões novas e relevantes para o cenário da ecotoxicologia terrestre e possibilitam a identificação de lacunas a serem aprofundadas no tema.

2 HIPÓTESES

O fungicida piraclostrobina e o inseticida fipronil afetam negativamente a germinação de esporos de *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora albida* e *Gigaspora margarita* em Latossolo.

Mancozebe causa a redução da germinação de esporos e afeta negativamente as variáveis simbióticas de forma diferenciada para as espécies *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora albida* e *Gigaspora margarita* em Latossolo.

A germinação de esporos é mais sensível ao mancozebe do que os *enpoints* de fase simbiótica (colonização radicular e comprimento total do micélio extrarradicular) e a magnitude da relação é dependente da espécie fúngica.

O uso de Latossolo natural possui aplicabilidade prática em ensaios ecotoxicológicos *in vitro* e *in vivo*.

3 OBJETIVOS

Avaliar o efeito de concentrações de fungicidas à base do ingrediente ativo piraclostrobina (Comet ®) e inseticida à base de fipronil (Source ®) sobre a germinação de esporos de *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora albida* e *Gigaspora*

margarita e determinar as concentrações de inibição de 50% (IC_{50}), através de ensaio ecotoxicológico *in vitro* em um Latossolo Vermelho.

Avaliar o efeito de mancozebe (Manzate ®) sobre a fase pré-simbiótica e simbiótica de *R. clarus*, *G. albida* e *G. margarita* em um Latossolo Vermelho. Determinar as concentrações de inibição (IC_{50}) para todas as variáveis testadas e avaliar a adequabilidade do uso de um solo natural em ensaios ecotoxicológicos *in vivo* com FMAs. Identificar as relações da sensibilidade aos agrotóxicos entre os diferentes *endpoints* testados (germinação de esporos, comprimento total do micélio extraradicular e colonização radicular).

4 EFEITOS DA PIRACLOSTROBINA E FIPRONIL SOBRE TRÊS ESPÉCIES DE FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR EM SOLO SUBTROPICAL

4.1 INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são um grupo-chave de organismos do solo e assim como outros organismos não-alvo, estão expostos aos agrotóxicos usados no controle de pragas e doenças na agricultura. Pressões crescentes sobre os ambientes produtivos e a necessidade de desenvolvimento de estruturas regulatórias para agrotóxicos baseadas na ciência tem motivado pesquisadores a aprofundarem conhecimentos acerca das particularidades envolvidas na caracterização do risco dessas substâncias sobre os FMAs (Mallmann et al., 2018; Karpouzas et al., 2021; Sweeney et al., 2022).

Os FMAs são organismos cosmopolitas, simbiontes obrigatórios, com cerca de 340 espécies descritas (Schübler et al., 2001; AMF PHYLOGENY, 2023). Dentre outras funções, eles regulam ciclos de nutrientes e influenciam a estruturação do solo e a multifuncionalidade dos ecossistemas (Van der Heijden et al., 2015). Sua contribuição na estocagem do carbono (Treseder; Allen, 2000; Jansa; Treseder, 2016) e melhoria na nutrição do fósforo para as plantas é bem conhecida, enquanto crescentes evidências vem apontando seu papel na nutrição do nitrogênio (Hodge et al., 2010; Bücking; Kafle, 2015). As micorrizas também favorecem a agregação do solo, especialmente através do micélio extrarradicular (Rillig; Mummey, 2006; Leifheit et al., 2014). Além disso, a diversidade de FMAs modela as comunidades de plantas, impactando a produtividade dos ecossistemas (Van der Heijden et al., 1998).

É sabido que para a produção agrícola, a importância potencial dos FMAs é maior em sistemas pouco intensivos e decresce ao passo que aumenta a intensidade do manejo e uso de insumos (Moreira; Siqueira, 2006). Apesar disso, em alguns casos, benefícios nutricionais ainda podem ser notados pela inoculação de FMAs mesmo em condições de aplicações de doses elevadas de fertilizantes, com aumento do rendimento de planta e eficiência da absorção de nutrientes (Cely et al., 2016). Em solos brasileiros altamente intemperizados, como os do bioma Cerrado, a intensificação da produção agrícola pode acarretar problemas como a perda de matéria orgânica, perda de nutrientes e erosão. Nesse sentido, o uso de

microrganismos benéficos, como os FMAs, é alternativa viável para otimizar a nutrição das plantas (Baum et al., 2015).

Espalhados por praticamente todas as regiões do globo, diversas espécies estão presentes em ambientes agrícolas (Hijri et al., 2006; De Pontes et al., 2017), onde há intenso uso de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças. Entre as estruturas fúngicas que compõe o potencial de infectividade do solo, os esporos são fundamentais para sobrevivência e dispersão dos organismos nos ambientes (Koske & Gemma, 1990). Além disso, o estabelecimento da simbiose está muitas vezes relacionado com o sucesso da germinação e crescimento do tubo germinativo a partir dos esporos (Klironomos & Hart, 2002). Vários estudos demonstraram que a germinação dos esporos de diferentes espécies de FMAs podem ser prejudicadas pelo efeito de fungicidas (Chiocchio et al., 2000; Zocco et al., 2008; Mallmann et al., 2018), inseticidas (Menendez et al., 1999; Malfatti et al., 2023) e herbicidas (Malty et al., 2006; Pasaribu et al., 2013; Malfatti et al., 2021), o que pode, de maneira geral, levar a redução ou perda das funções ecossistêmicas prestadas.

Face a este cenário, os FMAs foram sugeridos como um grupo a ser incluso em esquemas de avaliação de risco ecológico (ARE) de pesticidas na União Europeia (Ockleford et al, 2017). A fim de elaborar uma base científica substancial que dê suporte à inclusão de FMAs em AREs, pesquisadores tem investido esforços na busca de adaptações metodológicas, com a utilização de diferentes *endpoints*, moléculas, substratos, espécies e outras condições experimentais (Mallmann et al., 2018; Hage-Ahmed et al., 2018). Esforços semelhantes têm sido realizados para outros grupos de organismos do solo, como isópodes e enquitreídeos, ainda não inclusos em AREs (Rombke et al., 2017; Carniel et a., 2019). No Brasil, para o registro de novos agrotóxicos, são exigidos ensaios ecotoxicológicos como parte da caracterização do risco ambiental da substância. No entanto, apenas dados de ensaios com minhocas e “microrganismos envolvidos na ciclagem de nutrientes” são requisitados (IBAMA, 1996).

A germinação de esporos é um importante *endpoint* para avaliar o efeito de substâncias sobre a fase pré-simbiótica e as avaliações ecotoxicológicas tem tido sucesso em caracterizar respostas do tipo dose-resposta (Malfatti et al., 2021). Entretanto, alguns aspectos ainda carecem de validações científicas, como o uso de solos naturais, que impõem maior realismo e relevância prática nos resultados e podem servir como um refinamento de dados coletados em ensaios com solos

artificiais ou meios de cultura, além de fornecer maior subsídio para extrações teóricas (Sweeney et al., 2022)

O conhecimento de solos brasileiros para uso em ensaios ecotoxicológicos é limitado (Niva et al., 2016), sendo a avaliação da adequabilidade dos solos naturais de grande relevância para a consolidação das metodologias emergentes. No Brasil, os Latossolos – solos altamente intemperizados - cobrem cerca de 39% da área do país e estão distribuídos em quase todas as regiões (EMBRAPA, 2023), abrigando uma grande variedade de espécies de fungos micorrízicos arbusculares ao longo de diferentes gradientes de manejo (Ferreira et al., 2012; Fernandes et al., 2015; Moraes et al., 2019). Ainda, os Latossolos são a classe predominante de solos no bioma Cerrado, onde se concentra 42% da agricultura brasileira (MAPBIOMAS, 2021). Informações acerca da dinâmica do efeito de diferentes agrotóxicos sobre FMAs em Latossolos brasileiros são relevantes no entendimento da exposição e do risco desses organismos em ambientes agrícolas brasileiros.

Outros pontos limitantes para o avanço do uso de ensaios pré-simbióticos com FMAs em AREs são o entendimento do impacto das variações intraespecíficas sobre a resposta dos organismos aos agrotóxicos e a ausência de referências para avaliar a magnitude dos riscos, como os “assessment factors”, utilizados na ecotoxicologia de invertebrados do solo (Sweeney et al., 2022). A comparação da taxa de toxicidade-exposição (TER) da substância testada com os “assessment factors”, pode servir como um valor de limiar nas tomadas de decisão (Ockleford et al., 2017). Na ecotoxicologia de invertebrados, Christl et al (2015), sugeriu o valor de 5 como limiar, através de estudos da relação entre ensaios de laboratório e campo para minhocas. No entanto, esse valor não é apropriado para proteger todas as espécies (Carniel, 2019) e calibrações são necessárias para diferentes grupos de organismos. Essa calibração pode ser mais desafiadora no caso de FMAs, onde *endpoints* de fase pré-simbiótica, como a germinação de esporos, carecem de métodos para avaliação em condições de campo (Sweeney et al., 2022).

Dentre os diversos agrotóxicos utilizados na agricultura brasileira, o fungicida piraclostrobina (grupo químico estrobulurina) e o inseticida fipronil (grupo químico fenil-pirazol) possuem efeitos pouco conhecidos sobre a fase pré-simbiótica de FMAs em solos naturais. A piraclostrobina atua de forma sistêmica na planta, afetando a transferência de elétrons da respiração mitocondrial das células fúngicas, possuindo ação protetiva pela inibição da germinação de esporos fúngicos. O

fungicida é indicado para diversas culturas, como soja, milho e trigo (Lewis et al, 2016; BASF, 2023).

O inseticida fipronil faz parte do grupo químico fenil-pirazol, possui espectro de atuação sobre diversos insetos, atuando sobre o sistema nervoso central (Bonmatin et al., 2015; Lewis et al, 2016). Sua ação sistêmica na planta e a flexibilidade dos modos de aplicação foram fatores-chave para o sucesso dessa molécula (Simon-Delso et al., 2015).

Campos et al (2017) demonstraram que a aplicação em cobertura de 75 g ha⁻¹ de Comet ® (25% piraclostrobina) reduziu a colonização micorrízica de plantas de feijão pela comunidade fúngica nativa para 49,3%, em comparação aos 63,8% do controle. Apesar disso, o fungicida não interferiu na produção de esporos da comunidade. Apesar da escassez de estudos com os ativos citados, outros estudos demonstraram efeitos negativos da azoxistrobina – do grupo químico estrobilurinas – sobre a anastomose do micélio extraradicular (Rodriguez-Morelos et al., 2023), produção de esporos (Buysens et al., 2015; Rodriguez-Morelos et al., 2023), crescimento do micélio extrarradicular, germinação de esporos (Buysens et al., 2015) e colonização radicular de *Solanum tuberosum* (Rodriguez-Morelos et al., 2022). Em oposição, Schalamuk et al (2014) não encontrou efeitos da aplicação de trifloxistrobina + tebuconazole sobre as variáveis fúngicas analisadas em condições de campo. Não foram encontrados estudos atestando efeito de fipronil sobre FMAs até o presente momento. Apesar disso, Malfatti et al (2023) demonstraram que imidacloprid e thiametoxam – dois neonicotinoides – causaram redução da germinação de *R. clarus* e *G. albida* em solo artificial. Apesar de pertencer a grupos químicos distintos, fipronil é comumente tratado em conjunto com neonicotinoides em função de suas similaridades, como atuação no sistema nervoso central dos insetos e ação sistêmica na planta (Simon-Delso et al., 2015).

Em face ao exposto, o objetivo – através desse trabalho - foi avaliar o efeito de concentrações do fungicida Comet ®, à base do ingrediente ativo piraclostrobina, e inseticida Source ®, à base de fipronil, sobre a germinação de esporos de *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora albida* e *Gigaspora margarita*, através de ensaio ecotoxicológico *in vitro* em um Latossolo. A hipótese é de que as substâncias afetam negativamente a germinação de esporos de *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora albida* e *Gigaspora margarita*. Ainda, que o uso de Latossolo natural possui aplicabilidade prática em ensaios ecotoxicológicos *in vitro*.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Organismos, solo e substâncias teste

Culturas puras de *R. clarus* (RJN120A), *G. albida* (SCT200A) e *G. margarita* (SCT077A) foram obtidas através da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota – CICG (CICG, 2023). Para obter maior número de inóculo, as culturas foram multiplicadas através da técnica dos vasos-armadilha (Stutz & Morton, 1996) adaptada. Vasos de 1,5 litros foram preenchidos com mistura homogênea de solo:areia:vermiculita expandida (1:1:1), previamente esterilizados em 3 ciclos de autoclavagem (60 minutos, 1 atm, 120°C), e semeados com sementes de *Brachiaria brizantha*, externamente desinfectadas em imersão em solução de HCl 10%, por 5 minutos. Após cerca de 120 dias, as culturas foram avaliadas quanto a presença, quantidade de esporos e contaminações. Ausente de contaminação externa, o inóculo foi recolhido, permanecendo armazenado em 4 °C até o uso. Para o inóculo de *R. clarus*, o período máximo entre a recolha do inóculo e o uso experimental foi de até 2 anos. Para *G. albida* e *G. margarita*, o período não foi superior a 1 mês.

Para condução dos ensaios, um Latossolo vermelho foi coletado em região de mata nativa, com ausência de histórico de qualquer forma de contaminação, na região de Chapecó, Santa Catarina, Brasil. As amostras foram coletadas na profundidade de 0 a 0,20 m, secas em temperatura ambiente, peneiradas (2 mm) e armazenadas. As características físico-químicas do solo estão dispostas na Tabela 1. A concentração de argila foi determinada através de densimetria. O pH em água através de potenciometria. Conteúdo de P foi determinação pelo método Mehlich-1 e posterior colorimetria, enquanto o teor de K foi determinado através de Mehlich-1 seguido de avaliação em fotômetro de chamas. A matéria orgânica foi determinada por espectroscopia. Al, Ca, e Mg foram determinados em KCl seguido de espectrofotometria de absorção atômica.

Tabela 1 - Características químicas e físicas do Latossolo vermelho.

Propriedades	Latossolo
Matéria Orgânica (mg dm ⁻³)	3,8
pH (água)	4,4
CTC pH 7 (cmol _c dm ⁻³)	7,99

AI (cmol _c dm ⁻³)	58,31
H + AI (cmol _c dm ⁻³)	5,49
Ca (cmol _c dm ⁻³)	16,27
Mg (cmol _c dm ⁻³)	12,75
P (mg dm ⁻³)	2,4
K (mg dm ⁻³)	72
Argila (%)	40
Capacidade de retenção de água (%)	76,9

Inicialmente, um ensaio de germinação com ácido bórico foi realizado para validar a condição do inóculo de cada espécie fúngica testada (Mallmann et al., 2018). As concentrações utilizadas foram de 0; 75; 300; 450; 600; 900; 1200 mg kg⁻¹ para *R. clarus* e *G. albida* e 0; 300; 600; 1200; 2400 mg kg⁻¹ para *G. margarita*. Foram utilizadas concentrações superiores para *G. margarita* após ensaios preliminares apontarem menor sensibilidade da espécie. O substrato utilizado foi o solo artificial tropical – SAT (5% fibra de coco, 20% caulinita, 75% areia fina) (Garcia, 2004), sendo as demais características experimentais semelhantes aos ensaios com agrotóxicos, descritos a seguir.

Os produtos comerciais testados foram Comet ® e Source ®, ambos sob licença da BASF S.A. Comet ®, cujo ingrediente ativo (i.a.) é a piraclostrobina (CAS: methyl(2-(((1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl)oxy)methyl)phenyl)methoxycarbamate), é um fungicida sistêmico que atua no transporte de elétrons e formação de ATP nas mitocôndrias das células fúngicas. O produto é recomendado para o tratamento de doenças em diversas culturas de importância agrícola no Brasil, como soja, milho e algodão. A dose recomendada pode variar de 0,3 a 0,8 litros/ha (produto comercial) e o número máximo de aplicações de 1 a 5 para culturas agrícolas.

Source ®, i.a. fipronil (5-amino-1-(2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-4-((trifluoromethyl)sulfinyl)-1H-pyrazole-3-carbonitrile), é um inseticida de ação por contato e ingestão do grupo fenil-pirazol, recomendado para tratamento de sementes das principais culturas anuais. A dose recomendada pode chegar a 300 ml do produto comercial por 100 kg de sementes.

As concentrações de cada i.a. utilizadas nos ensaios foram baseadas em ensaios de germinação de Mallmann et al. (2018) e Malffati et al. (2023) (Tabela 2). Foram preparadas soluções estoque de cada i.a. e a contaminação do solo realizada com a quantidade correspondente concentração nominal desejada. A umidade do solo foi ajustada para 40% da capacidade de retenção de água.

Tabela 2 - Concentrações testadas dos ingredientes ativos para cada espécie fúngica.

Agrotóxico/Espécie FMA	Concentrações nominais testadas (mg kg ⁻¹)
Piraclostrobina (Comet ®)	
<i>R. clarus</i>	0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100
<i>G. albida</i>	0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100
<i>G. margarita</i>	0; 5; 10; 25; 50; 100; 200
Fipronil (Source ®)	
<i>R. clarus</i>	0; 25; 50; 100; 250; 500; 750
<i>G. albida</i>	0; 25; 50; 100; 250; 500; 750
<i>G. margarita</i>	0; 50; 100; 250; 750; 1000

4.2.2 Procedimentos experimentais

Os testes de germinação de esporos foram conduzidos conforme protocolo ISO 10832:2009 (ISO, 2009), com adaptações de Mallmann et al. (2018). Esporos foram extraídos dos inóculos através da peneiragem úmida (Gerdemann e Nicolson 1963), seguida de centrifugação em gradiente de sacarose (20 e 60%). Para cada unidade experimental (u.e.), foram selecionados 30 esporos íntegros e posicionados aleatoriamente em uma membrana de nitrocelulose (47 mm diâmetro, 0,45 µm poros, 3 mm grids). Sobre a membrana contendo os esporos, outra membrana umedecida foi posicionada, formando o chamado “sanduíche de esporos”, o qual foi colocado entre duas camadas de 40 g de Latossolo, em uma placa de Petri. Após, cada placa de Petri foi envolta em filme plástico para evitar a perda de umidade e transferida para incubadora tipo B.O.D a 28 °C ± 2, sem luz, onde permaneceram pelo período de 14 dias. Cada placa de Petri contendo um conjunto de 30 esporos foi considerada uma u.e. Para cada concentração de i.a. testado, foram elaboradas 6 repetições (n=6), totalizando 42 u.e. para cada substância (agrotóxicos e ácido bórico) e fungo. As unidades experimentais foram distribuídas aleatoriamente na incubadora, em delineamento inteiramente casualizado. Após 14 dias, os “sanduíches” foram cuidadosamente removidos da placa e umedecidos com uma solução de ácido acético e tinta de caneta (5%) a fim de colorir as hifas para melhor visualização das estruturas. Posteriormente, as membranas foram avaliadas sob microscópio estereoscópico (50x). O número de esporos recuperados – que restaram na membrana – e o número de esporos germinados foram contados. Considerou-se germinado o esporo cujo comprimento do tubo germinativo foi no mínimo cinco

vezes superior ao diâmetro do esporo. A % de germinação foi determinada pela fórmula Ger (%) = $[(x*100/n)]$; onde x é o número de esporos germinados; n é o número de esporos recuperados. Os resultados foram considerados válidos quando a média do número de esporos recuperados n > 25 e a média de germinação nos tratamentos controle (sem agrotóxicos) foi x > 75%.

Para se determinar um cenário de exposição dos organismos às sustâncias, e posterior comparação da toxicidade versus exposição, foram definidas as concentrações ambientais previstas (PEC) de ambos os agrotóxicos no solo, de acordo com FOCUS (2017). As variáveis consideradas foram a densidade do solo seco (1,5 g cm⁻³), profundidade (5 cm) e taxa de interceptação do dossel (zero), simulando o pior cenário possível. Utilizando esses parâmetros, a quantidade de i.a. (mg kg⁻¹) estimada presente no solo após a aplicação em um único cultivo pode ser calculada pela fórmula $PEC = A/750$; onde A é a taxa de aplicação do i.a. (g ha⁻¹). A taxa de toxicidade-exposição (TER) foi determinada através da relação entre a concentração de inibição para 50% da população (CI₅₀) e a PEC.

4.2.3 Análise estatística

Para cada espécie (*R. clarus*, *G. albida* e *G. margarita*) e substância testada (ácido bórico, piraclostrobina e fipronil) os dados de germinação de esporos foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Testes de Bartlett). Quando as premissas não foram atendidas, os dados foram transformados usando $asen(\sqrt{x}/100)$. Normais e homogêneos, os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA (One-way), seguido de teste Dunnett ($p < 0,05$) para avaliar a existência de diferenças significativas entre cada concentração testada e o controle. Com base nos dados de % de germinação, foram determinados os valores de concentração de inibição para 50% da população (CI₅₀) e os intervalos de confiança de 95%, utilizando modelos de regressão não-linear de acordo com o Environment Canada (EC, 2005), ajustando para o modelo que melhor representou os dados, através do algoritmo Levenberg-Marquardt. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software Statistica 10.0 (StatSoft, 2011).

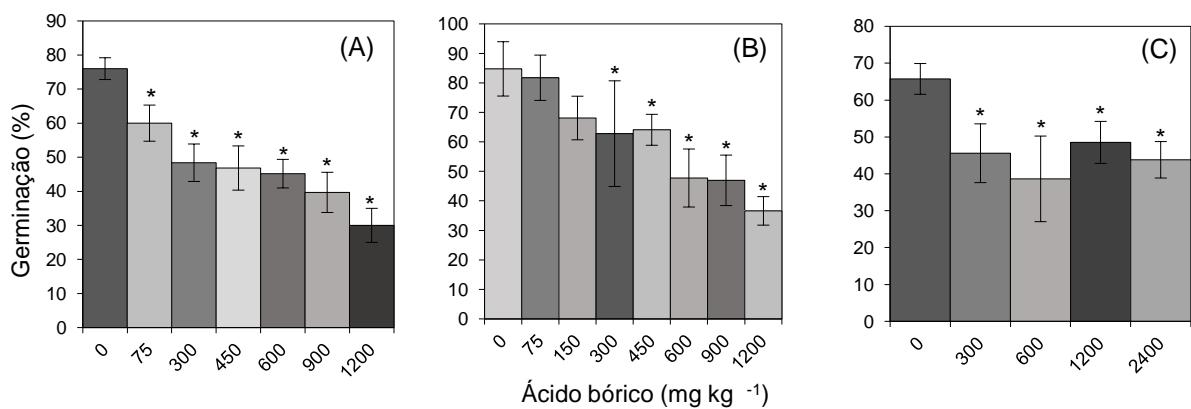
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os ensaios conduzidos o número médio de esporos recuperados por u.e. foi superior a 25 (dados não apresentados). Nos ensaios com a substância referência, apenas *G. margarita* não apresentou germinação superior a 75% no tratamento controle, considerado o critério de validação do protocolo ISO 10832:2009 (ISO, 2009). O ácido bórico causou a inibição da germinação de esporos de todas as espécies testadas (Figura 1). *R. clarus* teve a germinação inibida a partir da primeira concentração testada. A germinação no tratamento controle atingiu 76% ($\pm 3,2$) e a Cl_{50} estimada foi 914 mg kg^{-1} ($IC_{95\%}$: 561 - 1266). Para *G. albida*, a germinação no controle atingiu média de 85% ($\pm 9,2$) e a Cl_{50} 969 mg kg^{-1} ($IC_{95\%}$: 724 - 1213). Em *G. margarita*, a germinação média do controle foi de 66% ($\pm 4,2$) e a Cl_{50} estimada foi superior a última concentração testada ($Cl_{50} > 2400 \text{ mg kg}^{-1}$). Apesar de *G. margarita* não ter atingido o percentual de germinação sugerido no protocolo ISO 10832:2009 para *Funneliformis mosseae*, é conhecido que a germinação pode variar com a alteração do substrato e essa resposta parece ser espécie-específica, o que sugere que as condições experimentais dos testes devam ser ajustadas da melhor forma em cada situação (Mallmann et al., 2018). Nesse sentido, optou-se por manter *G. margarita* na rodada de ensaios em solo natural.

Com relação as concentrações de inibição, os resultados diferem de Mallmann et al. (2018) para *G. albida*. Os autores definiram Cl_{50} de $359,84 \text{ mg kg}^{-1}$, valor mais de 2,5 vezes inferior ao encontrado em nosso estudo. Para *R. clarus*, os mesmos autores estimaram uma Cl_{50} de $684,27 \text{ mg kg}^{-1}$ ($IC_{95\%}$: 642,28–726,26), o que coincide com a encontrada nesse estudo, considerando a variação dos intervalos de confiança. O fato sugere que a utilização de *R. clarus* possa ser mais adequada para ensaios ecotoxicológicos no quesito da padronização dos ensaios. Apesar de que a maior parte das condições experimentais utilizadas foram as mesmas, o tempo de estocagem do inóculo e a dormência dos esporos podem ter influenciado na diferença observada, uma vez que os esporos de *G. albida* foram utilizados em nossos ensaios após um período “curto” de armazenagem a 4 °C. Juge et al (2002) demonstraram que o tempo de estocagem superior a 14 dias aumentou a germinação de esporos de *Glomus intraradices* comparado a 0, 3 ou 7 dias de estocagem, o que foi atribuído a alterações fisiológicas no esporo que ocasionaram a quebra da dormência. Diversos outros estudos relacionaram o tempo de estocagem com a germinação de esporos, com respostas variáveis e espécie-

dependentes (Louis & Lim, 1988; Gazey et al., 1993; Giovannetti et al., 2001). Apesar de resultados preliminares apontarem que a germinação de *G. albida* em SAT foi estável ao longo de 5 anos de estocagem (Mallmann, 2023), a menor taxa de germinação dessa espécie no tratamento controle em comparação aos 96% de germinação relatados por Mallmann et al. (2018), pode indicar um possível efeito de dormência sobre a germinação da espécie. Ainda, não é possível descartar os efeitos da variabilidade genética, dado que é possível de ocorrência até mesmo em indivíduos dentro de um mesmo isolado fúngico (Ehinger et al., 2012; Sbrana et al., 2018). Ambas as questões levantam a necessidade de maior elucidação visto a influência negativa que podem causar sobre o imperativo de padronização dos ensaios ecotoxicológicos.

Figura 1 - Percentagem de germinação de esporos de (A) *Rhizophagus clarus*, (B) *Gigaspora albida* e (C) *Gigaspora margarita* em SAT contaminado com concentrações crescentes de ácido bórico. Asteriscos indicam diferença significativa para o controle pelo teste de Dunnet ($p<0,05$). Barras indicam o desvio padrão da média.



A germinação de todas as espécies foi superior a 75% no tratamento controle dos ensaios em Latossolo com piraclostrobina e fipronil (Figura 2). Especificamente, apenas *G. albida* não ultrapassou 80% de germinação no tratamento controle nos ensaios com piraclostrobina (76% [$\pm 9,7$]), enquanto *R. clarus* e *G. margarita* atingiram 80% ($\pm 6,7$) e 81% ($\pm 7,7$), respectivamente. Nos ensaios com fipronil, sob mesmas condições experimentais, as respostas de germinação no solo controle foram de 88% ($\pm 3,5$), 84% ($\pm 10,2$) e 81% ($\pm 5,7$) para *G. albida*, *R. clarus* e *G. margarita*, respectivamente. Apesar de não atingir a germinação necessária em

SAT, *G. margarita* obteve sucesso em solo natural, enfatizando que o comportamento da germinação de uma mesma espécie varia conforme o substrato utilizado (Maia et al., 2001), o que deve ser levado em consideração na montagem de esquemas experimentais.

A piraclostrobina reduziu significativamente a germinação de todos os fungos testados (Figura 2), sendo *G. albida* a mais sensível entre as espécies, com a menor concentração de efeito observada (CEO) de 50 mg kg^{-1} e Cl_{50} de $61,23 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC95%: 28,84 – 93,62). Para *G. margarita*, a germinação foi inibida significativamente a partir da concentração 5 mg kg^{-1} , no entanto, a Cl_{50} foi estimada em $109,86 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC95%: 80,64 – 139,38). Para *R. clarus*, a CEO foi de 50 mg kg^{-1} e Cl_{50} estimada foi superior a última concentração testada. Avaliando os efeitos de concentrações crescentes de azoxistrobina e uma formulação comercial (Amistar ®) sobre *Rhizophagus irregularis*, Buysens et al. (2015) demonstraram que ambas as substâncias causaram inibição da germinação de esporos em relação ao controle a partir de 1 mg L^{-1} , em meio MSR. Identificou-se, ainda, efeito fungistático das substâncias, uma vez que os esporos não germinados foram capazes de germinar após transferidos para meio não contaminado. Amistar ® também reduziu a produção de esporos no substrato a partir de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, em sistema de cultura *in vitro*. Assim como a azoxistrobina, a piraclostrobina atua inibindo a respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e citocromo c1, prejudicando a produção de ATP, causando ultimamente a morte da célula fúngica (Fernández-Ortuño et al., 2008). Corroborando com Buysens et al (2015), Rodriguez-Morelos (2021) identificaram efeitos negativos de 2 mg L^{-1} de azoxistrobina sobre a capacidade de recuperação do micélio extrarradicular de *Gigaspora* sp. e *R. irregularis* em ensaio *in vitro*, em meio MSR. A formação de anastomoses e produção de esporos de *R. irregularis* também foi reduzida em meio MSR contaminado com 2 mg L^{-1} de azoxistrobina – influenciada pela própria redução do comprimento do micélio, enquanto $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ não causou efeito significativo (Rodriguez-Morelos et al., 2023).

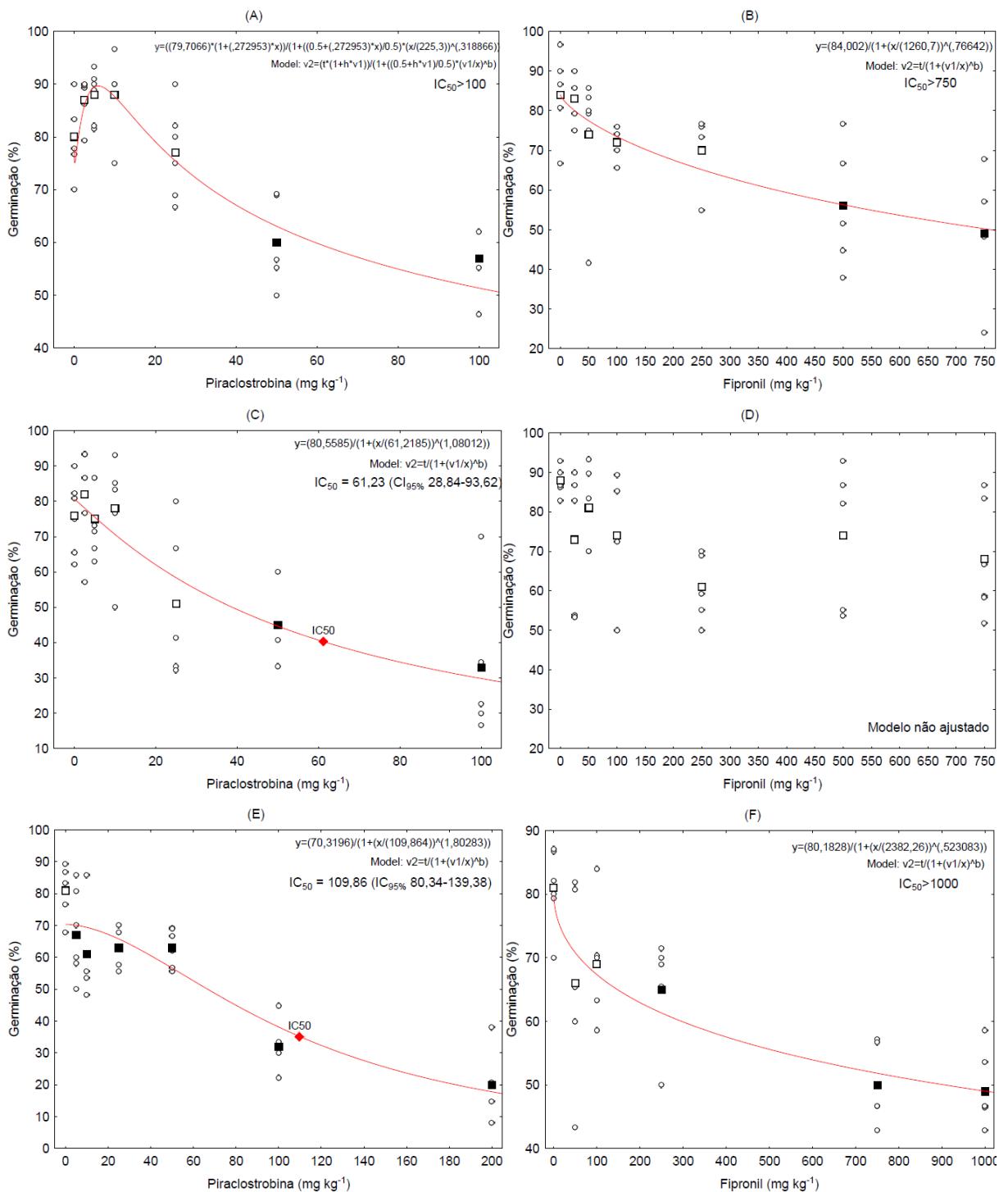
Outros estudos atestaram efeitos de estrobilurinas sobre FMAs. Campos et al. (2015), avaliando o efeito de diferentes fungicidas sobre a colonização radicular e produção de esporos de comunidade nativa de FMAs, demonstraram que duas aplicações de doses correspondentes a 120 g ha^{-1} de Amistar® (azoxistrobina), 75 g ha^{-1} de Comet® (piraclostrobina) e 225 g ha^{-1} de Flint 550 WG® (trifloxistrobina),

independentemente, não causaram efeitos negativos sobre a produção de esporos contados no substrato aos 67 dias após a semeadura de feijão, em ensaio em casa de vegetação. A colonização micorrízica, no entanto, foi significativamente reduzida pelas aplicações de piraclostrobina, ressaltando a variabilidade da resposta entre diferentes *endpoints*. De forma similar, Vuyyuru et al. (2018) demonstraram que a aplicação de 0,296 kg i.a. ha⁻¹ de azoxistrobina (Quadris ®) em sulco na cana de açúcar cultivada em solo natural não afetou a produção de esporos da comunidade nativa, mas reduziu a colonização radicular e a abundância de biomarcadores de PFLA de FMAs em relação ao tratamento controle. Em ensaio em casa de vegetação, utilizando três diferentes Cambissolos naturais, Riedo et al (2023) demonstraram que a máxima dose recomendada pelo fabricante de azoxistrobina reduziu a abundância de marcadores genéticos de FMAs, apesar do efeito ter sido transitório e não evidente ao final do período experimental (56 dias).

A ausência de estudos avaliando efeitos de estrobilurinas sobre a germinação de esporos em solo natural é impeditivo para compararmos nossos resultados, dado a divergência das características físico-químicas para meios artificiais. Diferentemente de Buysens et al (2015), nosso estudo indica que concentrações muito superiores de piraclostrobina foram necessárias para inibir a germinação dos esporos em solo natural em relação aos efeitos da azoxistrobina sobre *R. irregularis* em meio MSR, exceto para *G. margarita*, que teve germinação inibida já na concentração de 5 mg i.a. kg⁻¹. Apesar de que a piraclostrobina pareça apresentar maior toxicidade a organismos do que a azoxistrobina (Lewis et al., 2016; Kovačević et al., 2021), é sabido que a biodisponibilidade das substâncias é alterada por características do solo, como matéria orgânica, pH e teor de argila (Van Gestel, 2012), o que afeta diretamente a exposição dos organismos (Kamoun et al., 2018; Daam et al., 2019) e pode ter sido fator preponderante para as diferenças observadas.

Figura 2 - Gráficos de dispersão do efeito de doses crescentes de piraclostrobina e fipronil sobre (A)(B) *Rhizophagus clarus*, (C)(D) *Gigapsora albida* e (E)(F) *Gigaspora margarita*, respectivamente, sob Latossolo. Linha vermelha representa modelo de regressão não-linear que melhor se ajustou aos dados, indicado em cada gráfico. As médias da resposta de germinação estão representadas pelos quadrados. Quadrados preenchidos significam diferença estatística para o controle pelo teste de

Dunnet ($p<0,05$). Quando não houve diferença estatística em nenhuma concentração testada, não houve ajuste de modelo.



Reddy et al (2013) demonstraram que o tempo de meia vida da piraclostrobin em 4 diferentes solos variou de 9,2 a 47 dias em incubação a 25 °C, sendo a umidade, matéria orgânica e população microbiana fatores de influência sobre o comportamento do pesticida. A taxa de dissipação foi maior em um

Cambissolo com alto teor de C (C orgânico = 2,46%), ante ao mesmo solo natural e outro tratamento com remoção parcial do carbono. No Latossolo utilizado em nosso experimento, apesar de estéril, o alto teor de argila (40% v/v) e a matéria orgânica (3,8% m/v) podem ter influenciado a disponibilidade do pesticida, dado que a adsorção do i.a. está positivamente correlacionada com esses componentes (Reddy et al., 2013b). Apesar de que as informações citadas elucidem o comportamento do agrotóxico e sugiram que sua dinâmica possa ser muito diferente de um solo natural para um solo artificial ou meio de cultura, por exemplo, ressalta-se que o produto testado em nosso estudo possui outro composto além do i.a., o que pode alterar significativamente sua dinâmica no solo.

Considerando a dose recomendada de Comet ® de 0,8 l ha⁻¹, uma única aplicação e nenhuma interceptação pela parte aérea (i.e., “pior cenário”), a PEC foi estimada em 0,27 mg kg⁻¹ para piraclostrobina. A relação entre a PEC e as Cl₅₀ demonstram que a taxa de toxicidade é reduzida quando comparada ao nível da exposição, evidenciado pela magnitude da TER (Tabela 3). Os dados indicam que os efeitos negativos da piraclostrobina sejam improváveis sobre as espécies testadas em condições de campo em Latossolos brasileiros, respeitando-se as recomendações de aplicação, dado que outros fatores (interceptação, deriva, lixiviação, volatilização, degradação microbiana etc.) podem aliviar o estresse causado quando comparado a exposição direta em laboratório. Entretanto, efeitos negativos em concentrações reduzidas, como observado em *G. margarita*, levantam dúvidas acerca da extensão dos impactos na germinação para o posterior desenvolvimento da simbiose e não descartam, portanto, a necessidade de novos estudos no tema. A persistência moderada do agrotóxico no solo em conjunto com alto coeficiente partição octanol água (LogP = 3,99) e baixo potencial de lixiviação, de acordo com o índice GUS de potencial de lixiviação (Lewis et al., 2019), sugerem que ensaios com maior tempo de duração possam ser úteis no entendimento dos efeitos sobre a fase pré-simbiótica, assim como testes de viabilidade dos esporos, uma vez que a não-germinação em meio contaminado não necessariamente significa a morte do esporo (Sweeney et al., 2022; Buysens et al., 2015).

O inseticida fipronil causou inibição na germinação de *R. clarus* e *G. margarita* (Figura 2). A menor CEO observada entre as espécies foi de 250 mg kg⁻¹ em *G. margarita*. Apesar desse estudo ser o primeiro avaliando efeito dessa substância sobre FMAs, diversos estudos foram conduzidos atestando efeitos de fipronil sobre

outros organismos, como bactérias (Guima et al., 2023), minhocas (Alves et al., 2013), colêmbolos (Alves et al., 2014; Zórtea et al., 2017), enquitreídeos (Zórtea et al., 2018; Triques et al., 2021), abelhas (Farder-Gomes et al., 2021) e organismos aquáticos (Pisa et al., 2015; Bownik et al., 2021). Altamente tóxico para humanos, pássaros e abelhas, fipronil atua de forma sistêmica nas plantas tornando-as tóxicas para diversos tipos de insetos, com efeito sobre o sistema nervoso central (Simon-Delso et al., 2015). Persistente nos ambientes, a meia-vida do fipronil pode variar de 122 a 128 dias em laboratório e de 3 a 7,3 meses em condições de campo (Bonmatin et al., 2015). Ainda, possui baixa mobilidade no solo e sua dissipaçāo ocorre através de fotodegradação, hidrólise e volatilização (Fent, 2014). Apesar de fazer parte de um grupo químico distinto (fenil-pirazol) dos neonicotinoides, fipronil é comumente tratado em conjunto com aqueles inseticidas, visto suas semelhanças como alta persistência, natureza sistêmica, versatilidade na aplicāo – especialmente tratamento de sementes, alta solubilidade em água, entre outros (Simon-Delso et al., 2015; Bonmatin et al., 2015).

Tabela 3 - Menor concentração de efeito observada (CEO), concentração de inibição para 50% da população (CI₅₀), concentração ambiental prevista (PEC), e taxa de toxicidade-exposição (TER) para germinação de esporos em ensaios com piraclostrobina e fipronil.

Agrotóxico/Espécie FMA	CEO ¹	CI ₅₀ ¹	PEC ¹	TER
Piraclostrobina (Comet ®)			0,27	
<i>R. clarus</i>	50	>100		>370,4
<i>G. albida</i>	50	61,23 (IC ₉₅ 28,84-93,62)		226,8
<i>G. margarita</i>	5	109,86 (IC ₉₅ 80,34-139,38)		403,7
Fipronil (Source ®)			0,033	
<i>R. clarus</i>	500	>750		>22500,0
<i>G. albida</i>	-	-		-
<i>G. margarita</i>	250	>1000		>30000,0

¹ Valores em mg kg⁻¹.

Malfatti et al (2023) demonstraram que dois inseticidas neonicotinoides causaram efeitos negativos sobre a germinação de *R. clarus* e *G. albida* em solo artificial tropical. Imidacloprid reduziu a germinação de ambas as espécies na primeira concentração testada (10 mg kg⁻¹), assim como thiametoxan para *R. clarus*.

A Cl_{50} estimada para o efeito de imidacloprid sobre *R. clarus* foi de 10 mg kg⁻¹ (Cl_{95%} 0-21,5) e de thiametoxan 27 mg kg⁻¹ (Cl_{95%} 9,1-45,4). *R. clarus* foi mais sensível que *G. albida* para ambas as substâncias testadas. Em nosso estudo, *R. clarus* apresentou maior sensibilidade que *G. albida* para fipronil, corroborando com os resultados de Malfatti et al (2023). *G. albida* também apresentou a menor sensibilidade entre as três espécies testadas sob os efeitos da piraclostrobina, similar ao encontrado por Mallmann et al (2018) e Malfatti et al (2021) para os fungicidas clorotalonil, mancozebe, metalaxyl e herbicidas glifosato e diuron+paraquate em SAT. Os resultados parecem suportar que *R. clarus* apresenta maior sensibilidade a inseticidas, enquanto a germinação de esporos de *G. albida* é mais afetada por fungicidas. As razões fisiológicas ou genéticas para tal resposta, no entanto, demandam maior esclarecimento.

Considerando a dose recomendada do produto comercial (Source ®) para o tratamento de sementes da cultura da soja de 200 mL p.c./100kg de semente e o uso de 50 kg sementes por hectare, a PEC estimada para fipronil é de 0,033 mg kg⁻¹. Para *R. clarus* e *G. margarita*, cujas Cl_{50} estimadas ficaram acima da última concentração testada, a TER calculada foi de magnitude superior a 10⁴ vezes, o que indica que o risco dessa substância as espécies testadas em Latossolos brasileiros é mínimo (Tabela 3). Mesmo caso considerássemos a concentração da menor CEO observada, a relação com a exposição ainda seria muito elevada em termos absolutos, mantendo mínima probabilidade de risco. Claramente, as evidências corroboram para o exposto, assim como afirmado para os efeitos da piraclostrobina – e especialmente pelos ensaios terem se dado em solo natural, que agrega a complexidade desse componente. No entanto, a ausência de fatores de extração (“assessment factors”) para ensaios com FMAs de alguma forma limitam tais afirmações (Sweeney et al., 2022), bem como os possíveis contrastes existentes na resposta entre diferentes *endpoints* oriundos de etapas e/ou estruturas distintas do ciclo de vida dos organismos (Schreiner & Bethlenfalvay, 1997). Nesse sentido, estudos graduando relações entre testes de laboratório e condições de campo ou semi-campo seriam um importante passo na ecotoxicologia de FMAs (Sweeney et al., 2022), assim como o conhecimento da variabilidade da resposta entre diferentes *endpoints* fúngicos.

4.4 CONCLUSÃO

A piraclostrobina reduz a germinação de *R. clarus*, *G. albida* e *G. margarita* em Latossolo, enquanto o inseticida fipronil inibe o desenvolvimento de *R. clarus* e *G. margarita*. Apesar disso, as elevadas taxas de toxicidade-exposição apresentadas, mesmo em um cenário de exposição extremo e considerando as práticas de aplicação recomendadas indicam que é improvável que a piraclostrobina e fipronil representem um risco às espécies testadas em situações de campo em Latossolos brasileiros. No caso do fipronil, a menor exposição em decorrência do uso em tratamento de sementes contribui para redução do risco. A espécie *G. albida* demonstra maior sensibilidade à piraclostrobina dentre as espécies testadas e, no entanto, não sofre inibição do inseticida fipronil, o que reenfatiza a necessidade de se avaliar mais de um cenário de espécie e agrotóxico.

A utilização de solos naturais introduz um refinamento aos dados dos ensaios ecotxicológicos considerados como “Tier I” – que geralmente utilizam solos artificiais ou meios de cultura. O uso da matriz natural amplia a relevância prática e aplicação ecológica dos ensaios de germinação de esporos ao incorporar a complexidade desse componente no conjunto de fatores que influenciam a determinação das concentrações de efeito de agrotóxicos sobre FMAs. Diferenças no comportamento entre espécies indicam que a escolha da espécie teste e condições experimentais tenham que ser averiguadas caso-a-caso. Contudo, os ensaios de germinação de esporos com *R. clarus*, *G. albida* e *G. margarita* em solos naturais são uma alternativa para inclusão em avaliações de risco ecológico de agrotóxicos, fornecendo subsídios para caracterização do risco e incluindo um novo grupo de organismos-chave em esquemas de ARE.

5 EFEITOS DE MANCOZEBE SOBRE O CICLO DE VIDA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM UM LATOSOLO

5.1 INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares são um grupo-chave de organismos do solo, envolvidos em processos fundamentais nos ambientes, influenciando a ciclagem de nutrientes (Van der Heijden et al., 2015), com papel na estocagem do carbono (Treseder; Allen, 2000; Jansa; Treseder, 2016), melhoria na nutrição do fósforo (Hodge et al., 2010) e favorecimento da agregação do solo, especialmente através do micélio extrarradicular (Rillig; Mumme, 2006; Leifheit et al., 2014). Além de potencial ferramenta na restauração de ecossistemas degradados, dado sua tolerância a estresses abióticos, os FMAs podem ser considerados indicadores da qualidade ambiental (Lenoir et al., 2016). Reconhecendo a importância desse grupo de organismos na manutenção dos ecossistemas, inclusive agrícolas, o comitê científico da autoridade de segurança alimentar da União Europeia (EFSA) sugeriu o uso de FMAs em esquemas de avaliação de risco ecológico (ARE) de pesticidas no bloco (Ockleford et al, 2017). No Brasil, um dos maiores produtores mundiais de alimentos e consumidor de agrotóxicos, apenas ensaios ecotoxicológicos com minhocas e “microrganismos envolvidos na ciclagem de nutrientes” são exigidos para o registro de novas substâncias (IBAMA, 1996).

Considerando a fase pré-simbiótica do ciclo de vida dos FMAs, diversos estudos demonstraram que a germinação de esporos pode ser prejudicada pelo efeito de fungicidas (Chiocchio et al., 2000; Zocco et al., 2008; Mallmann et al., 2018), inseticidas (Menendez et al., 1999; Malfatti et al., 2023) e herbicidas (Malty et al., 2006; Pasaribu et al., 2013; Malfatti et al., 2021). Não diferente, variáveis da etapa simbiótica também podem sofrer efeitos negativos da aplicação de agrotóxicos. De Novais et al. (2019) demonstraram que os fungicidas benomil e fenchexamid inibiram o crescimento micelial de *F. mosseae*, afetando a viabilidade e induzindo a ramificação anormal em concentrações inferiores ao recomendado para uso comercial, em ensaio em meio de quartzo estéril. Semelhante, 1 mg L⁻¹ de flutolanil reduziu a colonização radicular de *Solanum tuberosum* por *Rhizophagus irregularis* (Buysens et al., 2015). Ainda, a azoxistrobina inibiu o desenvolvimento do

micélio extrarradicular e a produção de esporos de *R. irregularis* em meio MSR com cultura de raízes (Buyssens et al., 2015).

Apesar dos avanços e crescente interesse pelo tema, a ecotoxicologia de FMAs ainda enfrenta diversos desafios para o estabelecimento de protocolos experimentais padronizáveis e replicáveis. Nesse sentido, pesquisadores têm investido na busca de adaptações metodológicas, com a utilização de diferentes *endpoints*, moléculas, substratos, espécies e diferentes condições experimentais (Mallmann et al., 2018; Hage-Ahmed et al., 2019). A germinação de esporos tem sido utilizada como *endpoint* para avaliar o efeito de substâncias sobre a fase pré-simbiótica dos FMAs, com sucesso em caracterizar respostas dose-dependentes (ver Malfatti et al., 2021). A despeito da importância fundamental da utilização de meios artificiais, que são facilmente padronizáveis e geralmente simulam o pior cenário de exposição possível, a relevância ecológica dos resultados encontrados é geralmente limitada. Dessa maneira, a utilização de uma matriz natural pode gerar maior embasamento para extrapolações sobre o quanto os efeitos na fase pré-simbiótica podem ser significativos na fase simbiótica, em cenário de maior realismo, funcionando como um refinamento para os ensaios de Tier I nos casos em que a relevância ecológica seja ponto de interesse. Isso é ainda mais crítico visto que não existem técnicas de amplo conhecimento para avaliação da germinação de esporos em condições de campo ou semi-campo, o que pode impedir o processo de calibração entre as etapas *lower* para *higher-tiers* (Sweeney et al., 2022). Nesse sentido, compreender as relações, caso existentes, entre a germinação de esporos e variáveis simbióticas em solos naturais, ampliaria o entendimento do risco das substâncias aos organismos, dando suporte para uma interpretação mais abrangente dos resultados de fase pré-simbiótica.

Entre as variáveis simbióticas frequentemente empregadas para avaliar o efeito de agrotóxicos sobre FMAs estão aquelas referentes a características do micélio extrarradicular (Campagnac et al., 2009; Zocco et al., 2010) e a colonização radicular (Buyssens et al., 2015; Jakobsen et al., 2021). Diversos métodos visando avaliar tais *endpoints* podem ser conduzidos, variando entre sistemas *in vitro* com utilização de raízes modificadas, *rhizoboxes* com compartimentos de raiz e hifas separadas, ensaios em vasos ou estudos de campo. Todos os métodos possuem vantagens e limitações, mas as diferenças marcantes entre eles tornam difíceis as comparações entre os resultados (Hage-Ahmed et al., 2019). Apesar do potencial

desafio em aumentar o nível de padronização dos ensaios de fase simbiótica, uma vez que diversos fatores influenciam na composição de um sistema experimental com FMAs (ver Mallmann et al., 2018), o fato colaboraria para dar suporte a comparações mais assertivas entre resultados de diferentes estudos. Dentre outras características fundamentais para ensaios *lower tier*, como a possibilidade de padronização dos organismos-teste, facilidade de manipulação, possibilidade de avaliação da magnitude dos efeitos, entre outras (ver EFSA, 2017), a utilização de solos naturais seria fator positivo, dado que impõe maior realismo e relevância prática nos resultados (Niemeyer et al., 2017), além de fornecer maior subsídio para extrações teóricas (Sweeney et al., 2022).

No Brasil, há carência ou ausência de dados referentes aos impactos causados por agrotóxicos sobre os FMAs em solos naturais, inclusive sobre a ordem mais representativa de solos do país – os Latossolos. Essa ordem engloba cerca de 39% da extensão territorial nacional e está disseminada por praticamente todas as regiões (EMBRAPA, 2023), predominando sobre o bioma Cerrado, ecossistema sob intensa pressão pela exploração agropecuária e que dá suporte a cerca de 40% da produção agrícola nacional (Cunha et al., 2008; EMBRAPA, 2023). Assim como outros organismos, diversas famílias de FMAs estão presentes nos mais variados tipos de uso do solo em Latossolos (Ferreira et al., 2012) e, portanto, sujeitas as pressões antrópicas sobre esses ecossistemas. Dados relacionados a dinâmica de agrotóxicos sobre as FMAs nos Latossolos brasileiros seriam valiosos para a compreensão dos níveis de exposição e risco enfrentados por esses organismos nos ambientes agrícolas do país.

Dentre diversas moléculas utilizadas na agricultura, o fungicida mancozebe (manganese ethylenebis(dithiocarbamate), CAS 8018-01-7) é conhecido mundialmente e foi o ingrediente ativo fungicida mais comercializado no Brasil em 2021, com cerca de 50,3 milhões de toneladas (IBAMA, 2023). Integrante do grupo dos ditiocarbamatos, mancozebe é um fungicida de contato com ação preventiva e multissítio, de baixa persistência no solo, utilizado sozinho ou em conjunto com outros ativos contra diversas doenças fúngicas em diversos cultivos comerciais (Gullino et al., 2010; Lewis et al., 2016). A toxicidade do i.a. se dá pela inibição da atividade enzimática nos fungos pela formação de complexos com enzimas envolvidas na formação do ATP (Thiruchelvam, 2005). Apesar de utilizado para o controle de fungos fitopatogênicos, mancozebe pode possuir efeito negativo sobre

os FMAs, como demonstrado por Channabasava et al (2015), onde a colonização radicular de plantas de painço e a produção de esporos no solo foram reduzidas pela aplicação de mancozebe, comparado ao tratamento controle, em ensaio em casa de vegetação. Rejali et al (2022) também demonstraram que a aplicação de 0,5 mg L⁻¹ de mancozebe misturado em meio MS reduziu a colonização radicular de raízes modificadas de cenoura e a produção de esporos por *Rhizophagus irregularis*. Apesar disso, a colonização radicular de plantas de milho e trigo cujas sementes foram tratadas com 2 g L⁻¹ de mancozebe não foi afetada em ensaio em potes. Efeitos negativos também foram demonstrados na fase pré-simbiótica, onde mancozebe causou a redução da germinação de esporos de *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora albida* a partir da concentração de 10 mg kg⁻¹, em solo artificial tropical (Mallmann et al., 2018).

Apesar da ampla utilização no país, possíveis efeitos de mancozebe sobre o ciclo de vida de FMAs em solos brasileiros é desconhecido. Nesse sentido, nosso objetivo foi avaliar o efeito de mancozebe (Manzate ®) sobre a fase pré-simbiótica e simbiótica de *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora albida* e *Gigaspora margarita* em um Latossolo vermelho. Buscamos determinar as concentrações de inibição (CI₅₀) para todas as variáveis testadas e avaliar a adequabilidade do uso de um solo natural em ensaios ecotoxicológicos *in vivo* com FMAs. Ainda, objetivamos identificar as relações da sensibilidade ao agrotóxico entre os diferentes *endpoints* testados (germinação de esporos, comprimento total do micélio extraradicular e colonização radicular).

As hipóteses são de que o mancozebe (Manzate ®) causa a redução da germinação de esporos e afeta negativamente as variáveis simbióticas de forma diferenciada para as espécies *R. clarus*, *G. albida* e *G. margarita* em Latossolo. Ainda, a germinação de esporos é mais sensível ao mancozebe do que os *endpoints* de fase simbiótica (colonização radicular e comprimento total do micélio extrarradicular) e a magnitude da relação é dependente da espécie fúngica. Por fim, o uso de Latossolo natural possui aplicabilidade prática em ensaios ecotoxicológicos *in vivo*.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Solo e organismos

Culturas puras de *Rhizophagus clarus* (RJN120A, *Glomeraceae*), *Gigaspora albida* (SCT200A, *Gigasporaceae*) e *Gigaspora margarita* (SCT077A, *Gigasporaceae*) foram obtidas através da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota – CICG (CICG, 2023) e multiplicadas para obtenção de maior número de inóculo através da técnica dos vasos-armadilha (Stutz & Morton, 1996) adaptada. Vasos de 1,5 litros foram preenchidos com mistura homogênea de solo:areia:vermiculita expandida (1:1:1), previamente esterilizados em 3 ciclos de autoclavagem (60 minutos, 1 atm, 120°C), e semeados com sementes de *Brachiaria brizantha*, externamente desinfectadas em imersão em solução de HCl 10%, por 5 minutos. Após cerca de 120 dias, o inóculo foi avaliado e, na ausência de contaminação externa, recolhido, permanecendo armazenado em 4 °C até o uso. Para o inóculo de *R. clarus*, o período máximo entre a recolha do inóculo e o uso experimental foi de até 2 anos. Para *G. albida* e *G. margarita*, o período não foi superior a 1 mês.

Para condução dos ensaios, um Latossolo vermelho foi coletado em região de mata nativa, com ausência de histórico de qualquer forma de contaminação, na região de Chapecó, Santa Catarina, Brasil. As amostras foram coletadas na profundidade de 0 a 0,20 m, secas em temperatura ambiente, peneiradas (2 mm) e armazenadas. Foi realizada a calagem do solo utilizando carbonato de cálcio (CaCO_3) a fim de elevar o pH a níveis mais próximos ao recomendado para cultivos comerciais. As características físico-químicas do solo após a calagem estão dispostas na Tabela 4. A concentração de argila foi determinada através de densiometria. O pH em água através de potenciometria. Conteúdo de P foi determinação pelo método Mehlich-1 e posterior colorimetria, enquanto o teor de K foi determinado através de Mehlich-1 seguido de avaliação em fotômetro de chamas. A matéria orgânica foi determinada por espectroscopia. Al, Ca, e Mg foram determinados em KCl seguido de espectrofotometria de absorção atômica.

Tabela 4 - Características químicas e físicas do Latossolo vermelho submetido a correção de pH.

Propriedades	Latossolo
Matéria Orgânica (mg dm ⁻³)	4,4
pH (água)	5,1
CTC pH 7 (cmol _c dm ⁻³)	16,55
Al (cmol _c dm ⁻³)	0,7
H + Al (cmol _c dm ⁻³)	7,74
Ca (cmol _c dm ⁻³)	4,7
Mg (cmol _c dm ⁻³)	3,9
P (mg dm ⁻³)	4,6
K (mg dm ⁻³)	96
Argila (%)	48
Capacidade de retenção de água (%)	76

5.2.2 Testes *in vitro*

Inicialmente, um ensaio de germinação com ácido bórico foi realizado para validar a condição do inóculo de cada espécie fúngica testada (Mallmann et al., 2018). As concentrações utilizadas foram de 0; 75; 300; 450; 600; 900; 1200 mg kg⁻¹ para *R. clarus* e *G. albida* e 0; 300; 600; 1200; 2400 mg kg⁻¹ para *G. margarita*. O substrato utilizado foi o solo artificial tropical – SAT (5% fibra de coco, 20% caulinita, 75% areia fina) (Garcia, 2003), sendo as demais características experimentais semelhantes aos ensaios com o ingrediente ativo, descrito a seguir. Foram realizados ensaios de germinação de esporos avaliando o efeito de concentrações crescentes de Manzate ® WG (UPL OpenAg), ingrediente ativo (i.a.) mancozebe (75%), sobre cada uma das três espécies fúngicas citadas. As concentrações testadas foram de 0; 1,5; 3; 9; 27; 54; 81 mg i.a. kg⁻¹ solo seco, baseadas em ensaios de fase pré-simbiótica conduzidos por Mallmann (2020). Preparou-se uma solução estoque a partir do produto comercial e a contaminação do solo foi realizada com a quantidade correspondente a concentração nominal desejada. A umidade do solo foi ajustada para 40% da capacidade de retenção de água.

Os testes de germinação de esporos foram conduzidos conforme protocolo ISO 10832:2009 (ISO, 2009), com adaptações de Mallmann et al. (2018). Esporos foram extraídos dos inóculos através da peneiragem úmida (Gerdemann e Nicolson, 1963), seguida de centrifugação em gradiente de sacarose (20 e 60%). Para cada

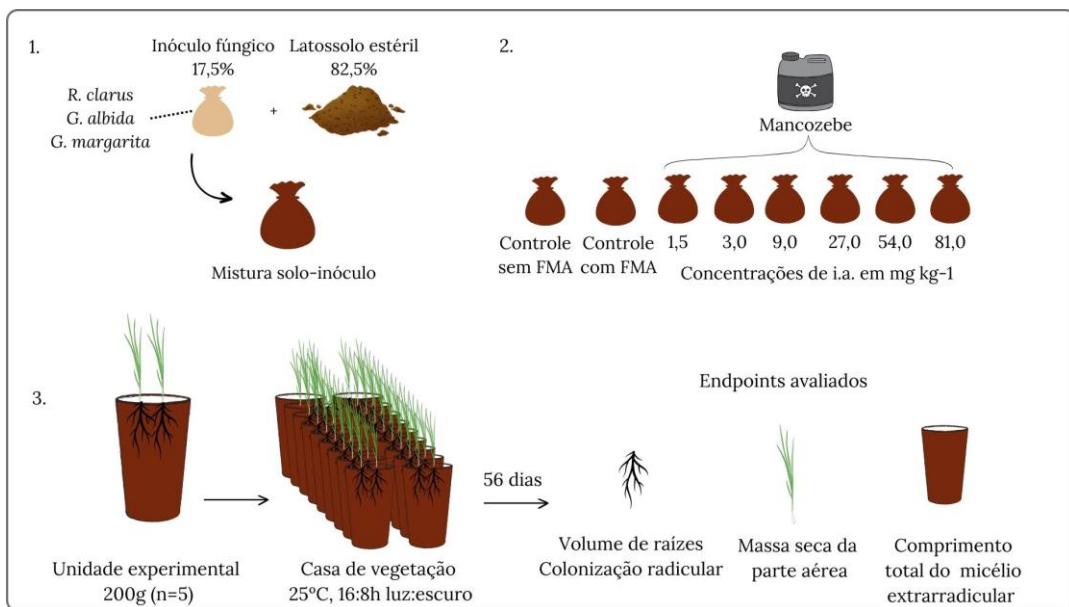
unidade experimental (u.e.), foram selecionados 30 esporos íntegros e posicionados aleatoriamente em uma membrana de nitrocelulose (47 mm diâmetro, 0,45 µm poros, 3 mm grids). Sobre a membrana contendo os esporos, outra membrana umedecida foi posicionada, formando o chamado “sanduíche de esporos”, o qual foi colocado entre duas camadas de 40 g de Latossolo, em uma placa de Petri. Após, cada placa de Petri foi envolta em filme plástico para evitar a perda de umidade e transferida para incubadora tipo B.O.D a 28 °C ± 2, sem luz, onde permaneceram pelo período de 14 dias. Cada placa de Petri contendo um conjunto de 30 esporos foi considerada uma u.e. Para cada concentração de i.a. testado, foram elaboradas 6 repetições ($n=6$), totalizando 42 u.e. para cada espécie de FMA. As unidades experimentais foram distribuídas aleatoriamente na incubadora, em delineamento inteiramente casualizado. Após 14 dias, os “sanduíches” foram cuidadosamente removidos da placa e umedecidos com uma solução de ácido acético e tinta de caneta (5%) a fim de colorir as hifas para melhor visualização das estruturas. Posteriormente, as membranas foram avaliadas sob microscópio estereoscópico (50x). O número de esporos recuperados – que restaram na membrana – e o número de esporos germinados foram contados. Considerou-se germinado o esporo cujo comprimento do tubo germinativo foi no mínimo cinco vezes superior ao diâmetro do esporo. A % de germinação foi determinada pela fórmula $Ger (\%) = [(x*100/n)]$; onde x é o número de esporos germinados; n é o número de esporos recuperados. Os resultados foram considerados válidos quando a média do número de esporos recuperados $n > 25$ e a média de germinação nos tratamentos controle (sem agrotóxico) foi $x > 75\%$.

5.2.3 Testes *in vivo*

Foram conduzidos ensaios para avaliar o efeito de mancozebe sobre a fase simbótica dos FMAs. O esquema experimental está sintetizado na Figura 3. Vasos plásticos de coloração preta, cilíndricos, com capacidade de 200 ml foram preenchidos com uma mistura homogênea de 165 g de Latossolo e 35 g de inóculo fúngico para cada espécie testada (*R. clarus*, *G. albida* e *G. margarita*). A quantidade de inóculo fúngico utilizada na mistura foi previamente estabelecida através de testes que definiram a quantidade necessária para que plantas de alho-poró e tomate obtivessem colonização radicular igual ou superior a 50% em 14 dias.

O solo foi previamente esterilizado em 3 ciclos de autoclavagem (60 minutos, 1 atm, 120°C) e permaneceu em repouso por 14 dias até a montagem dos ensaios. O inóculo foi obtido através de culturas armadilhas conforme citado no item 6.2.2. Procedeu-se a mistura a seco do solo e inóculo e, após, a mistura homogênea foi contaminada com Manzate ® WG (UPL OpenAg), ingrediente ativo (i.a.) mancozebe (75%) nas concentrações de 0; 1,5; 3; 9; 27; 54; 81 mg i.a. kg⁻¹ solo seco, e a umidade ajustada para 40% da capacidade de retenção de água. As concentrações utilizadas foram as mesmas dos testes *in vitro*. Cada concentração testada contou com 5 réplicas (n=5). Para avaliar possíveis efeitos do mancozebe sobre as plantas, foi conduzido um tratamento sem a presença de inóculo fúngico, onde 200 g de Latossolo foram utilizadas por u.e., contaminados nas mesmas concentrações citadas (n=5). Sobre cada vaso foram plantadas 4 plântulas pré-germinadas de alho-poró (*Allium porrum*). As plântulas foram pré-germinadas em incubadora a 28°C até atingir cerca de 1 cm de radícula. As 40 unidades experimentais foram levadas para casa de vegetação, com temperatura de 25 °C ± 2 e iluminação de led, com fotoperíodo de 16h:8h de luz:escuro. As u.e. foram distribuídas aleatoriamente sobre as bancadas. Após 7 dias, procedeu-se o raleio das plantas, permanecendo 2 plantas por vaso até o final do experimento. A umidade das u.e. foi ajustada a cada três dias através da determinação da evapotranspiração por pesagem. Passados 56 dias do plantio, a parte aérea das plantas, raízes e o solo-mistura de cada u.e. foram coletados e armazenados a 4 °C para avaliações.

Figura 3 - Esquema visual do procedimento experimental utilizado. A numeração crescente indica a sequência das etapas.



5.2.3.1 Avaliação de variáveis fúngicas

As raízes das plantas foram avaliadas quanto a colonização radicular, conforme por proposto por Koske e Gemma (1989) e Vierheilig et al (1998) com ajuste de tempo para cada etapa. Inicialmente as raízes foram imersas em solução de KOH 10 % por 10 min em banho-maria à temperatura de 90 °C. Após, as amostras foram lavadas em água corrente para remover qualquer resíduo da solução e dispostas em solução de HCl 2 % por 50 minutos. A solução de HCl foi então removida e as amostras cobertas com uma solução de glicerol acidificado (500 ml glicerina, 450 ml água destilada, 50 ml HCl 1%) contendo 5% de tinta de caneta azul, deixadas em banho-maria à 90 °C por 5 minutos para coloração. Por fim, as raízes foram lavadas superficialmente para a remoção do excesso de corante e armazenadas em água destilada a 4 °C até avaliações. Para avaliação da colonização radicular, 10 fragmentos de raiz de cerca de 1 cm foram cortados aleatoriamente e dispostos sobre uma lâmina de microscopia (McGonile et al., 1990). O procedimento foi realizado para cada u.e. As lâminas foram observadas em microscópio óptico (400x), determinando a presença ou ausência de estruturas fúngicas em 100 pontos de observação. Foi considerado como ponto colonizado do fragmento, aquele que apresentou a presença de pelo menos uma estrutura fúngica (hifa, vesícula, arbúsculo ou esporo). Através dos resultados foi calculado a % de

colonização total e arbuscular das raízes, relacionando o número total de pontos lidos com os números de pontos onde se observou presença da estrutura fúngica.

A quantificação do comprimento de micélio extrarradicular total no substrato (CMET) foi realizada conforme descrito por Melloni (1996) e Melloni & Cardoso (1999). Da mistura solo-inóculo coletada de cada u.e., pesaram-se duas subamostras com 10 g cada, das quais uma foi usada para a extração do CMET e a segunda foi utilizada para determinação do seu teor de água após secagem em estufa (105 °C até peso constante). Resumidamente, a extração do micélio foi realizada conforme os procedimentos descritos a seguir. A amostra de solo foi disposta em um recipiente com 500 ml de água destilada e agitada manualmente por 30 segundos. Após 1 minutos de decantação, peneirou-se a suspensão formada em duas peneiras sobrepostas (diâmetro de 1 e 0,25 mm) para retirar impurezas e detritos da amostra. O filtrado foi recolhido e a operação de agitação manual e filtragem foi repetida por três vezes. O total filtrado (cerca de 1500 ml) foi transferido para um liquidificador e agitado durante 30 segundos na velocidade mínima, a fim de desagregar os componentes do filtrado. Após período de decantação de 2 minutos, 500 ml do sobrenadante foram retiradas e filtrados em uma peneira de 0,045 mm para retenção do micélio fúngico. O conteúdo retido nesta peneira foi filtrado em bomba de vácuo através de uma membrana quadriculada de nitrato de celulose (diâmetro 4,7 cm e porosidade de 0,45 µm). Um quadrado contendo 64 campos (8 x 8 quadriculados) foi previamente demarcado na membrana como sendo a área para posterior avaliação. A membrana foi colocada sob lâmina de vidro e levada para observação sob microscópio óptico (100x). A determinação do CMET foi procedida através da contagem do número de intersecções das hifas com as linhas horizontais e verticais de um grid acoplado na lente ocular, para cada um dos 64 campos da membrana. O grid continha 10x10 quadrículos de dimensões 1 mm x 1 mm. O número de intersecções obtidas foi transformado em comprimento de micélio (mm de comprimento por grama de solo seco) através da equação de Newman (1966), com a determinação das incógnitas da equação seguindo o exposto por Cardoso-Filho (1994), Melloni (1996) e Nogueira (1997). A equação final para determinação do CMET (mm g^{-1}) foi determinada como sendo $\text{CMET} = 9,4697 * n / (10 - \theta)$, onde n = número de intersecções lidas e θ = quantidade de água na amostra (g de água por g de solo).

Para se determinar um cenário de exposição dos organismos ao mancozebe e posterior comparação da toxicidade versus exposição, foi definida a concentração ambiental prevista (PEC) do agrotóxico no solo, de acordo com FOCUS (2017). As variáveis consideradas foram a densidade do solo seco ($1,5 \text{ g cm}^{-3}$), profundidade (5 cm), e taxa de interceptação do dossel (zero), simulando o pior cenário possível. Utilizando esses parâmetros, a quantidade de i.a. (mg kg^{-1}) estimada presente no solo após a aplicação em um único cultivo pode ser calculada pela fórmula $\text{PEC} = A/750$; onde A é a taxa de aplicação do i.a. (g ha^{-1}). A taxa de toxicidade-exposição (TER) foi determinada através da relação entre a concentração de inibição para 50% da população (CI_{50}) e a PEC.

5.2.3.2 Avaliação de planta

A parte aérea das plantas foi seca em estufa a 65°C até obtenção de peso constante. Após, foi realizada medição da massa seca da parte aérea (MSPA) em balança analítica. Para a obtenção das variáveis comprimento de raiz (cm) e volume de raiz (cm^3), foram obtidas imagens digitais das raízes através de um scanner (Epson®, modelo LA2400), e as análises procedidas pelo software WinRHIZO (Regent Instruments Inc.).

5.2.4 Análise estatística

Os dados obtidos de todos os ensaios foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett). Quando as premissas não foram atendidas, os dados da germinação de esporos foram transformados usando $[\text{asen}(\sqrt{x}/100)]$, dados de colonização radicular utilizando $[(\text{asen}(\sqrt{x}))/180*\pi]$, dados de CMET utilizando $[\log(x)]$ e variáveis de planta usando $[\sqrt{x}]$. Normais e homogêneos, os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA (One-way), seguido de teste Dunnett ($p<0,05$) para avaliar a existência de diferenças significativas entre cada concentração testada e o controle. Para avaliar diferenças na MSPA, CMET e colonização radicular entre as espécies fúngicas no tratamento controle foi utilizado teste Tukey ($p<0,05$). Com base nas variáveis % de germinação de esporos, CMET e MSPA foram determinados os valores de concentração de inibição para 50% da população (CI_{50}) e os intervalos de confiança de 95%,

utilizando modelos de regressão não linear de acordo com o Environment Canada (EC, 2005), ajustando para o modelo que melhor representou os dados, através do algoritmo Levenberg-Marquardt. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Statistica 10.0 (StatSoft, 2011) e R (R Core Team, 2023).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Ensaio de fase pré-simbótica

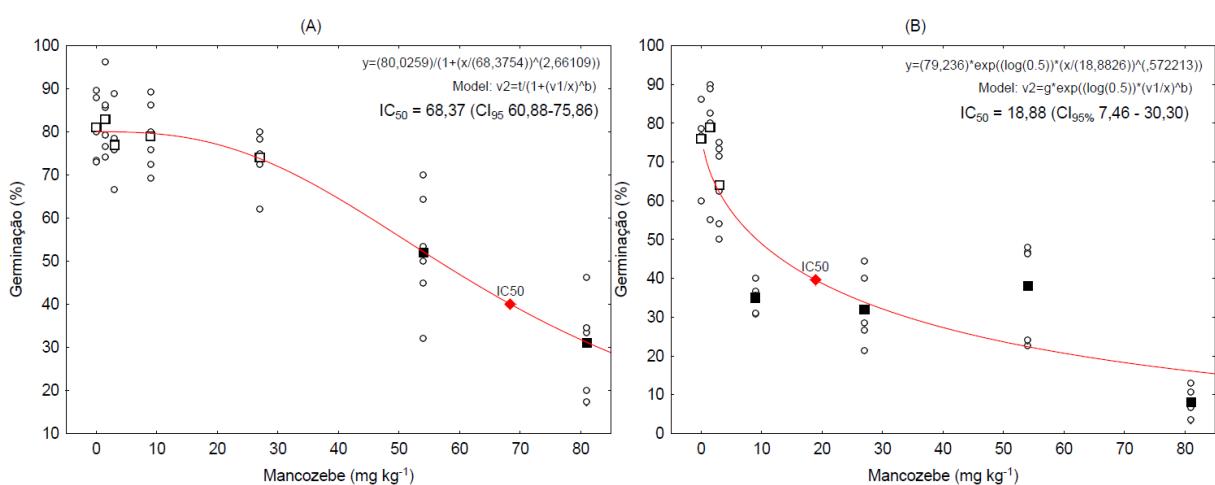
Em todos os ensaios de germinação de esporos o número médio de esporos recuperados por u.e. foi superior a 25 (dados não demonstrados). Nos ensaios com a substância referência, *G. margarita* não atingiu o percentual de geminação sugerido no protocolo ISO 10832:2009 para *Funneliformis mosseae* (75%). No entanto, é conhecido que a germinação pode variar com a alteração do substrato e essa resposta parece ser espécie-específica (Mallmann et al., 2018). Nesse sentido, optou-se por manter *G. margarita* para os demais ensaios. Todos os fungos apresentaram comportamento típico dose-resposta sob concentrações crescentes de ácido bórico, atestando a viabilidade dos inóculos (Figura S 1). Nos ensaios com solo natural, a germinação no controle foi superior a 75% para as três espécies fúngicas testadas, inclusive *G. margarita* (Figura 4).

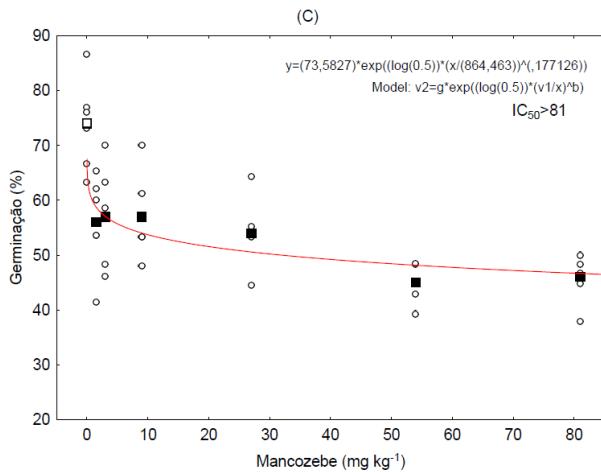
O fungicida mancozebe causou a redução da germinação de esporos das três espécies testadas em Latossolo, sendo *G. albida* a mais sensível, com Cl_{50} : 18,88 mg kg⁻¹ ($Cl_{95\%}$ 7,46 – 30,3) (Figura 4). Mallmann et al (2018) observaram comportamento similar em solo artificial tropical (SAT), onde *G. albida* apresentou maior sensibilidade que *R. clarus* ao mancozebe, com Cl_{50} : 5,66 (4,04 – 7,29) e 14,50 (10,93 – 18,07), respectivamente. Nota-se que o efeito de mancozebe foi atenuado em 3 a 5x em solo natural, possivelmente em função da maior sorção do agrotóxico ao componente mineral do solo natural, dado que o i.a. possui moderada capacidade de sorção (K_d 7.26-11.67 mL g⁻¹, EU, 2002) e o solo elevado teor de argila (48%) comparado ao SAT (20%). Apesar do último possuir maior teor de matéria orgânica, mancozebe apresenta baixo teor de partição octanol-água (Koc médio 997,5 L/kg, EU, 2002).

A germinação de *Funneliformis mosseae* (*Glomus mosseae*) foi completamente inibida quando exposto a 400 mg L⁻¹ de mancozebe em meio de quartzo estéril.

Ainda, a aplicação de 9 mg L⁻¹ do fungicida Ziram, do grupo dos ditiocarbamatos, causou redução da germinação daquela espécie e total inibição na concentração de 36 mg L⁻¹, demonstrando grande toxicidade (Giovannetti et al., 2006). Apesar da escassa literatura acerca dos efeitos de ditiocarbamatos sobre a fase pré-simbiótica de FMAs, o estudo de Gong et al. (2014) corrobora com os efeitos negativos desse grupo de agrotóxicos, onde o fungicida Thiram, do mesmo grupo químico de mancozebe, reduziu a germinação de esporos de *Glomus etunicatum* em meio MSR nas concentrações de 1 e 10 mg L⁻¹, sendo que 0,1 mg L⁻¹ não ocasionaram efeitos em relação ao tratamento controle. Em nosso estudo, a menor concentração testada de mancozebe (1,5 mg kg⁻¹) foi capaz de inibir germinação de *G. margarita* e 9 mg kg⁻¹ causaram redução da germinação de *G. albida*. Apesar de *G. margarita* possuir a menor CEO, a espécie apresentou a maior IC₅₀ estimada entre as três espécies avaliadas. Considerando a concentração recomendada do produto comercial de 3 kg ha⁻¹ e apenas uma aplicação, a PEC foi estimada em 3 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco. Nesse caso, a TER calculada foi de magnitude 6,3x para *G. albida*, 22,8x para *R. clarus* e superior a 27x para *G. margarita* (Tabela 5).

Figura 4 - Gráficos de dispersão do efeito de doses crescentes de mancozebe sobre a germinação de esporos de (A) *Rhizophagus clarus*, (B) *Gigapsora albida* e (C) *Gigaspora margarita*. Linha vermelha representa modelo de regressão não-linear que melhor se ajustou aos dados. As médias da resposta de germinação estão representadas pelos quadrados. Quadrados preenchidos significam diferença estatística para o controle pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$).

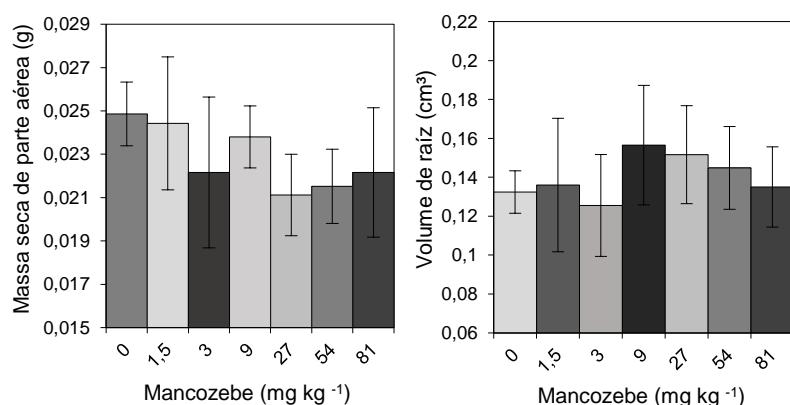




5.3.2 Ensaio de fase simbiótica

No ensaio realizado sem a presença de inóculo fúngico, apenas com concentrações crescentes de mancozebe, o i.a. não causou efeito sobre a MSPA e volume radicular das plantas de alho-poró, apesar dos dados apresentarem grande variabilidade (Figura 5). Esses resultados indicam que as variações apresentadas nos ensaios contendo inóculo fúngico sejam devidas apenas ao efeito de mancozebe sobre os FMAs, excluindo a hipótese de um possível efeito do i.a. sobre as plantas.

Figura 5 - Efeito de concentrações crescentes de mancozebe sobre a massa seca de parte aérea (MSPA) e volume de raiz de plantas de alho-poró em tratamento sem presença de inóculo fúngico. Linhas no topo das colunas indicam desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa do controle pelo teste de Dunnet ($p<0,05$).



Avaliando-se os tratamentos controle (sem presença do agrotóxico) dos testes com cada espécie de FMA, os ensaios revelaram uma nítida distinção entre as espécies no que se refere ao desenvolvimento de suas estruturas e o efeito sobre as plantas. *G. margarita* não promoveu aumento da MSPA das plantas de alho-poró no tratamento controle, apesar de ter causado aumento no volume radicular (Figura S 2). A espécie que causou o maior incremento de MSPA e volume radicular das plantas de alho-poró foi *R. clarus*. Padrão similar foi observado para a colonização radicular no tratamento controle, com *R. clarus* apresentando a maior % colonização (Figura S 2). De forma similar, Nasir et al. (2018) demonstraram que *Rhizophagus irregularis* obteve maior colonização radicular e promoveu maior crescimento e massa de parte aérea de plantas de alho-poró do que *Gigaspora margarita*, apesar de não diferir de *Gigaspora rosea*. Em nosso estudo, todas as espécies apresentaram produção de micélio extrarradicular passível de diferenciação estatística do solo controle através do método de avaliação utilizado, apesar de *G. margarita* e *G. albida* apresentarem produção significativamente inferior a *R. clarus* (Figura S 2). De forma geral, membros de Glomaceae colonizam mais as raízes e em menor tempo, enquanto Gigasporaceae apresentam maior produção de micélio extraradicular (Hart and Reader, 2002) – fato último não observado em nosso trabalho. Isso pode estar associado a diversos fatores como o tempo de avaliação, adaptação as condições ambientais e compatibilidade com a planta hospedeira (Smith & Read, 2003; Oehl et al., 2010). Apesar de ir além do escopo de nossa pesquisa, ressalta-se que o conhecimento acerca das características biológicas das espécies utilizadas contribui na interpretação dos resultados ecotoxicológicos e é ferramenta importante a ser levada em consideração nos esquemas experimentais.

Nosso estudo demonstrou que a colonização radicular de nenhuma espécie fúngica testada foi inibida pelas concentrações crescentes de mancozebe (Figura 6). Os efeitos da molécula sobre FMAs são variados na literatura. Jakobsen et al. (2021), por exemplo, demonstraram que a colonização radicular de *Pisum sativum* L. por *Claroideoglomus claroideum* e *Funneliformis caledonium* foi significativamente superior ao controle nos tratamentos com aplicação de 3,33 e 16,66 mg kg⁻¹ de mancozebe, em mistura de solo e areia quartzosa. Entretanto, a colonização por *C. claroideum*, *F. caledonium* e *F. mosseae* foi drasticamente inibida na concentração de 83,3 mg kg⁻¹ do i.a, para 1,21%, 4,35% e 18,76%, respectivamente. Em doses recomendadas para utilização em cultivos comerciais, Chanabassava et al (2015)

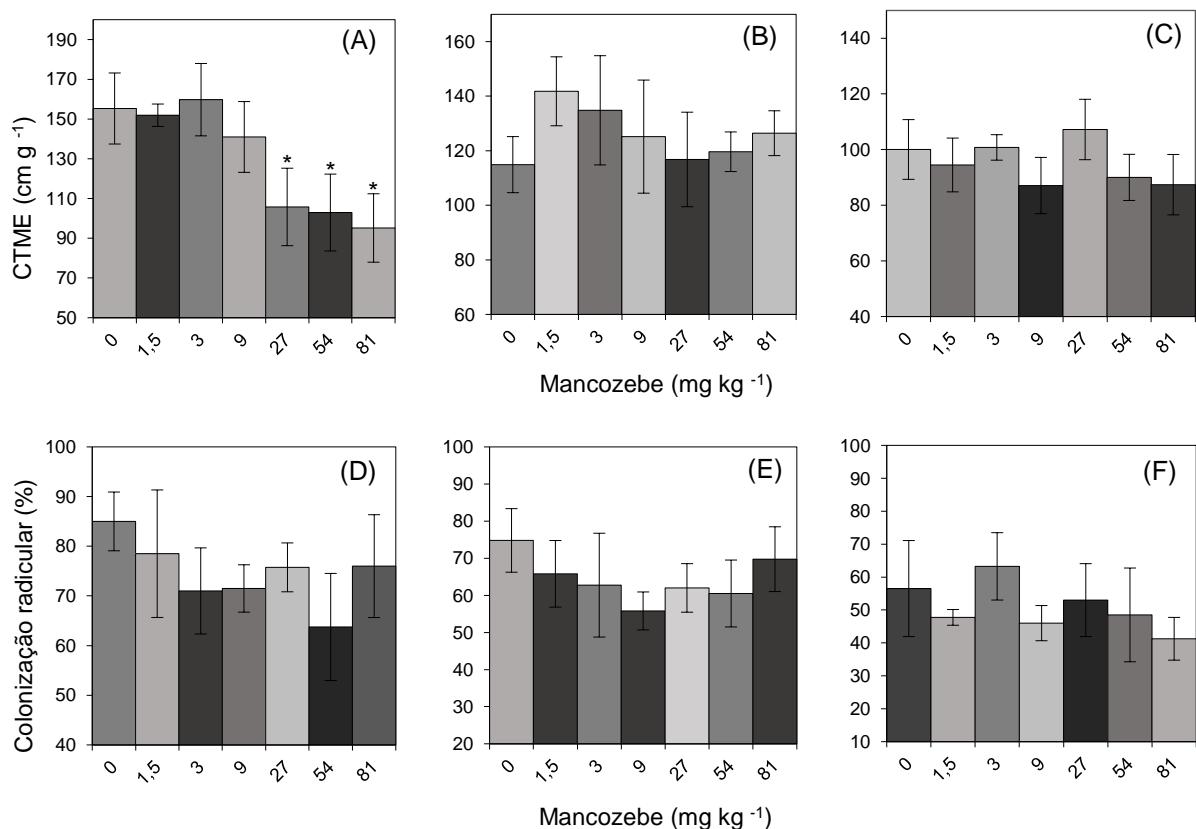
demonstraram que mancozebe reduziu a colonização radicular e o número médio de esporos no solo sob casa de vegetação, em solo natural arenoso. O tempo de avaliação, no entanto, pode ser um fator determinante, dado que mancozebe possui reduzido tempo de meia-vida (Lewis et al., 2016). Em um solo franco-argiloso, o tempo de meia-vida de mancozebe foi de 2,9 dias e o metabólito etilenoureia de 4,8 dias (Calumpang et al., 1993). Ainda, a aplicação de mancozebe via sulco associado com tratamento de sementes de amendoim em doses recomendadas reduziu a colonização radicular até 30 dias, mas não apresentou efeitos aos 45 e 70 dias (Sugavanam et al., 1994). Além disso, a textura do solo pode ser outro fator de influência, uma vez que um menor teor de argila pode significar menor adsorção do agrotóxico na fase sólida do solo e, por conseguinte, maior disponibilidade do i.a. (Carniel et al., 2019).

Das três espécies testadas, *R. clarus* foi a única afetada pelas concentrações crescentes de mancozebe (Figura 6). Para a variável CMET, efeito negativo significativo foi observado na concentração de 27 mg kg^{-1} e a concentração de inibição ficou estimada em $\text{Cl}_{50} > 81 \text{ mg kg}^{-1}$. A MSPA foi reduzida nas mesmas concentrações em que houve redução do CMET, enquanto o volume de raízes foi inibido apenas na última concentração testada (Figura S 3). Foi possível realizar o ajuste do modelo de regressão não-linear para essas variáveis, sendo a Cl_{50} estimada superior a última concentração testada ($\text{Cl}_{50} > 81 \text{ mg kg}^{-1}$) em todos os casos. A variação na sensibilidade das espécies também foi demonstrada por Jakobsen et al. (2021), onde o comprimento do micélio extraradicular de *C. claroideum* e *F. mosseae* não foram afetados por concentrações de até $83,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de mancozebe, apesar de *F. caledonium* ter sido afetado na primeira concentração testada. Em meio MSR, Gong et al (2014) demonstraram que o fungicida Thiram reduziu a atividade da succinato desidrogenase e fosfatase alcalina do micélio extrarradicular de *Glomus etunicatum* na concentração de 1 mg L^{-1} .

A MSPA foi mais sensível aos efeitos deletérios do mancozebe sobre o CMET de *R. clarus* do que o volume de raízes. A relação demonstra que a redução do micélio extrarradicular foi responsável pela redução da massa da planta, possivelmente pela perda dos efeitos nutricionais benéficos do fungo (Hodge et al., 2010), ao passo que o volume radicular foi impactado apenas na última concentração testada e colonização radicular se manteve inalterada. A ausência de efeitos sobre a colonização radicular pode estar relacionada a capacidade dos

esporos e outros propágulos colonizarem as raízes após a degradação do i.a. ou parte dele ao longo do tempo (Hage-Ahmed et al., 2019). Ainda, o fato pode sugerir que a ação do i.a. foi mediada através de contato direto com as estruturas fúngicas, como observado para inibidores da biossíntese do esterol (Zocco et al., 2008), e condizente com o modo de ação por contato de mancozebe. Nesse sentido, testes com avaliações temporais seriam cruciais no entendimento do efeito do i.a. sobre a germinação dos esporos e outros propágulos e as consequências sobre a colonização radicular, apesar de reduzir a praticidade de estudos ecotoxicológicos padronizados.

Figura 6 - Efeito de concentrações crescentes de mancozebe sobre o comprimento total do micélio extrarradicular (CTME) e colonização radicular de (A)(D) *Rhizophagus clarus*, (B)(E) *Gigaspora albida* e (C)(F) *Gigaspora margarita*, respectivamente. Linhas no topo das colunas indicam desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa do controle pelo teste de Dunnet ($p<0,05$).



5.3.3 Comparação entre a fase pré-simbiótica e simbiótica

Todas as espécies fúngicas apresentaram maior sensibilidade na fase pré-simbiótica em relação as variáveis da fase simbiótica (Tabela 5), reafirmando que a germinação de esporos é um *endpoint* seguro e protetivo para etapas “lower tier” de ensaios ecotoxicológicos (Sweeney et al., 2022). Notou-se, no entanto, que apesar de *G. albida* ter mostrado a maior sensibilidade dentre as espécies na fase pré-simbiótica nesse e outros estudos (Mallmann et al., 2018; Malfatti et al., 2023), o mesmo não foi observado para a fase simbiótica, onde nem a colonização radicular, tampouco o CMET foi inibido por mancozebe. *R. clarus*, que não tivera a maior sensibilidade sobre a germinação de esporos foi, por outro lado, a espécie mais sensível para CMET. Essa diferença na magnitude da sensibilidade entre *endpoints* de diferentes etapas do ciclo de vida podem estar associadas a características morfológicas, fisiológicas e mesmo ao comportamento específico de cada espécie (Dodd et al., 2000; Hart and Reader, 2002), que podem interferir na tolerância ao pesticida. De fato, Schreiner & Bethlenfalvay (1997) demonstraram que a germinação de esporos (fase pré-simbiótica) de *G. etunicatum* foi afetada por benomil, assim como a produção de esporos (fase simbiótica), enquanto a colonização radicular (fase simbiótica) não sofreu inibição. A relação oposta também já foi relatada, onde o fungicida flutolanil não afetou a germinação de esporos e nem o micélio extrarradicular de *R. irregularis*, mas reduziu a colonização radicular (Buysens et al., 2015). Em contraste com nossos resultados, Vuyyuru et al. (2018) mostraram que 2,55 kg ha⁻¹ de mancozebe aplicado em um Organossolo reduziu drasticamente a colonização radicular de cana-de-açúcar, bem como a abundância de biomarcadores 16:1w5 de FMAs – indiretamente indicando redução do micélio extrarradicular, ao passo que a produção de esporos não foi reduzida.

Tabela 5 - Menor concentração de efeito observada (CEO), concentração de inibição para 50% da população (CI₅₀), concentração ambiental prevista (PEC) dos ingredientes ativos no solo após uma aplicação, simulando o pior cenário possível, e taxa de toxicidade-exposição (TER) para endpoints fúngicos de fase pré-simbiótica e simbiótica em ensaios com mancozebe.

Agrotóxico/Espécie FMA	CEO ¹	CI ₅₀ ¹	PEC ¹	TER
Fase pré-simbiótica (<i>in vitro</i>)				
Mancozebe (Manzate ®) Germinação de esporos			3	

R. clarus	54	68,37 (60,88-75,86)	22,8
G. albida	9	18,88 (7,46-30,30)	6,3
G. margarita	1,5	>81	>27
Fase simbiótica (<i>in vivo</i>)			
Mancozebe (Manzate ®) 3			
CMET			
R. clarus	27	>81	>27
G. albida	>81	-	-
G. margarita	>81	-	-
Colonização radicular			
R. clarus	>81	-	-
G. albida	>81	-	-
G. margarita	>81	-	-

¹ Valores em mg kg⁻¹

É importante notar que os *endpoints* fúngicos avaliados (tanto de fase pré-simbiótica, quanto simbiótica) fornecem uma ideia de abundância/biomassa do grupo funcional. Considerando a abordagem dos objetivos de proteção específicos (SPGs, “specific protection goals”) utilizada pela EFSA, os *endpoints* seriam adequados para mensuração do risco de substâncias aos serviços ecossistêmicos de controle de pragas e doenças, atenuação natural, estruturação do solo e suporte da cadeia alimentar (Ockleford et al., 2017). Conforme demonstrado nesse trabalho, a germinação de esporos se mostrou mais sensível do que os demais *endpoints* avaliados e, portanto, seria indiretamente protetiva a funções atribuídas a outras estruturas fúngicas, como o micélio extrarradicular, por exemplo.

Ressalta-se o fato que, em nossos ensaios, *G. albida* e especialmente *G. margarita* produziram menos micélio extrarradicular comparativamente a *R. clarus*, o que levanta suspeitas sobre o quanto a sensibilidade da metodologia possa ter contemplado possíveis efeitos do fungicida sobre a variável naquelas espécies. Nesse sentido, o tempo de avaliação dos testes ou a própria característica da espécie deve ser ajustada com o método utilizado, a fim de minimizar possíveis problemas de amostragem. Nesse caso, pela maior produção total de micélio e diferença do tratamento controle, *R. clarus* e *G. albida* são preferíveis à *G. margarita* para o tempo de avaliação utilizado.

Mesmo com os efeitos negativos sobre o CMET, MSPA e volume radicular, considerando apenas uma aplicação do agrotóxico e o pior cenário de exposição possível, as TER estimadas para as variáveis citadas de *R. clarus* seriam superiores a magnitude de 27x (Tabela 5). As respostas das variáveis testadas de *R. clarus* aos

efeitos de mancozebe demonstram uma atenuação crescente dos efeitos para germinação de esporos > comprimento total do micélio extraradicular (CMET) > colonização radicular. Além dos efeitos de mancozebe serem altamente dependes da espécie (Hernandez-Dorrego & Mestre Parés, 2010; Jakobsen et al., 2012; Rejali et al., 2022), é indispensável que sejam consideradas as notáveis diferenças entre os substratos/solos testados. Nossos resultados demonstraram a atenuação do efeito de mancozebe em Latossolo sobre a germinação de *R. clarus* e *G. albida* em relação a SAT (Mallmann et al., 2018). Divergências no comportamento do agrotóxico e, portanto, de seus efeitos sobre os FMAs são esperadas quando comparados resultados oriundos de esquemas experimentais usando, por exemplo, Organossolos (Vuyyuru et al., 2018), misturas de solos naturais e outros componentes (Jakobsen et al., 2012; Rejali et a., 2022) ou mesmo meios de cultura (Rejali et al., 2022). Em Latossolos brasileiros, de características semelhantes ao utilizado nesse trabalho, é improvável que exista risco para as espécies testadas, considerando uma única aplicação do mancozebe e seguindo as práticas recomendadas. Entretanto, isso não elimina a necessidade de novos estudos que contemplam cenários de múltiplas aplicações, condições de campo, outros solos e espécies representativas.

5.4 CONCLUSÃO

O mancozebe reduz a germinação de esporos de *R. clarus*, *G. albida* e *G. margarita* em Latossolo, sendo *G. albida* a espécie mais sensível. Entretanto, nossos ensaios *in vivo* em ambiente controlado demonstram que apenas *R. clarus* possui o comprimento do micélio extrarradicular afetado quando exposto ao mancozebe, indicando que a relação entre a sensibilidade de *endpoints* de diferentes etapas do ciclo de vida dos FMAs não obedecem a uma lógica linear e são dependentes de características espécie. Nesse caso, as diferenças na capacidade de recuperação dos esporos – através de avaliações de viabilidade - e a dinâmica temporal do efeito do agrotóxico sobre os *endpoints* simbóticos podem ser cruciais para o entendimento da relação entre a sensibilidade das etapas do ciclo de vida dos FMAs, assim como o entendimento das particularidades na biologia de cada espécie.

Considerando a dose recomendada pelo fabricante de aplicação do mancozebe, é improvável que o i.a. apresente risco a fase simbiótica de *R. clarus*, *G. albida* e *G. margarita* em Latossolos brasileiros. Mesmo em concentração do i.a. 27x superior ao estimado no solo no pior cenário de exposição, não são observados efeitos sobre o comprimento do micélio extrarradicular de *G. albida* e *G. margarita* e sobre a colonização radicular das três espécies testadas. Por suposto, as condições experimentais testadas não refletem o cenário de campo e as práticas de aplicação de fato utilizadas e, portanto, estudos de campo abrangendo outras variáveis, como aplicações múltiplas, trariam avanços no conhecimento da área. Ainda, a utilização de diferentes tipos de solo, espécies e i.a.s em ensaios com marcações temporais são fundamentais para aprofundar o entendimento da dinâmica do efeito de agrotóxicos sobre FMAs.

Apesar das limitações, nosso estudo demonstra a aplicabilidade de uma metodologia prática e padronizável para ensaios ecotoxicológicos visando avaliar efeito de agrotóxicos sobre a fase simbiótica de FMAs em um solo natural. Resultados dos ensaios *in vivo* permitiram o refinamento das conclusões obtidas nos ensaios *in vitro* e redução da incerteza dos resultados. A adição do componente planta no sistema experimental, juntamente com o solo natural e condições de casa de vegetação impõem maior relevância ecológica e aplicação prática dos resultados, ao tornar o esquema experimental mais próximo a condições reais de campo. A avaliação de variáveis da planta também torna a interpretação mais abrangente. Dos *endpoints* fúngicos testados, a germinação de esporos se mostrou o *endpoint* mais sensível, seguida do comprimento total do micélio extrarradicular e colonização radicular.

REFERÊNCIAS

- ALVES, P. R. L. et al. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, v. 90, n. 11, p. 2674–2682, mar. 2013.
- ALVES, P. R. L. et al. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 105, p. 65–71, jul. 2014.
- AMF PHYLOGENY. Phylogeny and taxonomy of Glomeromycota ('arbuscular mycorrhizal [AM] and related fungi'), 2019. **Glomeromycota SPECIES LIST**. Disponível em: <http://amf-phylogeny.com/>. Acesso em: 31 jul. 2023.
- BAUM, C.; EL-TOHAMY, W.; GRUDA, N. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. **Scientia Horticulturae**, v. 187, p. 131–141, maio 2015
- BASF, 2023. Comet ®. Bula e informação do Fungicida para citros. Disponível em: <https://agriculture.bASF.com/br/pt/protecao-de-cultivos-e-sementes/produtos/comet.html>. Acesso em: 13 de ago. 2023.
- BERGSTROM, H Schaefer, A Delmas, R Kloskowski, A Walker, K Travis, L Smeets, R Jones, V Vanderbroeck, A Van Der Linden, S Broerse, M Klein, R Layton, O-S Jacobsen & D Yon.
- BONMATIN, J.-M. et al. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35–67, 7 ago. 2014.
- BOWNIK, A.; SZABELAK, A. Short-term effects of pesticide fipronil on behavioral and physiological *endpoints* of *Daphnia magna*. **Environmental Science and Pollution Research**, 26 fev. 2021.
- BÜCKING, H.; KAFLE, A. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Nitrogen Uptake of Plants: Current Knowledge and Research Gaps. **Agronomy**, v. 5, n. 4, p. 587–612, 1 dez. 2015.
- BUYSENS, C.; BOULOIS, H. D.; DECLERCK, S. Do fungicides used to control *Rhizoctonia solani* impact the non-target arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*? **Mycorrhiza**, v. 25, n. 4, p. 277–288, 15 out. 2014.
- BUZO, F. S. et al. Chemical seed treatment and mycorrhizal inoculation provide better development and nutrition of common bean plants. **Pest Manag Sci**, v. 78, n. 7, p. 2985–2994, 29 abr. 2022.
- CALUMPANG, S. M. F. et al. Movement and degradation of mancozeb fungicide and its metabolites, ethylenethiourea and ethyleneurea in silty clay loam soil. **International Journal of Pest Management**, v. 39, n. 2, p. 161–166, jan. 1993.

CAMERON, J. C. et al. Fungicidal Seed Coatings Exert Minor Effects on Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Nutrient Content. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 3, p. 1005–1012, maio 2017.

CAMPAGNAC, E. et al. Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Mycorrhiza**, v. 19, n. 6, p. 365–374, 2 abr. 2009.

CAMPOS, A. A. B. et al. Seleção de fungicidas visando à preservação de fungos micorrízicos arbusculares nativos no cultivo do feijoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 9, p. 898–902, set. 2015.

DE NOVAIS et al. Two herbicides, two fungicides and spore-associated bacteria affect *Funneliformis mosseae* extraradical mycelium structural traits and viability. **Mycorrhiza**, v. 29, n. 4, p. 341–349, 12 jun. 2019.

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

CARNIEL, L.S.C. et al. The fungicide mancozeb affects soil invertebrates in two subtropical Brazilian soils. **Chemosphere**, v. 232, p. 180–185, 1 out. 2019.

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

CELY, M. V. T. et al. Inoculant of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (*Rhizophagus clarus*) Increase Yield of Soybean and Cotton under Field Conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 25 maio 2016.

CHANNABASAVA, A.; LAKSHMAN, H. C.; JORQUERA, M. A. Effect of fungicides on association of arbuscular mycorrhiza fungus *Rhizophagus fasciculatus* and growth of Proso millet (*Panicum miliaceum* L.). **Journal of soil science and plant nutrition**, 15(1) 35-45, 2015.

Chiocchio, V. et al. **Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*** (2000) *International Microbiology*, 3 (3), pp. 173-175.

CHRISTL, Heino et al. Recalibration of the Earthworm Tier 1 Risk Assessment of Plant Protection Products and Gregor. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 9, p. 1 – 8, 2015.

CICG. 2023. Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota. Disponível em: < <https://sites.google.com/site/cicgfma/home> > Acesso em: 02/08/2023.

CINTIA CARLA NIVA et al. Soil ecotoxicology in Brazil is taking its course. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 23, n. 11, p. 11363–11378, 12 abr. 2016.

DAAM, M. A. et al. Environmental risk assessment of pesticides in tropical terrestrial ecosystems: Test procedures, current status and future perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 181, p. 534–547, 15 out. 2019.

DODD, J.C. et al. Mycelium of Arbuscular Mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. **Plant and Soil**, 226, 131-151 (2000).

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

EC - European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. Directorate E - Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions, E1 - Plant health., 2002. SANCO/10329/2002 rev 2 final. Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC.

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

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

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Bioma Cerrado**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/bioma-cerrado/solo>. Acesso em: 01/08/2023.

FARDER-GOMES, C. F. et al. Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Science of The Total Environment**, v. 774, p. 145679, jun. 2021.

FENT, G.M. Fipronil. In: Philip Wexler (eds) **Encyclopedia of Toxicology** (Third Edition), Academic Press, 2014, Pages 596-597, ISBN 9780123864550, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00144-5>.

FERNANDES, R. A. et al. Occurrence and species richness of mycorrhizal fungi in soil under different land use. **Can. J. Soil Sci.**, v. 96, n. 3, p. 271–280, 1 set. 2016.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; TORÉS, J.A.; VICENTE, A.; PÉREZ, A. G. Mechanisms of resistance to Qo1 fungicides in phytopathogenic fungi. **Int Microbiol**, v.11, 2008.

FERREIRA, D. A.; CARNEIRO, M. A. C.; SAGGIN JÚNIOR, J. O. Fungos micorrízicos arbusculares em um latossolo vermelho sob manejos e usos no cerrado. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 36, n. 1, p. 51–61, 1 fev. 2012.

FOCUS - Forum for the Co-ordination of pesticide fate models and their Use, 1997. Soil persistence models and EU registration: The final report of the work of the Soil Modelling Work group of FOCUS. Contributors: J Boesten, A Helweg, M Businelli, L.

GAZEY, C.; ABBOTT, L. K.; ROBSON, A. D. VA mycorrhizal spores from three species of Acaulospora : germination, longevity and hyphal growth. **Mycological Research**, v. 97, n. 7, p. 785–790, jul. 1993.

GARCIA, M.V.B. Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. **Ecology and Development Series**; Zentrum für 17 Entwicklungs for schung: University of Bonn, 2004.

GERDEMANN, J.Y.I.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, v. 46, p.235-244, 1963. doi:[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)

GIOVANNETTI, M. (2000). Spore Germination and Pre-Symbiotic Mycelial Growth. In: Kapulnik, Y., Douds, D.D. (eds) **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0776-3_3

GIOVANNETTI, M. et al. Mycorrhizal Fungi in Ecotoxicological Studies: Soil Impact of Fungicides, Insecticides and Herbicides. **Prevention Today**, v. 2, n 1-2, p. 47-62, mar. 2006.

GIOVANNETTI, M.; AVIO, L.; SBRANA, S. Fungal Spore Germination and Pre-symbiotic Mycelial Growth – Physiological and Genetic Aspects. **Arbuscular Mycorryzas: Physiology and Function**, p. 3–32, 1 jan. 2010.

GONG, C. et al. Effects of Three Fungicides on Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Transformed Carrot Hairy Roots/AM Fungus Association. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, vol 8, p 2141-2150, jun 2014.

GUIMA, S. E. S. et al. New Insights into the Effect of Fipronil on the Soil Bacterial Community. **Microorganizmos**, v. 11, n. 1, p. 52–52, 23 dez. 2022.

GULLINO, M. L. et al. Mancozeb: Past, Present, and Future. **Plant Disease**, v. 94, n. 9, p. 1076–1087, set. 2010.

HABTE, M.; MANJUNATH, A. Initial and residual toxicity of soil-applied thiram on the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, v. 2, n. 1, p. 25–31, out. 1992.

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

HART, M. M.; READER, R. J. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 153, n. 2, p. 335–344, fev. 2002.

HERNÁNDEZ-DORREGO, A.; J. MESTRE PARÉS. Evaluation of some fungicides on mycorrhizal symbiosis between two *Glomus* species from commercial inocula and *Allium porrum* L. seedlings. **Spanish Journal of Agricultural Research** v. 8, n. S1, p. 43–43, 1 jul. 2010.

HIJRI, I. et al. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 8, p. 2277–2289, 19 maio 2006.

HODGE, A.; HELGASON, T.; FITTER, A. H. Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. **Fungal Ecology**, v. 3, n. 4, p. 267–273, nov. 2010.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 1996. Portaria normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996. Disponível em: https://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf. Acesso em: 06 de abril de 2021.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Relatório de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 01/08/2023.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Perfil Ambiental: Mancozeb CAS 8018-01-7. Disponível em: https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20-20Mancozebe%20-%2002_10_2019.pdf. Acesso em: 01/08/2023.

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

JAKOBSEN, I.; MURMANN, L. M.; ROSENDAHL, S. Hormetic responses in arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 159, p. 108299, ago. 2021.

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

JIN, H.; GERMIDA, J. J.; WALLEY, F. L. Suppressive effects of seed-applied fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) differ with fungicide mode of action and AMF species. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 22–30, out. 2013.

JUGE, C. et al. Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. **Mycorrhiza**, v. 12, n. 1, p. 37–42, 1 fev. 2002.

JÚLIA CARINA NIEMEYER; SÓNIA CHELINHO; JOSÉ PAULO SOUSA. Soil ecotoxicology in Latin America: Current research and perspectives. **Environ Toxicol Chem**.v. 36, n. 7, p. 1795–1810, 1 jul. 2017.

KAMOUN, I. J. et al. Effects of deltamethrin, dimethoate, and chlorpyrifos on survival and reproduction of the collembolan *Folsomia candida* and the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* in two African and two European soils. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 14, n. 1, p. 92–104, 22 ago. 2017.

KARPOUZAS, D.G. (2021). Assessing the Effects of Pesticides on the Soil Microbial Community: Advances, Standardization of Methods and the Need for a New Regulatory Framework. In: Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martín, M.J. (eds) Pesticides in Soils. **The Handbook of Environmental Chemistry**, vol 113. Springer, Cham. https://doi-org/10.1007/698_2021_797

KLIRONOMOS, J. N.; HART, M. M. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. **Mycorrhiza**, v. 12, n. 4, p. 181–184, 1 ago. 2002.

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

LENOIR, I.; FONTAINE, J.; LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, A. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. **Phytochemistry**, v. 123, p. 4–15, mar. 2016.

LEWIS, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D. and Green, A. (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, 22 (4), 1050-1064. DOI: 10.1080/10807039.2015.1133242

LIU, S. et al. Disturbance induces similar shifts in arbuscular mycorrhizal fungal communities from grassland and arable field soils. **Mycorrhiza**, v. 33, p. 153-164, mar. 2023. DOI: 10.1007/s00572-023-01108-6

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

MAIA, L. C.; MELO, A. M. Y. Germination and germ tube growth of the arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora albida* in different substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 281–285, 1 dez. 2001.

MALFATTI, A. L. R. et al. Ecotoxicological test to assess effects of herbicides on spore germination of *Rhizophagus clarus* and *Gigaspora albida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 207, p. 111599, 1 jan. 2021.

MALFATTI, A. L. R. et al. Risk assessment tests of neonicotinoids on spore germination of arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora albida* and *Rhizophagus clarus*. **Journal of Soils and Sediments**, v. 23, n. 3, p. 1295–1303, 5 jan. 2023.

MALIK, S. et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungal inoculations on the growth and polyphenol levels of garden leek (*Allium porrum*). **Journal of Plant Protection Research**, v. 58, n. 1, p. 83–90, 1 jan. 2018.

MALLMANN, G. C. et al. Placing arbuscular mycorrhizal fungi on the risk assessment test battery of plant protection products (PPPs). **Ecotoxicology**, v. 27, n. 7, p. 809–818, maio 2018.

MALTY, J. S.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbióticos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 285–291, fev. 2006.

MATHIMARAN, N. et al. Impact of agricultural management on arbuscular mycorrhizal fungal communities in Kenyan ferralsol. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 119, n. 1-2, p. 22–32, fev. 2007.

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

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

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

MENENDEZ, A. et al. Influence of the insecticide dimethoate on arbuscular mycorrhizal colonization and growth in soybean plants. **Int Microbiol**, v.2, p 43-45, mar. 1999.

MORAES, J. M. A. S. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in integrated crop livestock systems with intercropping in the pasture phase in the Cerrado. **Rhizosphere**, v. 11, p. 100165, set. 2019.

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

NIVA, C.C. et al. Soil ecotoxicology in Brazil is taking its course. **Environ Sci Pollut Res.** v. 23, p. 11363–11378, 2016.

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

NOVAIS, C. B. et al. Interconnectedness, length and viability of arbuscular mycorrhizal mycelium as affected by selected herbicides and fungicides. **Applied Soil Ecology**, v. 143, p. 144–152, nov. 2019.

OCKLEFORD, C. et al. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. **EFSA Journal**, v. 15, n. 2, fev. 2017.

OEHL, F. et al. Diversity and biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 53, n. 7, p. 777–797, 5 jul. 2017.

OEHL, F. et al. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 724–738, maio 2010.

PASARIBU, A. et al. Growth and development of symbiotic Arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mossea* (Nicol. and Gerd.), in alachlor and glyphosate treated soils. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 11520–11526, 21 set. 2011.

PISA, L. W. et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68–102, 17 set. 2014.

PONTES, J. S. et al. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian's Cerrado and in soybean under conservation and conventional tillage. **Applied Soil Ecology**, v. 117-118, p. 178–189, set. 2017.

POWELL, J. R.; RILLIG, M. C. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem function. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1059–1075, 30 mar. 2018.

POZO, M. J.; AZCÓN-AGUILAR, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 393–398, ago. 2007.

PROJETO MAPBIOMAS – Mapeamento Anual de Cobertura e Uso da Terra do Brasil. Coleção 6. Disponível em: https://mapbiomas-br-site.s3.amazonaws.com/Fact-Sheet_1.pdf. Acesso em: 08 de jul. 2023.

RAMANA, J. V. et al. Root diameter, host specificity and arbuscular mycorrhizal fungal community composition among native and exotic plant species. **New Phytologist**, v. 239, n. 1, p. 301–310, 10 abr. 2023.

REDDY, S. N.; GUPTA, S.; GAJBHIYE, V. T. Adsorption-desorption and leaching of pyraclostrobin in Indian soils. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, n. 11, p. 948–959, 2 nov. 2013.

REDDY, S. N.; GUPTA, S.; GAJBHIYE, V. T. Adsorption-desorption and leaching of pyraclostrobin in Indian soils. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, n. 11, p. 948–959, 2 nov. 2013b.

REJALI, F. et al. The Potential Effects of Fungicides on Association of *Rhizophagus irregularis* with Maize and Wheat. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 65, 2022.

RIEDO, J. et al. Temporal dynamics of total and bioavailable fungicide concentrations in soil and their effect upon nine soil microbial markers. **Science of the Total Environment**, v. 878, p. 162995–162995, 1 jun. 2023.

RIEDO, J. et al. Widespread Occurrence of Pesticides in Organically Managed Agricultural Soils—the Ghost of a Conventional Agricultural Past? **Environmental Science & Technology**, v. 55, n. 5, p. 2919–2928, 3 fev. 2021.

RILLIG, M. C.; MUMMEY, D. L. Mycorrhizas and soil structure. **New Phytologist**, v. 171, n. 1, p. 41–53, jul. 2006.

RIVERA-BECERRIL, F. et al. Impact of a pesticide cocktail (fenhexamid, folpel, deltamethrin) on the abundance of Glomeromycota in two agricultural soils. **Science of The Total Environment**, v. 577, p. 84–93, jan. 2017.

RODRIGUEZ-MORELOS, V. G.; CALONNE-SALMON, M.; DECLERCK, S. Anastomosis within and between networks of *Rhizophagus irregularis* is differentially influenced by fungicides. **Mycorrhiza**, v. 33, n. 1-2, p. 15–21, 21 jan. 2023.

RODRIGUEZ-MORELOS, V. H. et al. Fungicides With Contrasting Mode of Action Differentially Affect Hyphal Healing Mechanism in *Gigaspora* sp. and *Rhizophagus irregularis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 10 mar. 2021.

RODRIGUEZ-MORELOS, V. H; DECLERCK, S.; CALONNE-SALMON, M. Azoxystrobin alters the dynamics of short-term phosphorus uptake of mycorrhizal potato plants associated to *Rhizophagus irregularis*. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** v. 186, n. 1, p. 95–104, 21 nov. 2022.

RÖMBKE, J., SCHMELZ, R.M., PELOSI, C. Effects of Organic Pesticides on Enchytraeids (Oligochaeta) in Agroecosystems: Laboratory and Higher-Tier Tests. **Frontiers in Environmental Science**, 5:20, 2017.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

SCHALAMUK, S. et al. Effect of *Septoria* Leaf Blotch and its Control with Commercial Fungicides, on arbuscular-mycorrhizal-Fungal Colonization, Spore Numbers, and

morphotype Diversity. **Journal of Plant Protection Research**, v. 54, n. 1, p. 9–14, 1 jan. 2014.

SCHREINER, R. P.; BETHLENFALVAY, G. J. Mycorrhizae, biocides, and biocontrol 3. Effects of three different fungicides on developmental stages of three AM fungi. **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, n. 1, p. 18–26, mar. 1997.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1413–1421, 1 dez. 2001.

SIMON-DELSO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5–34, 19 set. 2014.

SINDIVEG - SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIAL DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL. **Mercado total de defensivos agrícolas por produto aplicado**. Disponível em: <https://sindiveg.org.br/mercado-total/>. Acesso em: 01/08/2023.

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

STATSOFT. STATISTICA 10.0 (data analysis software system). [s.l]. 2011. Disponível em: <https://www.statistica.com/en/>.

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

SUGAVANAM, V.; UDAIYAN, K.; MANIAN, S. Effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and nodulation in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 48, n. 3, p. 285–293, abr. 1994.

SWEENEY, C. J. et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and the Need for a Meaningful Regulatory Plant Protection Product Testing Strategy. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1808–1823, 9 jun. 2022.

TRESEDER, K. K.; ALLEN, M. F. Mycorrhizal fungi have a potential role in soil carbon storage under elevated CO₂ and nitrogen deposition. **New Phytologist**, v. 147, n. 1, p. 189–200, jul. 2000.

TRIQUES, M. C. et al. Assessing single effects of sugarcane pesticides fipronil and 2,4-D on plants and soil organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111622, jan. 2021.

THIRUCHELVAM, M. Mancozeb, Editor(s): Philip Wexler, Encyclopedia of Toxicology (Second Edition), Elsevier, 2005, Pages 5-8, ISBN 9780123694003, <https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00575-5>.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Mancozeb Facts**. Disponível em: <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/index-158.html>. Acesso em: 22/08/2023.

VAN DER HEIJDEN et al. Different Arbuscular Mycorrhizal Fungal Species Are Potential Determinants of Plant Community Structure. **Ecology Society Of America**, v. 79, n. 6, p. 2082–2082, 1 set. 1998.

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

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

VIERHEILIG, H. et al. Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 5004–5007, 1 dez. 1998.

VUYYURU, M. et al. Effects of Soil-Applied Fungicides on Sugarcane Root and Shoot Growth, Rhizosphere Microbial Communities, and Nutrient Uptake. **Agronomy**, v. 8, n. 10, p. 223, out. 2018.

ZOCCHI, D. et al. Effects of two sterol biosynthesis inhibitor fungicides (fenpropimorph and fenhexamid) on the development of an arbuscular mycorrhizal fungus. **British Mycological Society**, v. 112, n. 5, p. 592–601, 1 maio 2008.

ZORTÉA, T. et al. Ecotoxicological effects of fipronil, neem cake and neem extract in edaphic organisms from tropical soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 207–214, dez. 2018.

ZORTÉA, T. et al. Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* in tropical soils. **Chemosphere**, v. 173, p. 460–465, abr. 2017.

APÊNDICE

Figura S 1 - Percentagem de germinação de esporos de (A) *Rhizophagus clarus*, (B) *Gigaspora albida* e (C) *Gigaspora margarita* em SAT contaminado com concentrações crescentes de ácido bórico. Asteriscos indicam diferença significativa para o controle pelo teste de Dunnet ($p<0,05$). Barras indicam o desvio padrão da média.

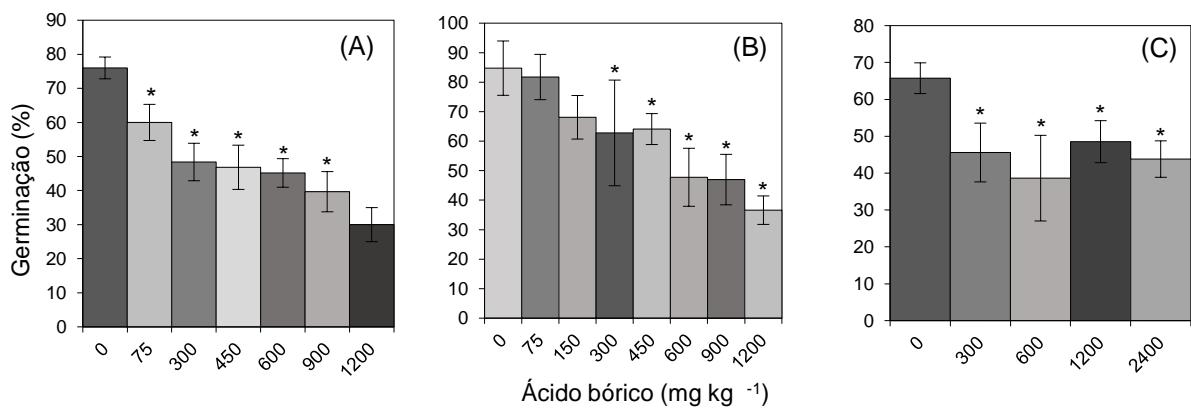
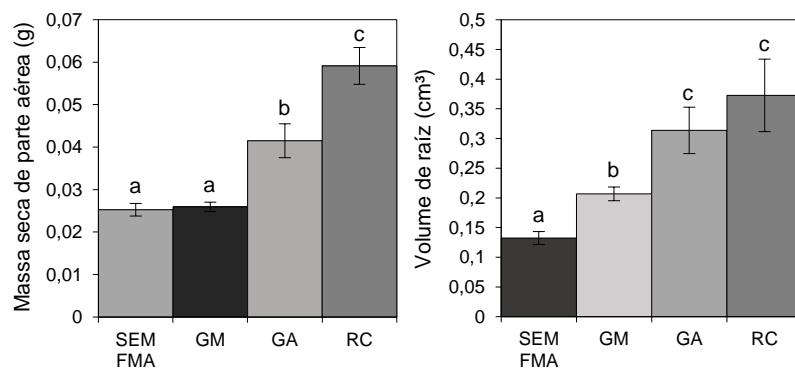


Figura S 2. Comparação entre tratamentos sem a presença de inóculo fúngico (SEM FMA), *Rhizophagus clarus* (RC), *Gigaspora albida* (GA) e *Gigaspora margarita* (GM) quanto as variáveis fúngicas e de planta avaliadas. Linhas no topo das colunas indicam desvio padrão da média. Médias com letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p<0,05$).



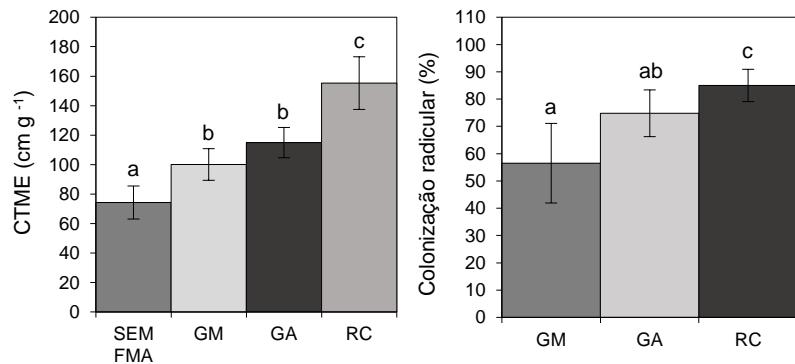


Figura S 3. Gráficos de barras dos efeitos de concentrações crescentes de mancozebe sobre a massa seca de parte aérea e volume de raízes para *R. clarus* (A)(B), *G. abida* (C)(D) e *G. margarita* (E)(F), respectivamente. Linhas no topo das colunas indicam desvio padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa do tratamento controle pelo teste de Dunnet ($p<0,05$).

