

PAULO PRATES JÚNIOR

***PLANT SOIL FEEDBACK* E INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM  
MUDAS DE VINHÁTICO E BRAÚNA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

P912p  
2018 Prates Júnior, Paulo, 1986-  
*Plant soil feedback* e inoculação de fungos micorrízicos em mudas de vinhático e braúna / Paulo Prates Júnior. - Viçosa, MG, 2018. xi, 112 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Plathymenia reticulata*. 2. *Melanoxylon brauna*. 3. Simbiose. 4. *Bradyrhizobium*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

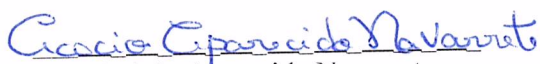
CDD 22. ed. 631.847


PAULO PRATES JÚNIOR

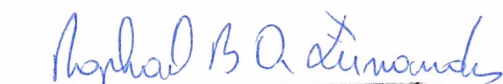
**PLANT SOIL FEEDBACK E INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM  
MUDAS DE VINHÁTICO E BRAÚNA**

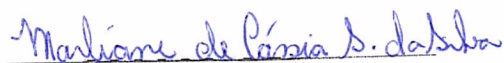
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

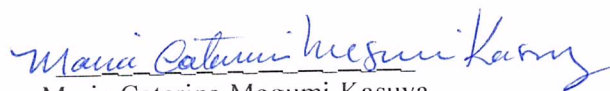
APROVADA: 22 de fevereiro de 2018.

  
Acácio Aparecido Navarrete

  
Haroldo Nogueira de Paiva

  
Raphael Bragança Alves Fernandes

  
Marliane de Cássia Soares da Silva  
(Coorientadora)

  
Maria Catarina Megumi Kasuya  
(Orientadora)

*Aos meus sobrinhos, Lyvia, Victória,  
Marcelinho, Alyce e aos meus irmãos  
Mara e Marcelo.*

*Aos meus avós, Roga, Senhorinha,  
Terezinha, Vavá e aos meus pais, pelo  
legado, amor e sabedoria. Peço a  
benção!*

*À Cleide, por compartilhar comigo a  
simplicidade e os sabores da vida.*

*DEDICO*

“A ostra, para fazer uma pérola, precisa ter dentro de si um grão de areia que a faça sofrer. Sofrendo, a ostra diz para si mesma - 'Preciso envolver essa areia pontuda que me machuca com uma esfera lisa que lhe tire as pontas'. 'Ostras felizes não fazem pérolas'... Pessoas felizes não sentem a necessidade de criar. O ato criador, seja na ciência ou na arte, surge sempre de uma dor. Não é preciso que seja uma dor doída... Por vezes a dor aparece como aquela coceira que tem o nome de curiosidade.”

“Se é bom ou se é ruim só o futuro dirá...”

Rubem Alves

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e avós por todo apoio, amor e dedicação. Aos meus irmãos e tios, com todo carinho à dos Anjos, Carmelito, Norma e Silvinha. Aos meus sobrinhos, meus presentes. Aos demais familiares pelos incentivos e momentos de alegrias.

À Cleide, por todo amor, participação, dedicação e presença em cada passo, decepção ou conquista.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola: professores, estudantes e funcionários que por diversos caminhos contribuíram para a realização desta tese. E ao Bioagro, que garantiu grande parte da infraestrutura necessária a realização deste trabalho.

À professora Catarina, minha orientadora e modelo de dedicação, pelo carinho e presença amiga, sempre com palavras de otimismo, incentivo e confiança.

À Marli, minha coorientadora, pela imensa amizade, carinho, confiança e colaboração, sempre pronta a ajudar com muita disposição, alegria e incentivos diversos.

Ao professor Raphael, pela orientação e auxílio durante os primeiros passos no mestrado e continuidade durante o doutorado, extremamente disponível durante cinco anos e meio de caminhada na UFV.

Ao professor Aloísio, meu coorientador, por apresentar o problema de pesquisa e acreditar no potencial dos microrganismo e em nosso grupo de pesquisa.

Ao professor Haroldo, não apenas por compor a banca e contribuir para a melhoria desta tese, mas também pelas dicas, conselhos e disponibilidade durante a realização dos experimentos.

Ao Acácio pela curiosidade e exemplo como pesquisador, aceitando o convite para compor a banca e colaborando para o aperfeiçoamento desta tese.

Agradecimento especial a Bruno C., que desde o mestrado se tornou excelente amigo e conselheiro, importante colaborador e executor em muitas partes do presente trabalho.

Ao Antônio Carlos que colaborou com as amostragens em campo e nos experimentos em casa de vegetação; bem como aos demais técnicos e funcionários: Sr. Paulo da portaria, Sr. Paulo da autoclave, Robson, Danilo, Emília, Célio, D. Maria, Sônia, Letícia, Gabriel, Regiane e Ariane.

Ao Sr. Leacir do Laboratório de Sementes – UFV e a SIF por disponibilizarem as sementes de vinhático e braúna para os experimentos. Alex pelas dicas de cultivo de leguminosas e utilização do “colostro” de uma planta adulta.

Aos que juntamente comigo colocaram a mão na massa na casa de vegetação ou nos laboratórios: Thuany, Bruno C., Bruno M., Alex, Aninha, Fábio, Nayron, Rafaela, Marina, Sandro, Aristides, Camila, Bethânia, Nivis e Alan.

Ao grande amigo e colaborador, Big Tomás, por não medir esforços nem tempo para ajudar a todos, com muita simplicidade e de todo coração.

Aos demais companheiros do Laboratório de Associações Micorrízicas, são muitos: Camila, Tomás, Nivis, Thuany, Alan, Bruno C., Marli, Clemente, Zé Maria, Bruno M., Conrado, Aninha, Emiliane, Everaldo, Isabelle, Laélia, Thiago M., Marina, Rafaela, Nayron, Thiago P., Maria, Leandro, Letícia, Meiriele, Nicolly, Melissa, Fábio, Alex, Dalila, Felipe, Phillipi, Lidiane, Melissa, Marcos, Maiane, Érica, Raíssa, Bethânia...

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, que marcaram o início da caminhada na UFV: Bianca, Sandro, Aristides, Filipe, Estênio, Naty, Thiago, Aldo, Adalgisa, Galdino... Aos amigos agricultores de Araponga pela amizade e oportunidade de iniciar essa caminhada.

Aos amigos Sujos, que fizeram os dias extremamente divertidos, pelo carinho e participação constante em cada passo: Kali, Tomás, Alan, Thyara, Lucas, Vanessa, Aneli, Rita, Sandro e Aristides.

Aos amigos e colaboradores do Café com Agroecologia, sobretudo aqueles que comigo abraçaram o desafio desde o início: Naty, Thiago, Silvia Priore, Adalgisa, Felipe, Ricardo Santos, Vicente Casali.

Aos amigos do NEMA (Núcleo de Estudos em Microbiologia Agrícola), agremiação estudantil pouco comum na Pós-graduação e que muito tem realizado em prol do ensino, pesquisa e extensão, especialmente a Alan, Tomas, Lucas, Catarina e Hilário.

À Biothar: Kali, Alan e Nivis, que ainda circula no mundo dos sonhos, mas já se consolidou como espaço de motivações e aprendizados.

Aos mestres e amigos da UFBA, onde iniciei as minhas atividades acadêmicas, sobretudo aos companheiros do LABPOR, LENI e ECOPOL. E aos amigos da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA).

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) pela concessão de bolsa de estudos durante o curso e juntamente com a CAPES e a FAPEMIG pelo apoio financeiro às pesquisas.

À Alexandra Elbakyan, criadora do site Sci-hub, que permite que o conhecimento gerado circule por onde os recursos financeiros são escassos.

Às plantas e aos microrganismos, pelos nossos alimentos, pelas vibrações mágicas, estéticas, festivas e inebriantes, que nos mantêm vivos, felizes e saudáveis.

A você que de alguma forma contribuiu durante essa caminhada. **Gratidão!**

## BIOGRAFIA

PAULO PRATES JÚNIOR, filho de Paulo Prates e Maria Sirlei Alves Prates, nasceu em 07 de março de 1986 em Caculé – Bahia. Em Caculé cursou o Ensino Fundamental na Escola Estadual Dr. Antônio Muniz (1993 a 1996) e o Ensino Fundamental no Colégio Estadual Noberto Fernandes (1997 a 2000).

Fez o curso secundário (2001 a 2003), concomitante com o curso Técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal Antônio José Teixeira, Guanambi – BA, atual Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano.

Em agosto de 2005 começou a graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador – BA, com iniciação científica no Laboratório de Ecologia Nutricional de Insetos (LENI) e Laboratório de Ecologia da Polinização (ECOPOL), concluindo o curso em julho de 2010.

Em 2010 iniciou atividades no Laboratório de Fitopatologia da EBDA (Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola), enquanto bolsista de Gestão de Ciência e Tecnologia da FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia), permanecendo até julho de 2012.

Em novembro de 2012 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Federal de Viçosa, tornando-se Msc. em fevereiro de 2014.

Em março de 2014 iniciou o Doutorado em Microbiologia Agrícola, submetendo-se à defesa de Tese em 22 de fevereiro de 2018.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
APRESENTAÇÃO – O CONTEXTO DA PESQUISA .....	1
Referências.....	9
ESTRUTURA GERAL DO TRABALHO.....	11
CAPÍTULO 1: Fungos micorrízicos e solo de plantas adultas da mesma espécie favorecem a sobrevivência e crescimento de mudas de vinhático ( <i>Plathymentia reticulata</i> Bentham) .....	13
Resumo .....	13
Introdução .....	13
Material e métodos.....	16
Obtenção de sementes e substratos .....	16
Obtenção de inoculantes de FMA, <i>Piriformospora indica</i> e rizóbio .....	17
Desenho experimental e inoculação .....	18
Medida de crescimento, dependência micorrízica e nodulação .....	18
Colonização micorrízica.....	18
Avaliação do perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de vinhático .....	19
Análises estatísticas.....	19
Resultados .....	20
Sobrevivência das plantas .....	20
Medida de crescimento .....	20
Dependência micorrízica, nodulação e colonização micorrízica .....	20
Perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de vinhático.....	21
Discussão .....	23
Agradecimentos .....	26
Referências.....	27
Material Suplementar.....	35
CAPÍTULO 2: Adição de solo de uma planta adulta da mesma espécie ao substrato comercial e a inoculação com FMA e rizóbio promovem o crescimento e nodulação de vinhático .....	36
Resumo .....	36
Introdução .....	37
Material e métodos.....	39
Obtenção de sementes e substratos .....	39
Obtenção de inoculantes de FMA e rizóbio .....	39
Desenho experimental e inoculação .....	40
Medidas de crescimento, teor de nutrientes e nodulação .....	40
Caracterização físico-química dos substratos de cultivo.....	41
Avaliação do perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de vinhático .....	42
Análises estatísticas.....	43
Resultados .....	43
Sobrevivência, crescimento, teor de nutrientes e nodulação.....	43
Caracterização físico-química dos substratos de cultivo.....	45
Perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de vinhático.....	45
Conclusões.....	51

Agradecimentos .....	51
Referências.....	51
Material Suplementar.....	58
CAPÍTULO 3: Fungos micorrízicos arbusculares aumentam o crescimento e melhoram o aproveitamento de fósforo durante a produção de mudas de <i>Plathymenia reticulata</i> Bentham .....	59
Resumo .....	59
Introdução .....	59
Material e métodos.....	61
Sementes e substratos.....	61
Obtenção de inoculantes de FMA e rizóbio .....	62
Desenho experimental e inoculação .....	62
Medida de crescimento, teor de nutrientes, dependência micorrízica e nodulação .....	63
Resultados .....	63
Medidas de crescimento, teor de nutrientes, dependência micorrízica e nodulação .....	63
Discussão .....	67
Conclusões .....	69
Agradecimentos .....	69
Referências.....	69
Material Suplementar.....	74
CAPÍTULO 4: <i>Plant-soil feedback</i> positivo no crescimento de mudas de braúna ( <i>Melanoxylon brauna</i> Schott).....	75
Resumo .....	75
Introdução .....	75
Material e métodos.....	77
Obtenção de sementes e substratos .....	77
Obtenção de inoculantes de FMA, <i>Piriformospora indica</i> e rizóbio .....	78
Medidas de crescimento, dependência micorrízica e nodulação.....	80
Colonização micorrízica.....	80
Avaliação do perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de braúna .....	80
Análises estatísticas.....	81
Resultados .....	81
Sobrevivência das plantas e medidas de crescimento .....	81
Dependência micorrízica, colonização micorrízica e nodulação .....	82
Perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de braúna.....	82
Discussão .....	85
Conclusões .....	88
Agradecimentos .....	88
Referências.....	88
Material Suplementar.....	95
CAPÍTULO 5: Adição de solo de uma planta adulta da mesma espécie ao substrato comercial e a inoculação com FMA promovem o crescimento e nodulação de braúna .....	96
Resumo .....	96
Introdução .....	96
Material e métodos.....	98
Inoculantes de FMA e rizóbio.....	98
Desenho experimental e inoculação .....	99
Caracterização físico-química dos substratos .....	100

Resultados .....	101
Sobrevivência e crescimento das plantas .....	101
Caracterização físico-química dos substratos .....	102
Discussão .....	103
Conclusão.....	105
Agradecimentos .....	105
Referências.....	105
Material Suplementar.....	110
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	111

## RESUMO

PRATES JÚNIOR, Paulo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. ***Plant soil feedback e inoculação de fungos micorrízicos em mudas de vinhático e braúna.*** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: Marliane de Cássia Soares da Silva e Aloísio Xavier.

A produção de mudas de espécies nativas, a exemplo de vinhático e braúna, é altamente relevante para recompor áreas florestais e favorecer a conectividade funcional e o fluxo gênico entre espécies. Entretanto, essas duas espécies apresentam sobrevivência menor que 2 % quando cultivadas em substrato comercial em condições de viveiro, o que pode estar relacionada à ausência de microrganismo simbioses nos substratos de cultivo. Essa questão abre espaço para a interseção de diferentes campos de conhecimento, dentre os quais a ecologia, botânica, engenharia florestal, ciências do solo e microbiologia que, avaliados de modo integrado, podem auxiliar na compreensão do problema de pesquisa. Esta tese teve como objetivo avaliar a teoria do *plant-soil feedback* por meio da sobrevivência e o crescimento de mudas de vinhático e braúna, inoculadas com microrganismo simbioses provenientes de uma planta adulta da mesma espécie. Para tanto, as mudas foram crescidas em diferentes proporções de substrato:solo, bem como da fertilização com P, avaliando-se o crescimento vegetal e a comunidade microbiana, para entender a dinâmica da simbiose entre plantas e a comunidade microbiana. Deste modo, este estudo mostrou que tanto o vinhático como a braúna apresentam *plant-soil feedback* positivo e estabelecem associação com *Bradyrhizobium* sp. Entretanto, diferentemente de vinhático, braúna parece não ser uma espécie caracteristicamente micorrízica. Os estudos demonstraram também que as características físico-químicas dos substratos influenciam a comunidade microbiana, o pH e a disponibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento dessas espécies. Este estudo abriu a possibilidades de explorar aspectos da simbiose micorrízica e com rizóbios por meio do *plant-soil feedback*, fertilização e alterações nos substratos de cultivo, demonstrando a importância de se associar a composição do substrato com os microrganismo benéficos para garantir a sobrevivência e o crescimentos das espécies nativas.

## ABSTRACT

PRATES JÚNIOR, Paulo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. ***Plant soil feedback and inoculation of mycorrhizal fungi on Braúna e Vinhático seedlings***. Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Marliane de Cássia Soares da Silva and Aloísio Xavier.

The production native species seedlings, such as vinhático and braúna, is highly relevant to recompose forest areas and favour functional connectivity and gene flow between species. However, both tree species present survival less than 2 % when are grown on commercial substratum in nursery conditions, which may be related to the absence of symbiotic microorganisms in the growing substrates. This issue opens space for the intersection of different fields of knowledge, such as ecology, botany, forestry, soil sciences and microbiology, which, evaluated in an integrated way, can help in understanding the research problem. This thesis aimed to evaluate the plant-soil feedback theory by means of the survival and growth of saplings of Vinhático and Braúna, inoculated with symbiotic microorganisms from an adult plant of the same species. For that, the seedlings were grown in different proportions of substrate:soil, as well as P fertilization, for evaluating plant growth and microbial community to understand the dynamics of symbiosis between plants and the microbial community. Thus, this study showed that both Vinhático and Braúna present positive plant-soil feedback and establish association with *Bradyrhizobium* sp. However, unlike Vinhático, Braúna seems not to be characteristically mycorrhizal species. Studies have also shown that the physico-chemical characteristics of the substrates influence the microbial community, pH and nutrient availability and, consequently, the growth of these species. This study opened the possibilities of exploring aspects of symbiosis with mycorrhiza and rhizobia through plant-soil feedback, fertilization and alterations in the cultivation substrates, demonstrating the importance of associating the substrate composition with the beneficial microorganisms to guarantee the survival and the growth of native species.

## APRESENTAÇÃO – O CONTEXTO DA PESQUISA

Cada trabalho acadêmico possui partes que ficam encobertas, talvez por tradição ou supervalorização de virtudes epistêmicas, tais como objetividade, neutralidade, linguagem técnica e impessoalidade. Assim, muitas ideias e informações interessantes se perdem e ficam apenas nas conversas de corredores e reuniões de laboratório. É preciso reconhecer que pesquisas científicas dependem de aspectos históricos, psicológicos e socioeconômicos e, portanto, a monografia, dissertação ou tese deveria conter um pouco da história e da motivação que nos conduzem aos problemas de pesquisa. Por isso, iniciei a escrita contando um pouco das entrelinhas que nos conduziram as perguntas e as estratégias experimentais do presente trabalho.

Muito do que planejei deu errado ou não foi possível executar, mas os erros e dificuldades foram importantes para reflexões e construção de novas hipóteses. Algumas dessas informações serão citadas brevemente para atizar a curiosidade ou mesmo poupar tempo em outras investigações. Posso dizer que nessa jornada fui movido não apenas pelas ideias, mas também pelos sentimentos e encantos, tive o prazer de conviver com uma ótima equipe de trabalho e de conhecer melhor e me apaixonar pelos meus objetos de pesquisa: solos, vinhático e braúna, rizóbios, fungos micorrízicos arbusculares e microrganismo promotores de crescimento de plantas, interagindo em vários níveis de organização. Além disso, tive a oportunidade de apreciar um pouco do conhecimento empírico do Sr. Leacir B. da Silva, Antônio Carlos e Alex F de Freitas (que muito aprendeu com seu pai, Sr. Sebastião, *in memorian*), os quais reuniram percepções mais espontâneas sobre o mundo e nos permitiram enxergar outras possibilidades experimentais.

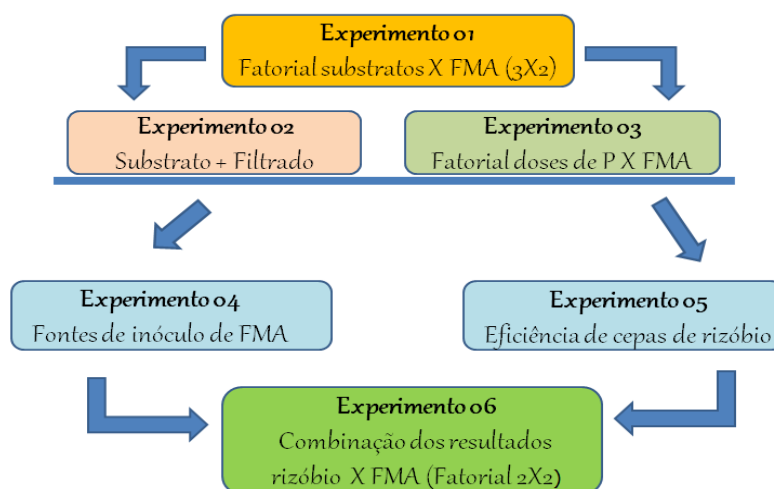
O problema motivador desta tese foi a baixa sobrevivência (menor que 2 %) de vinhático (*Plathyenia reticulata* Bentham) e braúna (*Melanoxylon brauna* Schott) nos viveiros da SIF – Sociedade de Investigações Florestais, Viçosa-MG, 2012 a 2014. Este problema foi apresentado à professora Maria Catarina M. Kasuya, durante o Nativas – Simpósio Nacional sobre Produção de Sementes e Mudas, em maio de 2014, pelo professor Aloísio Xavier e, posteriormente, pelo assistente técnico Alex de Freitas.

Diante disto, fui convidado a defender a hipótese que a presença de microrganismo simbioses provenientes do solo de plantas adultas da mesma espécie e/ou a inoculação com fungos micorrízicos e rizóbio favorecem a sobrevivência e crescimento de plantas de vinhático e braúna em condições de viveiro. Os resultados corroboram com essa hipótese, indicando a existência de microrganismo benéficos no solo de ambas as plantas, na perspectiva da teoria do *plant-soil feedback* (REVILLINI *et al.*, 2016). Reforça, também, a

importância da inoculação de microrganismo simbiotes, tais como fungos micorrízicos e rizóbios nos substratos de cultivo, que estabelecem troca recíproca de recursos e se mantêm conectados com as plantas. Nessa perspectiva, podemos dizer que a comunicação entre parceiros e concorrentes via redes sociais é mais antiga que a internet, porque muitas plantas dependem dessa interconexão com diversos microrganismo para manter seu *fitness*.

Os ensaios experimentais e fundamentação teórica foram iniciados com a participação do Bolsista de Iniciação Científica Júnior (BIC-Júnior), Bruno M. Silva e a Iniciação Científica (IC) de Thuany C. Jordão (estudante de Agronomia). Os estudantes auxiliaram na montagem de um experimento piloto com o solo proveniente de uma planta adulta de vinhático e braúna, separadamente. Os resultados do piloto realizado com vinhático foram apresentados no SIA (Simpósio de Integração Acadêmica) da UFV, Viçosa, em 2015. A alta mortalidade de braúna não permitiu a realização de análises estatísticas, mas por comparação com plantas da mesma idade que foram mantidas à sombra e apresentaram maior crescimento, percebemos a necessidade de reduzir a luminosidade, por meio de sombrite. Assim, trabalhos futuros poderão avaliar diferentes níveis de luminosidade, temperatura e umidade do ar no crescimento de braúna, visando aperfeiçoar as condições de cultivo, bem como a influência desses fatores na composição da microbiota associada à planta.

Com os resultados do experimento piloto e levantamento bibliográfico, percebemos que muito pouco era conhecido sobre ambas às espécies vegetais utilizadas como modelo no presente trabalho. Desta forma, o nosso grupo de pesquisa reconheceu a importância de trabalhar com uma sequência de experimentos (Figura 1), para ambas as espécies, os quais pudessem otimizar esforços e entendimentos dos resultados. Embora o planejamento inicial não tenha sido realizado na íntegra, é preciso reconhecer a importância de mirar além do possível para atingir o alvo com maior precisão e acurácia.



**Figura 1:** Estratégia experimental adotada para a condução dos experimentos com vinhático e braúna, separadamente.

Para realização dos experimentos, pensando na dependência simbiótica e processos coevolutivos entre plantas e microrganismo (SELOSSE *et al.*, 2004; 2015), o solo proveniente da área de influência de uma planta adulta de vinhático e braúna foi obtido: a) município de Viçosa-MG, na localidade de Duas Barras (S 20° 39' 925", W 42° 59' 549", 563 m de altitude), fragmento de mata e b) distrito de Abaíba, Leopoldina-MG (S 21° 33' 708", W 42° 36' 003", 273 m de altitude), área de pastagem com *Urochloa* sp, respectivamente. Foi considerado um raio de 2 m, na camada de 0-20 cm, em mais de 15 pontos distribuídos aleatoriamente para obtenção de uma amostra composta (Figura 2) para ambas as espécies separadamente. O substrato comercial (Tropstrato Florestal, Vidaverde®) utilizado foi à base de casca de pinus e vermiculita expandida, acrescida de macro e micronutrientes.



**Figura 2:** Esquema da amostragem de solo na área de influência de uma planta adulta da mesma espécie, camada de 0-20 cm de solo e raio de 2 m da base do caule da planta.

O primeiro experimento foi organizado em esquema fatorial 3x2, com três tipos de substrato de cultivo para ambas as plantas, separadamente: 1) substrato comercial = Sub; 2) solo da área de influência de uma planta adulta esterilizado = Ste; 3) solo da área de influência de uma planta adulta natural = Nat, inoculados ou não com uma mistura de fungos micorrízicos arbusculares (FMA: *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Gigaspora albida*) e *Piriformospora indica* (Basidiomycota, Sebaciniales, Sebacinaceae). Todos os tratamentos foram inoculados com *Bradyrhizobium* sp., obtidos de nódulos de vinhático e braúna, conforme detalhamento na página 6. Amostras dos substratos de cultivo foram utilizadas para extração do DNA total e sequenciamento de *amplicons* (ITS e 16S) pela Plataforma Illumina®, demonstrando diferenças na composição da comunidade microbiana. Os resultados parciais do experimento com vinhático foram apresentados pela professora M.

Catarina M. Kasuya no Fertbio 2016, e por mim no Congresso Latinoamericano de Micologia, em Lima, Peru. Os resultados do experimento com braúna foram apresentados por mim no SIMB (Simpósio Internacional de Microbiologia e Biotecnologia), em 2016.

Em paralelo ao primeiro experimento, para efeito de comparação, foi mantido um tratamento com solo proveniente da mesma planta sem a inoculação de rizóbio. Não houve diferença entre os tratamentos com e sem rizóbio, o que pode indicar que a planta depende de outros microrganismo para garantir seu *fitness* ou que a estirpe utilizada não apresenta eficiência simbiótica. Ao mesmo tempo foi montado um experimento com EM - *Effective Microorganisms* (BONFIM *et al.*, 2011, AHN *et al.*, 2014) e fungos micorrízicos para vinhático e braúna, separadamente. A ideia de inocular EM surgiu pelo relato do professor Aloísio Xavier, sobre um trabalho de estudantes na disciplina Propagação de Espécies Florestais (ENF 330), com aumento da sobrevivência e crescimento de braúna. Os resultados do experimento com EM e vinhático foram apresentados como resumo expandido no SIMPA (Simpósio de Pós-graduação em Agroecologia) 2015, por Thuany C. Jordão. A alta mortalidade do experimento de braúna com EM, conduzido pelo IC, Alex C. Nogueira, não permitiu a realização de análises estatísticas. Entretanto, os resultados deste experimento piloto permitiram levantar a hipótese de incompatibilidade entre FM e EM, uma vez que a inoculação conjunta apresentou maior mortalidade, similar ao tratamento controle (sem FM e sem EM). Seria interessante realizar alguns ensaios com EM e a germinação de esporos de FMA, *in vitro*, na tentativa de avaliar efeitos antagônicos ou sinérgicos entre estes microrganismo.

Posteriormente, foi realizado outro experimento com EM e braúna, conduzido pelo IC, Nayron V. Diogo (estudante de Agronomia), em esquema fatorial 2x2, para testar os efeitos da presença ou ausência de EM e presença ou ausência de rizóbio. Não houve diferença no crescimento das plantas. Em paralelo a este experimento foi montado um piloto com número reduzido de repetições (n = 2). Os melhores resultados, baseado apenas em avaliações visuais foram: a) a inoculação de uma única espécie de FMA, *Rhizophagus clarus*, b) semeadura diretamente no substrato de cultivo, c) a inoculação apenas com *P. indica*. A interpretação dos resultados nos leva a crer que braúna pode apresentar maior especificidade simbiótica e que o recrutamento de microrganismo benéficos pode ocorrer precocemente, na fase de germinação. Ensaio com a inoculação de EM diretamente nas sementes, antes da germinação, pode ser uma estratégia experimental interessante, bem como a inoculação de uma única espécie de FMA ou *P. indica* apenas.

O fungo promotor de crescimento de plantas, *P. indica*, não foi utilizado nos experimentos subsequentes porque existem discussões conceituais importantes relacionadas à

natureza endofítica ou micorrízica deste fungo. Tendo em vistas as críticas sobre a inoculação de *P. indica* nos trabalhos de Bruno C. Moreira com abacaxi, nos quais fui coautor, optamos por trilhar um caminho mais fácil e não utilizar este fungo como inoculante, simplificando os experimentos subsequentes pela inoculação de apenas FMA. Entretanto, as características semelhantes aos FMA e o cultivo em meios de cultura é uma vantagem estratégica importante que deve ser considerada na produção e uso deste fungo como inoculante (Mishra *et al.*, 2014; Shrivastava & Varma 2014).

O experimento dois foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em diferentes proporções de substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO) (v:v). Foram seis tratamentos: (T1) 100 % de SUB, (T2) SUB acrescido de extrato de SOLO, (T3) 2/3 SUB e 1/3 de SOLO, (T4) 1/2 SUB e 1/2 de SOLO, (T5) 1/3 SUB e 2/3 de SOLO, e (T6) 100 % de SOLO. O extrato de SOLO foi adicionado para incluir a microbiota nativa do solo no substrato comercial. O DNA total do solo rizosférico de quatro repetições de cada um dos tratamentos foi extraído e utilizado no sequenciamento de amplicons ITS e 16S, pela Plataforma Illumina<sup>®</sup>. Parte dos resultados do experimento com vinhático foi apresentado pelo IC Felipe B. Nogueira (estudante de Engenharia Florestal) no Fertbio, 2016. Os resultados do experimento com braúna foram apresentados pelo IC, Nayron V. Diogo, no SIMB 2016. Os substratos de cultivo foram caracterizados seguindo a Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária nº 17 de 21 de maio de 2007 (MAPA, 2007), no Laboratório de Física do Solo, Departamento de Solos – UFV, sob a orientação do Professor Raphael B. A. Fernandes. A motivação para caracterizar os substratos surgiu porque as plantas de vinhático cultivadas nas proporções de solo e substrato (T3, T4, T5) estavam repletas de nódulos, enquanto T2 e T6 e as plantas do experimento 03, instalado no mesmo dia em 100 % de SOLO, não apresentavam nódulos. Esses resultados sugeriram que mudanças nas características físico-químicas dos substratos de cultivo, estimulavam a nodulação, talvez porque o aumento da heterogeneidade modula a resposta da planta na busca por nutrientes (GLEASON, 1939; HODGE, 2004) ou porque facilita a difusão de voláteis utilizados na comunicação microrganismo/microrganismo ou microrganismo/planta (SCHULZ-BOHM *et al.*, 2017). Essas informações foram ao encontro do trabalho de doutorado em Ciência Florestal (UFV) de Antônio Matos (MATOS, 2017), relatadas pelo professor Haroldo N. de Paiva, as quais apontavam a capacidade de campo como um fator capaz de diminuir a mortalidade de braúna, sugerindo que fatores como aeração e umidade poderiam modular a resposta da planta e/ou da microbiota associada.

O experimento três (3.1) foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (5x2), com cinco doses de P (0, 50, 150, 300 e 450 mg dm<sup>-3</sup>), na forma de

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  via solução, inoculados ou não com uma mistura de FMA (*Rhizophagus clarus*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Gigaspora albida*), em solo de uma planta adulta da mesma espécie. Todos os tratamentos foram inoculados com *Bradyrhizobium* sp. Os resultados do experimento de vinhático foram apresentados por Nayron V. Diogo no Fertbio 2016. Os resultados prévios do experimento com braúna indicaram que a planta não respondeu a inoculação com FMA e que pode não responder a adubação fosfatada. Até o momento, estes resultados não foram apresentados em nenhum evento científico. É possível que espécies secundárias iniciais a clímax, de crescimento lento, tais como braúna, respondam de maneira diferenciada à fertilização e não sejam caracteristicamente micorrízicas. Para o vinhático foi conduzido um segundo experimento (3.2) em arranjo fatorial (5x2), com cinco doses de P (50, 100, 150, 300 e 450  $\text{mg dm}^{-3}$ ), na forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  via solução, inoculados ou não com as mesmas espécies de FMA e rizóbio, desta vez cultivado em 1/2 de SUB e 1/2 de SOLO, devido a essa proporção ter promovido o crescimento de vinhático no experimento dois. Em termos de crescimento, os resultados foram similares ao primeiro experimento com doses de P (3.1), tanto para as dose de P quanto para FMA. Houve a formação de nódulos em todos os tratamentos, embora em quantidade reduzida, variando de zero a 103, o que pode sinalizar a importância de efeitos temporais, relacionados à luminosidade, temperatura e umidade do ar ou mesmo o comportamento decíduo de vinhático que influencia a formação de nódulos.

Foram isoladas cinco estirpes de rizóbio provenientes tanto de plantas de vinhático quanto de braúna no viveiro do IEF (Instituto Estadual de Florestas, Viçosa, MG), Anglo American (Conceição do Mato Dentro, MG) e num fragmento de mata em Viçosa, MG. As estirpes foram preservadas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  em meio NBY e tiveram seu DNA extraído e sequenciado pela amplificação parcial do gene 16S rRNA, com os *primers* 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) e foram comparadas ao banco de dados do NCBI para identificação das estirpes. Todas as cinco estirpes foram identificadas como *Bradyrhizobium*. Não foi possível isolar maior número e avaliar a eficiência simbiótica de cepas de rizóbio, conforme planejado (Figura 1), entretanto, é uma abordagem importante em termos de produção de mudas, uma vez que a eficiência simbiótica varia muito entre isolados (ARAÚJO *et al.*, 2017).

Inóculos indígenas de FMA foram obtidos a partir do solo da área de influência de uma planta adulta de vinhático e braúna, separadamente, pelo método *on farm* (SCHLEMPER & STÜRMER, 2014). Os inóculos seriam utilizados em experimentos adicionais (Figura 1) e os morfotipos seriam identificados em parceria com o Professor Sidney Stürmer da Universidade Regional de Blumenau (FURB). Essa estratégia permitiria a identificação de espécies de FMA que ocorrem na área de influência de uma planta adulta da mesma espécie,

as quais possivelmente adaptadas com as plantas. Entretanto, não foi possível avançar na realização dessa etapa. Após o meu exame de qualificação percebemos que havíamos gerado grande quantidade de informações, mas com pouca sistematização de resultados. Assim, a estratégia foi concentrar esforços na organização das informações e produção de manuscritos.

Foi realizado, ainda, o isolamento de rizobactérias em plantas de vinhático (viveiro e campo) e uma planta adulta de braúna (campo). Após a diluição seriada as amostras foram plaqueadas em meio de cultura ágar nutriente. Para o isolamento seletivo de bactérias formadoras de endósporos, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 80 °C durante 20 min e plaqueadas em meio BDA. Após a confirmação da pureza as culturas foram preservadas a -80 °C em meio NBY. O potencial das rizobactérias foi testado em parceria com o mestrando Thiago A. Paula do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia – UFV, quanto à capacidade de solubilizar fosfato inorgânico e produção de AIA. Os resultados preliminares foram apresentados por Thiago no IV Simpósio Mineiro de Ciência do Solo como resumo expandido; por Dalila L.de O. Soares (estudante de Bioquímica) no I Simpósio de Microbiologia da UFV e por Nayron V. Diogo no XXIX Congresso de Microbiologia. É necessário fazer a caracterização morfológica e molecular e realizar testes complementares para a seleção desses isolados, buscando correlacionar com os resultados do sequenciamento de *amplicons*.

Foram realizados experimentos adicionais com a participação de duas BIC-Júniors, Marina A. Cruz e Rafaela S. Silva, os trabalhos “Fungos micorrízicos arbusculares e adubação nitrogenada na produção de mudas de vinhático” e “A inoculação com rizóbio e adubação nitrogenada não aumenta o crescimento de vinháticos (*Plathymenia reticulata* Bentham)”, respectivamente, apresentados no SIA, 2017. Em ambos os trabalhos as plantas foram cultivadas em vasos com capacidade de um litro, providos com proporção 1/2 SUB e 1/2 de SOLO, adubados com 150 mg de P dm<sup>-3</sup>. Os tratamentos que continham nitrogênio foram adubados com 200 mg de N por dm<sup>-3</sup>, cuja a fonte foi sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, parcelado 5 vezes em intervalos de 7 dias. Os resultados indicaram que a adubação nitrogenada e a inoculação com rizóbios não aumentam o crescimento de vinhático quando inoculadas com FMA e adubadas com 150 mg de P por dm<sup>-3</sup>. De qualquer modo, corroboram com os experimentos anteriores que evidenciaram os FMA como promotores de crescimento de vinhático.

Não foram realizados experimentos envolvendo correção da saturação por bases ou pH dos substratos de cultivo. Entretanto é reconhecido que vinhático responde negativamente a correção com carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e carbonato de magnésio (MgCO<sub>3</sub>) (de FREITAS *et al.*, 2017). Não são conhecidas pelo nosso grupo de pesquisa, informações sobre a resposta

de braúna a correção da saturação por bases. É preciso testar a resposta de braúna à correção por bases, associado à inoculação com FMA e os efeitos na nodulação radicular por rizóbios.

Existem relatos de que a braúna é reconhecida em campo pelas folhas recobertas por uma camada esbranquiçada (A. L. Pinheiro inf. pessoal), que são na verdade estruturas de oídio (*Oidium*, Ascomycota, Erysiphaceae), o que demanda uma investigação sobre fitopatógenos que acometem essa planta. As sementes de braúna mesmo com a desinfestação superficial realizada antes da germinação em placas de Petri, apresentaram alta incidência de fungos filamentosos. Isto pode estar associado à alta incidência de patógenos nos frutos (FREIRE *et al.*, 2013) que são repassados às sementes, podendo diminuir o seu *fitness* e contribuir para torná-la ameaçada de extinção pelo baixo recrutamento de juvenis. Além disso, as sementes de braúna são atacadas por insetos, dificultando encontrar sementes viáveis para germinação (SILVA *et al.*, 2013). Investigações em nível de campo, capazes de detectar fitopatógenos associados à braúna seria uma importante contribuição para o conhecimento da microbiota de uma planta ameaçada de extinção, que pode abrigar, devido processos co-evolutivos, espécies microbianas também ameaçadas de extinção (por exemplo, da SILVA *et al.*, 2016).

Durante o meu exame de qualificação, uma das propostas da banca examinadora foi “identificar um artigo recente capaz de impactar o assunto da tese”. Selecionei o artigo “The role of locally adapted mycorrhizas and rhizobacteria in plant-soil feedback systems” (REVILLINI *et al.*, 2016) por uma combinação de fatores aleatórios, mas que de algum modo tirei muito proveito. As leituras sobre *plant soil feedback* (PSF), abriu possibilidade para investigações teóricas e experimentações. As plantas têm a capacidade de alterar propriedades bióticas e abióticas do solo e, assim, modular a sobrevivência e crescimento de coespecíficos juvenis ou plantas próximas. Com a leitura surgiram perguntas tais como: o PSF positivo pode ser tão forte a ponto de ocasionar mortalidade de algumas espécies de plantas? Como as Fabaceae respondem ao PSF em zonas temperadas e nos trópicos? Qual o papel do ambiente no PSF? Essas perguntas vão ao encontro das informações obtidas até o momento, abrem possibilidades para a produção de mudas de espécies nativas e espaço para maior entendimento sobre a relação planta/solo/microrganismo. Embora, essas questões não tenham sido avaliadas de maneira mais cuidadosa por mim ou por nosso grupo de pesquisa, espero que estas possam, ainda, pertubar e alegrar algumas das minhas noites de sono.

Avançamos no entendimento de algumas questões relacionadas a vinhático e braúna e microrganismo associados, entretanto, há muito para ser investigado. Os sistemas biológicos estão sujeitos a uma cadeia de eventos complexos e estocásticos que abrem possibilidades para muitos problemas causais na explicação dos fenômenos. Buscamos, com a realização de

o presente trabalho, destacar o papel de microrganismo simbiontes na produção de espécies florestais nativas, mas outras abordagens, a exemplo de fisiologia, nutrição e ecologia vegetal, características físico-químicas dos substratos são importantes para ampliar o conhecimento e garantir a produção de mudas de qualidade. O problema inicial, embora melhor entendido, ainda não possibilitou a resolução da motivação prática inicial – que foi a produção de mudas de algumas espécies florestais nativas sem utilizar o solo de uma planta adulta da mesma espécie, porque isto implica em dificuldades logísticas, custos e legislação, comprometendo a produção de mudas em maior escala. Esforços deverão ser direcionados para maior entendimento por meio de pesquisa básica sobre PSF, associado com empreendedorismo e inovação na produção de inóculos. De qualquer sorte, esperamos que os leitores possam encontrar algo relevante e motivador ao longo do texto, ainda que percebam algumas ou várias deficiências conceituais e/ou experimentais.

## Referências

AHN, K., LEE, K. B., KIM, Y. J., KOO, Y. M. Quantitative analysis of the three main genera in effective microorganisms using qPCR. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 31: p. 849–854, 2014.

ARAÚJO, K. S.; de CARVALHO, F.; MOREIRA, F. M. S. Estirpes de *Burkholderia* promovem o crescimento de *Mimosa* spp. mas não o de *Macroptilium atropurpureum*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 1, p. 41-48, 2017

BONFIM, F. P. G., Honorio, I.C.G., Reis, I. L., PEREIRA, A. J., Souza, B. S. Caderno dos Microrganismos Eficientes. 2011. Desenvolvimento de material didático ou instrucional - **Cartilha**. Disponível em <<http://estaticog1.globo.com/2014/04/16/caderno-dos-microrganismoseficientes.pdf>>. Acesso em 07/08/2016.

da SILVA, M.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L.; FERNANDES, F. M.; BARRETO, R. W. Naming potentially endangered parasites: foliicolous mycobiota of *Dimorphandra wilsonii* a highly threatened brazilian tree species. **PlosOne**, v. 11, n. 2, 2016.

de FREITAS, E. C. S.; PAIVA, H. N.; LEITE, H. G.; OLIVEIRA NETO, S. N. Effect of phosphate fertilization and base saturation of substrate on the seedlings growth and quality of *Plathymentia foliolosa* Benth. **Revista Árvore**, vol.41, n.1, 2017.

FREIRE, J. M.; DE AZEVEDO, M. C.; CUNHA, C. F.; DA SILVA, T. F.; RESENDE, A. S. Fenologia reprodutiva de espécies arbóreas em área fragmentada de Mata Atlântica em Itaboraí, RJ. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 75, p.243-252, 2013.

GLEASON, H. A. The individualistic concept of the plant association. **American Midland Naturalist**, v. 21, n. 1, p. 92-110, 1939.

HODGE A. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. **New Phytologist**, v. 162, p. 9–24, 2004.

MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 31, de 23 de outubro de 2008. Altera os subitens 3.1.2, 4.1 e 4.1.2, do Anexo à Instrução 91 Normativa SDA nº 17, de 21 de maio de 2007. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-17-de-21-05-2007-aprova-metodo-substrato.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2017.

MATOS, A. C. B. **Análise fisiológica e molecular da germinação de sementes de Braúna (*Melanoxylon brauna* Schott) sob estresses hídrico e salino**. 2017. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.

MISHRA, M.; PRASAD, R.; VARMA, A. Rootonic with bio-zinc to accelerate *Pennisetum glaucum* seed germination and plant growth. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Science**, v. 4, n. 3, p. 552-561, 2014.

REVILLINI, D.; GEHRING, C. A.; JOHNSON, N. C. The role of locally adapted mycorrhizas and rhizobacteria in plant-soil feedback systems. **Functional Ecology**, v. 30, p. 1086-1098, 2016.

SCHLEMPER TR, STÜRMER SL. On farm production of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum using lignocellulosic agrowastes. **Mycorrhiza**, v. 24, p. 571-80, 2014.

SCHULZ-BOHM K, MARTÍN-SÁNCHEZ L, GARBEVA P. Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra and inter kingdom interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-10, 2017.

SELOSSE, M.-A. BAUDOUIN, E. VANDENKOORNHUYSE P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes-rendus Biologies**, v. 327, p. 639-648, 2004.

SELOSSE, M.-A. STRULLU-DERRIEN, C. MARTIN, F. KAMOUN, S. KENRICK, P. Plants and fungi : a 400 million year affair that shapes the biosphere ? **New Phytologist**, v. 206, p. 501–506, 2015.

SHRIVASTAVA, S.; VARMA, A. From *Piriformospora indica* to Rootonic: A review. **African Journal Microbiology Research**, v. 8, p. 2984-92, 2014.

SILVA, M. S.; BORGES, E. E. L.; LEITE, H. G.; CORTE, V. B. Biometria de frutos e sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae-Caesalpinioideae). **CERNE**, vol.19, n.3, p. 517-524, 2013.

## ESTRUTURA GERAL DO TRABALHO

Esta tese está dividida em cinco capítulos, no formato de artigos científicos, os três primeiros são referentes à experimentação com vinhático e dois últimos à experimentação com braúna, conforme a execução da estratégia experimental adotada (ver Figura 1 na seção anterior).

O primeiro capítulo é a apresentação do manuscrito Fungos micorrízicos e solo de plantas adultas da mesma espécie favorecem a sobrevivência e crescimento de mudas de vinhático (*Plathymenia reticulata* Bentham), o qual contempla aspectos da interação simbiótica entre fungos micorrízicos arbusculares, rizóbios e questões sobre o *plant-soil feedback* – PSF. Neste manuscrito, ficou evidente que vinhático responde positivamente ao cultivo no solo de uma planta adulta da mesma espécie e a inoculação com fungos micorrízicos.

No segundo capítulo é apresentado o manuscrito Adição de solo de uma planta adulta da mesma espécie ao substrato comercial e a inoculação com FMA promovem o crescimento e nodulação de vinhático, que demonstra a relação entre microrganismo do solo e a estrutura físico-química dos substratos de cultivo. Os resultados mostram que a mistura de solo de uma planta matriz da mesma espécie e substrato comercial inoculados com rizóbio e FMA aumenta o crescimento e a nodulação de mudas de vinhático.

O terceiro capítulo, Fungos micorrízicos arbusculares aumentam o crescimento e melhora o aproveitamento de fósforo durante a produção de mudas de *Plathymenia reticulata* Bentham, contempla fundamentos e aplicações da produção de espécies florestais. Os experimentos demonstram que FMA favorece o crescimento de vinhático e que o intervalo entre as doses de P de 160 a 280 mg dm<sup>-3</sup> é a que permite o melhor aproveitamento de P pelas mudas de vinhático quando inoculadas com FMA.

O quarto capítulo, referente à experimentação com braúna originou o manuscrito *Plant-soil feedback* positivo durante a produção de mudas de Braúna, o qual demonstra interações entre plantas, microrganismo do solo e seu ambiente, à luz da teoria do *plant-soil feedback*. Este experimento evidenciou que os microrganismo provenientes do solo de uma planta adulta de braúna atuam positivamente na sobrevivência e no seu crescimento.

O quinto capítulo Adição de solo de uma planta adulta da mesma espécie ao substrato comercial e a inoculação com FMA promovem o crescimento e nodulação de braúna, além das evidências das interações entre plantas, microrganismo do solo e seu ambiente, reforçou o PSF positivo em braúna e a existência de microrganismo benéficos em solo de plantas

adultas da mesma espécie, os quais podem ser essenciais para a sua sobrevivência e crescimento.

As considerações finais foram construídas, constando algumas perspectivas para a continuidade de ensaios teóricos e experimentais, de modo que essas possibilidades possam gerar conhecimentos sólidos, ainda que provisórios.

## **CAPÍTULO 1: Fungos micorrízicos e solo de plantas adultas da mesma espécie favorecem a sobrevivência e crescimento de mudas de vinhático (*Plathymenia reticulata* Bentham)**

### **Resumo**

- Existe grande necessidade de intensificação em pesquisas que permitam a produção de mudas de espécies florestais nativas, a exemplo de vinhático (*Plathymenia reticulata* Bentham) que apresentam baixa sobrevivência em viveiro quando cultivado em substrato comercial. Pouco se sabe sobre microrganismo simbioses associados a esta espécie vegetal, os quais podem ser fundamentais para a sobrevivência e crescimento da mesma.
- Propõe-se avaliar o efeito do solo proveniente de uma planta adulta da mesma espécie e a inoculação de fungos micorrízicos na sobrevivência e crescimento de vinhático, bem como identificar os microrganismo presentes nos substratos por sequenciamento de *amplicon* (Illumina).
- O experimento gerou informações sobre a otimização da sobrevivência e crescimento de vinhático, suportando a hipótese que o solo proveniente de uma planta adulta da mesma espécie apresenta *plant-soil feedback* positivo. Os resultados reforçam a importância de favorecer a permanência de simbioses nos substratos de cultivo.
- Fungos micorrízicos e solo proveniente de plantas adultas favorecem a sobrevivência e crescimento de mudas de vinhático (*Plathymenia reticulata* Bentham).

**Palavras-chave:** Mata Atlântica, Cerrado, fungos micorrízicos arbusculares, rizóbio, rizosfera, simbiose.

### **Introdução**

A Mata Atlântica e o Cerrado são *hotspots* mundiais de biodiversidade, considerados prioritários para a conservação (Myers *et al.*, 2000), mas encontram-se com menos de 12 % (Ribeiro *et al.*, 2009) e 45 % (Machado *et al.*, 2004), respectivamente, da sua área original. A redução da área desses dois biomas está diretamente associada a ações antrópicas, como a expansão das áreas agrícolas e pastagens, exploração madeireira e minerária, dentre outros fatores relacionados ao crescimento da população humana e aumento do uso dos bens naturais (Vitousek *et al.*, 1997, Brandon *et al.*, 2005, Coutinho, 2006, Rockström *et al.*, 2009). É reconhecido que a fragmentação florestal provoca a perda de indivíduos, diminuição do fluxo gênico (Ferreira *et al.*, 2015) e, conseqüentemente, a extinção de espécies.

Neste cenário, é essencial investir em processos de revegetação e restauração florestal, com a obtenção de propágulos em quantidade e qualidade, sendo o plantio de mudas um método adequado (Caldeira *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2015). Entretanto, algumas espécies

nativas da família Fabaceae com potencial para a revegetação, apresentam sobrevivência reduzida em viveiro, a exemplo de vinhático (*Platymenia reticulata* Benth), quando cultivado em substrato comercial.

O vinhático é uma espécie pertencente à família Fabaceae, Mimosoideae (= *P. foliolosa* Benth), que ocorre na Mata Atlântica e no Cerrado como ecótipos distintos (Lacerda *et al.*, 2002; Carvalho, 2009). O vinhático foi reconhecido como uma das espécies vegetais mais importantes do cerrado brasileiro, por seu valor comercial relacionado à madeira de qualidade e longa durabilidade (Lorenzi, 1992) e potencial em recuperação de áreas degradadas (EMBRAPA, 1994, UNESCO, 2000). É uma planta secundária inicial a clímax, decídua, que ocorre em solos de alta a baixa fertilidade (Carvalho, 2009), e tem bom desenvolvimento a pleno sol (Lorenzi, 1992). Apesar das características desejáveis para o reflorestamento, o vinhático tem sua multiplicação limitada, visto à baixa sobrevivência em viveiro (A. Xavier inf. pessoal). Essa limitação pode estar associada à ausência de microrganismo simbioses nos substratos de cultivos.

Embora o entendimento da diversidade de microrganismo associados a plantas e fatores que modulam as inter-relações sejam escassos (Quiza *et al.*, 2015, Agler *et al.*, 2016), existe ampla evidência de que estes são componentes chaves para as plantas, visto que em conjunto desempenham funções complementares, formando um metaorganismo ou hobionte (Agler *et al.*, 2016). Em condições naturais, plantas têm relações diretas com grande abundância e diversidade de microrganismo, adaptados a associações benéficas (Tringe *et al.*, 2005), que favorecem o *fitness* (Denison & Kiers, 2011), crescimento (Marques *et al.*, 2001), supressão de doenças (Berendsen *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2012), tolerância a estresse abiótico (Haney *et al.*, 2015), produtividade (Schnitzer & Klironomos, 2011) e estado geral da planta (Glick, 2014). As plantas dependem de interações benéficas com microrganismo, devido o longo processo coevolutivo que resultou em coadaptação, na qual a sobrevivência e crescimento de ambos os parceiros pode ser maior em solos previamente compartilhados (Thrall *et al.*, 2007; Cortois *et al.*, 2016).

Além disso, nutrientes críticos, tais como P e N, são convertidos pelos microrganismo e disponibilizados as plantas (Rodríguez & Fraga, 1999; Reed *et al.*, 2011), favorecendo o estabelecimento de espécies em condições naturais e melhora a produção agrícola ou florestal. A espécie *Dimorphandra wilsonii* Rizz (Fabaceae, Caesalpinioideae), por exemplo, tem a fixação biológica de nitrogênio como estratégia adaptativa para seu crescimento em solos distróficos (Fonseca *et al.*, 2010). Algumas espécies de bactérias nodulíferas podem, também, promover o crescimento vegetal mediante a produção de ácido-3-indolacético (AIA), solubilização de fosfato e disponibilização de outros nutrientes (Angus *et al.*, 2013).

Em termos de benefícios, muitas espécies de plantas tropicais dependem de fungos micorrízicos arbusculares FMA para se estabelecer e crescer (Siqueira & Saggin-Júnior, 2001, Zangaro *et al.*, 2003). Além disso, a inoculação pode favorecer a redução do uso de fertilizantes minerais, com menor tempo de formação de mudas em viveiro e maior chance de sobrevivência em campo (Machineski *et al.*, 2009, Goetten *et al.*, 2016). As mudas associadas aos FMA mostram-se vigorosas, uniformes, apresentam melhor crescimento e desenvolvimento, melhor estado nutricional, adaptação a estresses (Moreira *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2008) e aumentam a densidade de bactérias na rizosfera (Neeraj, 2011). Os FMA também podem ser inoculados em associação com bactérias diazotróficas para promover o crescimento e aumento da biomassa de plantas (Jesus *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2012).

A inoculação conjunta de FMA e do fungo *Piriformospora indica* (Basidiomycota, Sebaciales, Sebacinaceae) promove o crescimento de plantas (Verma *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2015) e contribui para maior resistência ao ataque de patógenos (Moreira *et al.*, 2016). Este fungo se assemelha aos FMA, em termos de funções simbióticas, uma vez que coloniza as raízes e promove o crescimento de uma ampla gama de plantas, (Kumar & Rao, 2012), aumenta a tolerância ao estresse abiótico (Waller *et al.*, 2005; Varma *et al.*, 2012; Gill *et al.*, 2016) e absorção de fosfato (Yadav *et al.*, 2010). Além disso, é cultivável em culturas axênicas (Sahay & Varma, 1999; Oelmüller, 2009; Kumar *et al.*, 2011), facilitando a utilização na propagação vegetativa de plantas.

Salienta-se que algumas espécies de plantas, incluindo Fabaceae, dependem de microrganismo para a sobrevivência e crescimento satisfatório (Smith & Read, 2008; Jesus *et al.*, 2005; Martos *et al.*, 2009; Strullu-Derrien *et al.*, 2016). Entretanto, a maioria dos substratos de cultivo utilizados na produção de mudas são inertes e livres de microrganismo promotores do crescimento de plantas (Goetten *et al.*, 2016), comprometendo a produção de mudas de espécies vegetais. A principal estratégia para disponibilizar ou aumentar os benefícios de microrganismo simbiotes é a inoculação ou co-inoculação de cepas ou mix de culturas, tais como endofíticos, rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) e FMA (Aamir *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2015).

O uso do solo de um indivíduo adulto da mesma espécie é uma estratégia importante, quando existe *plant-soil feedback* positivo entre plantas e microrganismo do solo localmente adaptados (van der Putten *et al.*, 2013; Revillini *et al.*, 2016). O modelo *plant-soil feedback* tem demonstrado a importância de microrganismo localmente adaptados para otimizar a alocação de recursos e favorecer o *fitness* das plantas (Revillini *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016), conduzindo a possibilidade de uso desse solo associado a indivíduos adultos da mesma espécie para favorecer a sobrevivência e crescimento de plantas juvenis.

A resposta da planta aos microrganismos do solo pode ser testada por meio da esterilização dos substratos de cultivo (Cortois *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2017), comparando o efeito da presença ou ausência dos mesmos sobre a sobrevivência e crescimento das plantas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a presença de microrganismos simbiotes provenientes do solo de plantas adultas de vinhático e/ou a inoculação com fungos micorrízicos favorece a sobrevivência e crescimento de plantas de vinhático em condições de viveiro.

## **Material e métodos**

### **Obtenção de sementes e substratos**

As sementes de vinhático foram obtidas com a SIF (Sociedade de Investigações Florestais – Minas Gerais, Brasil) e desinfestadas superficialmente com etanol a 70 % por 30 s e hipoclorito de sódio (2,5 %, v:v) por 10 min., com lavagens sucessivas em água esterilizada, em condições assépticas. As sementes foram transferidas para placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada e esterilizada, posteriormente incubadas por sete dias à temperatura ambiente e quando pré-geminadas foram selecionadas e dispostas diretamente nos vasos de cultivo.

O solo proveniente de uma planta adulta de vinhático foi obtido no município de Viçosa-MG, na localidade de Duas Barras (S 20° 39' 925", W 42° 59' 549", 563 m de altitude, fragmento de mata), nas proximidades de uma planta adulta (raio de 2 m), na camada de 0-20 cm, em pontos distribuídos aleatoriamente para obtenção de uma amostra composta. As amostras de solos foram peneiradas em campo, homogeneizadas e armazenadas. A esterilização foi realizada em autoclave por uma hora a 121 °C por duas vezes em intervalo de dois dias e mantidos em repouso por 15 dias. O substrato comercial (Tropstrato Florestal, Vidaverde<sup>®</sup>) utilizado foi à base de casca de pinus e vermiculita expandida, acrescida de macro e micronutrientes. As características químicas e granulométricas dos substratos de cultivo são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Características químicas e granulométricas dos substratos de cultivo de vinhático: **Sub** corresponde ao substrato comercial, **Ste** ao solo de uma planta adulta da mesma espécie esterilizado e **Nat** ao solo natural de uma planta adulta da mesma espécie.

Amostra	pH	P	K	SB	CTC (T)	CTC (t)	m	P-rem	Classe textural
	H <sub>2</sub> O	mg dm <sup>-3</sup>			cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>		%	mg L <sup>-1</sup>	
<b>Sub</b>	5,81*	nd	nd	nd	58,6*	S/I	S/I	S/I	S/I
<b>Nat</b>	4,25	3,9	53	0,73	12,93	2,31	68,4	22,3	Argilo-arenosa

Extratores utilizados: P, K = Extrator Mehlich 1; pH em água, relação 1:2,5; SB= soma de bases trocáveis; CTC (T) = Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0; m = índice de saturação de alumínio. nd = não determinado. \*O pH e a CTC do substrato comercial foram determinados na relação 1:5 (v:v) em água a pH 7.

### Obtenção de inoculantes de FMA, *Piriformospora indica* e rizóbio

Os isolados de fungos micorrízicos arbusculares, *Claroideoglossum etunicatum* RJN101A (= *Glomus etunicatum*), *Rhizophagus clarus* RJN102A (= *Glomus clarum*) e *Gigaspora albida* PRN201A foram obtidos da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG, [www.furb.br/cicg](http://www.furb.br/cicg)) da Universidade Regional de Blumenau (FURB), Santa Catarina, Brasil. Os isolados foram multiplicados em solo: areia em solo:areia (1:1, v:v) cultivados com braquiária (*Urochloa brizantha* Hochst Stapf). O isolado de *Piriformospora indica* foi proveniente da cultura *in vitro* da coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas da Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais, mantido e multiplicado periodicamente em meio KM e armazenado no escuro a 30 °C (Kumar *et al.*, 2011).

O isolamento de *Bradyrhizobium* sp. foi realizado a partir de nódulos de plantas de vinhático, crescendo em viveiro do IEF (Instituto Estadual de Florestas, Minas Gerais, Brasil). Os nódulos foram desinfestados superficialmente em etanol a 70 % por 30 s, seguido por imersão em hipoclorito de sódio a 2 % por 10 minutos e lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada. Os nódulos foram pressionados com uma pinça sobre a placa de Petri com meio de cultura YMA com vermelho Congo (Vincent, 1970), pH 6.9, incubadas a 25 °C, seguido por transferências para novos meios de culturas para obtenção de colônias isoladas. As colônias foram multiplicadas após a confirmação da pureza e preservadas a -80 °C em meio NBY (Schaad, 1998). O isolado teve o DNA extraído com o kit Nucleo Spin® Soil (Macherey-Nagel), a partir de células cultivadas por três dias em meio de cultivo YMA. Para a amplificação parcial do gene 16S rRNA, foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991). A sequência foi comparada com outras depositadas no GenBank (NCBI), por meio da ferramenta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## **Desenho experimental e inoculação**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições e arranjo fatorial (3x2), sendo três tipos de substrato de cultivo: 1) substrato comercial = Sub; 2) solo da área de influência de uma planta adulta esterilizado = Ste; 3) solo da área de influência de uma planta adulta natural = Nat, inoculadas ou não com uma mistura de FMA (*C. etunicatum*, *R. claru* e *G. albida*) e o fungo *P. indica*. A esterilização do solo foi realizada em autoclave por uma hora a 121 °C, por duas vezes, em intervalo de dois dias e, mantidos em repouso por 15 dias.

As sementes previamente germinadas foram embebidas em meio YM com rizóbio por 10 min, em seguida foram transferidas para o substrato de cultivo, com capacidade de um litro, juntamente com os inóculos de fungos micorrízicos, solo contendo cerca de 200 esporos, e quatro discos de meio KM, de 100 mm de diâmetro, contendo micélio e clamidósporos de *P. indica*.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 180 dias, com a umidade do solo mantida próxima à capacidade de campo, sem adubação e aleatorizadas semanalmente.

## **Medida de crescimento, dependência micorrízica e nodulação**

Uma vez finalizado o cultivo foram avaliadas a sobrevivência, número de folhas (NF), diâmetro do caule (D) a 1,5 cm do solo, matéria fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea e matéria fresca (MFRA) e seca (MSRA) da raiz. A MSPA e MSRA foram determinadas após secagem até massa constante a 70 °C em estufa com ventilação forçada. Também foram coletadas raízes finas aleatoriamente para avaliação da colonização micorrízica.

A dependência micorrízica (DM) foi determinada utilizando a equação:  $(DM) = \frac{\{(massa\ seca\ total\ de\ plantas\ inoculadas - massa\ seca\ total\ de\ plantas\ não\ inoculadas)\}}{massa\ seca\ total\ de\ plantas\ inoculadas} \times 100$  (Plenchette *et al.*, 1983). Os dados referentes à dependência micorrízica foram considerados: > 75 % = dependência excessiva, 50-75 % = dependência alta, 25-50 % = dependência moderada, < 25 % dependência baixa.

## **Colonização micorrízica**

As amostras de raízes, após lavagem em água corrente, foram armazenadas e conservadas em solução de álcool, formol e ácido acético (90:5:5, v:v:v) foram lavadas, diafanizadas com KOH 10 % (p:v) por aquecimento em banho-maria a 90 °C por 1,5 h e tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (10 min.). Logo após foram imersas em KOH 10 % (p:v) por 12 h, com sucessivas lavagens em água e acidificação com HCl 1 % (v:v) por 5 min., coradas com azul de tripano 0,05 % em lactoglicerol (v:v) por 12h a temperatura ambiente (adaptado de

Phillips & Hayman, 1970). Realizada a coloração, as raízes foram armazenadas em lactoglicerol (p:v) (Brundrett *et al.*, 1996). A percentagem de colonização micorrízica foi estimada pelo método de contagem em placa quadriculada, conforme a presença de estruturas fúngicas (arbúsculos, hifas, vesículas e esporos) observada sob microscópio estereoscópio (Giovannetti & Mosse, 1980).

### **Avaliação do perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de vinhático**

O perfil da comunidade microbiana dos três substratos de cultivo inoculados ou não com fungos micorrízicos foi avaliado pela técnica de sequenciamento de *amplicon*. Uma amostra composta dos substratos foi obtida da camada de 0-5 cm dos vasos, após 90 dias de cultivo, utilizando-se seis repetições para cada um dos seis tratamentos, totalizando 36 unidades amostrais. O DNA total das amostras foi extraído com o kit Nucleo Spin<sup>®</sup> Soil (Macherey-Nagel) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram encaminhadas para o sequenciamento de amplicon das regiões 16S e ITS1 do rDNA de Bactérias/Archaeas e Fungos, respectivamente, por meio da plataforma Illumina<sup>®</sup> MiSeq (Illumina Inc.) (Bactéria e Archaea = MiSeq 151X151 Cycle Run e Fungos = MiSeq 250X250 Cycle Run). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology Software (QIIME v.1.8.0), utilizando os parâmetros do protocolo desenvolvido pelo Brazilian Microbiome Project (BMP) para as regiões 16S e ITS1. As sequências com similaridade maior que 97 % foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e a taxonomia foi atribuída às OTU utilizando o UNITE (ITS) e o Silva (16S), como bancos de dados de referência.

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi baseada nas matrizes de dissimilaridade entre os tratamentos (Matriz de Bray-Curtis) para avaliar diferenças na composição entre os seis tratamentos (fatorial 3x2). Para avaliar a abundância relativa de gêneros foi realizado o *Heatmap* para cada um dos seis tratamentos.

### **Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) com significância de 5 % de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ) utilizando o software R. Os dados relacionados à colonização micorrízica foram previamente normalizados via  $\arcsen\sqrt{(x/100)}$ , antes da realização da ANOVA. Para descrever os índices de diversidade (Riqueza, Chao1, Shannon e Equitabilidade) foi utilizado o pacote Biodiversity do R e a PCoA e *Heatmap* foram realizadas com o pacote Vegan (Oksanen *et al.*, 2015).

## Resultados

### Sobrevivência das plantas

As plantas cultivadas em substrato comercial (Sub), inoculadas ou não com fungos micorrízicos (FM), não apresentaram sobrevivência e o tratamento solo esterilizado (Ste) sem FM (26,7 %) teve menor sobrevivência que os tratamentos solo esterilizado com FM (80 %) e foi similar ao solo natural (Nat) com FM (73,3 %) e ao natural sem FM (80 %).

### Medida de crescimento

As plantas cultivadas em Nat apresentaram maior NF (57,7 %), D (65 %), MFPA (134 %), MSPA (121 %), MSRA (95 %) que aquelas cultivadas em Ste (Tabela 1). As mudas de vinhático inoculadas com FM apresentaram maior crescimento quando avaliadas NF (46 %), D (39 %), MFPA (86 %) MFRA (150 %), MSPA (90 %) e MSRA (120 %). Houve interação apenas para a altura das plantas, as quais apresentaram menor crescimento em solo esterilizado sem FM (Tabela 2).

**Tabela 2:** Medida de crescimento vegetativo de vinhático entre os dois tipos de substrato, sendo solo da área de influência de uma planta adulta esterilizado = **Ste** e solo da área de influência de uma planta adulta = **Nat**, inoculados ou não com fungos micorrízicos (FM) após 180 dias de cultivo em casa de vegetação.

Medida de crescimento*	Substrato		Inoculação	
	Ste	Nat	Com FM	Sem FM
NF	8,50 b	13,41 a	12,99 A	8,91 B
D (mm)	2,30 b	3,78 a	3,53 A	2,55 B
MFPA (g)	2,03 b	4,74 a	4,40 A	2,37 B
MFRA (g)	1,26 a	1,90 a	2,26 A	0,90 B
MSPA (g)	0,89 b	1,96 a	1,86 A	0,98 B
MSRA (g)	0,51 b	0,99 a	1,03 A	0,47B

\*NF= número de folhas; D = diâmetro do caule; H = altura da planta; MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; MFRA =matéria fresca da raiz; MSRA = matéria seca da raiz. Médias seguidas pela mesma letra minúscula ou maiúscula nas linhas, dentro de cada fator (substrato e inoculação), separadamente, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

### Dependência micorrízica, nodulação e colonização micorrízica

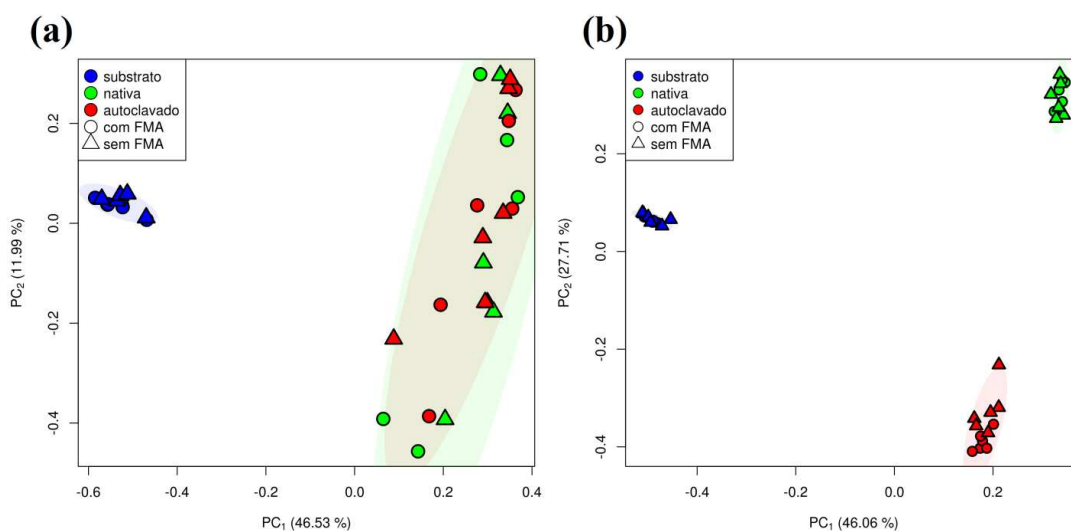
A dependência micorrízica em Ste foi alta (76 %) enquanto em Nat foi moderada (28,5 %). A nodulação foi baixa em todos os tratamentos e, apenas o tratamento Nat sem FM apresentou quatro repetições com pequenos nódulos, indicando que as condições de cultivo não favoreceram a nodulação. A colonização micorrízica foi obtida satisfatoriamente tanto em Ste com FM quanto em Nat com e sem FM. Não foram encontradas evidências de

colonização em Ste não inoculado. A porcentagem de colonização foi maior em Nat sem FM (44,7 % a) quando comparado ao Ste com FM (19,18 % b) que foi similar a Nat com FM (24,1 % ab).

### Perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de vinhático

As *reads* distribuídas entre os seis tratamentos (3x2) foram classificadas em Unidade Taxonômica Operacional (OTU), com base em similaridade às sequências do banco de dados UNITE para fungos (ITS) e Silva para bactérias e archaea (16S), as quais foram utilizadas na construção da PCoA (Figura 1).

Os resultados da PCoA indicam que houve diferença na composição de OTU entre os tratamentos, principalmente em nível de substratos de cultivo. O substrato comercial formou um grupo distinto independente da inoculação com FM, enquanto o solo esterilizado teve maior similaridade ao solo natural para a comunidade fúngica e menor similaridade para a comunidade bacteriana e de archaeae (Figura 1). Não houve agrupamento em função do fator inoculação nem para fungos nem para bactérias e archaeae.



**Figura 1:** Diagrama de ordenação das OTU de vinhático produzido pela análise de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), representando a distribuição de cada amostra, baseada na matriz de dissimilaridade Bray-Curtis. Os pontos mais próximos entre si apresentam maior similaridade, sendo (a) região ITS para fungos e (b) gene 16S rRNA para bactérias e archaeae e archaeas. As amostras em azul correspondem ao substrato comercial (**Sub**), vermelho ao solo da área de influência de uma planta adulta esterilizado (**Ste**) e em verde solo da área de influência de uma planta adulta natural (**Nat**), sendo os círculos as amostras inoculadas com FM e triângulos as amostras não inoculadas.

Os índices de diversidade demonstraram que a comunidade fúngica (ITS) é mais rica e diversa em Nat > Ste > Sub, não havendo diferença para o fator inoculação (Tabela 2). Para

bactéria e archaea (16S) a riqueza e a diversidade foram maiores em Sub > Nat > Ste, não havendo diferença para o fator inoculação (Tabela 2).

**Tabela 2:** Índices de diversidade para os três tipos de substratos de cultivo de vinhático, inoculados ou não com FM, sendo o substrato comercial = **Sub**, o solo da área de influência de uma planta adulta esterilizado = **Ste** e solo da área de influência de uma planta adulta = **Nat**, com ou sem a inoculação de fungos micorrízicos (FM). A região ITS corresponde ao sequenciamento para fungos e região 16S para bactérias e archaeas.

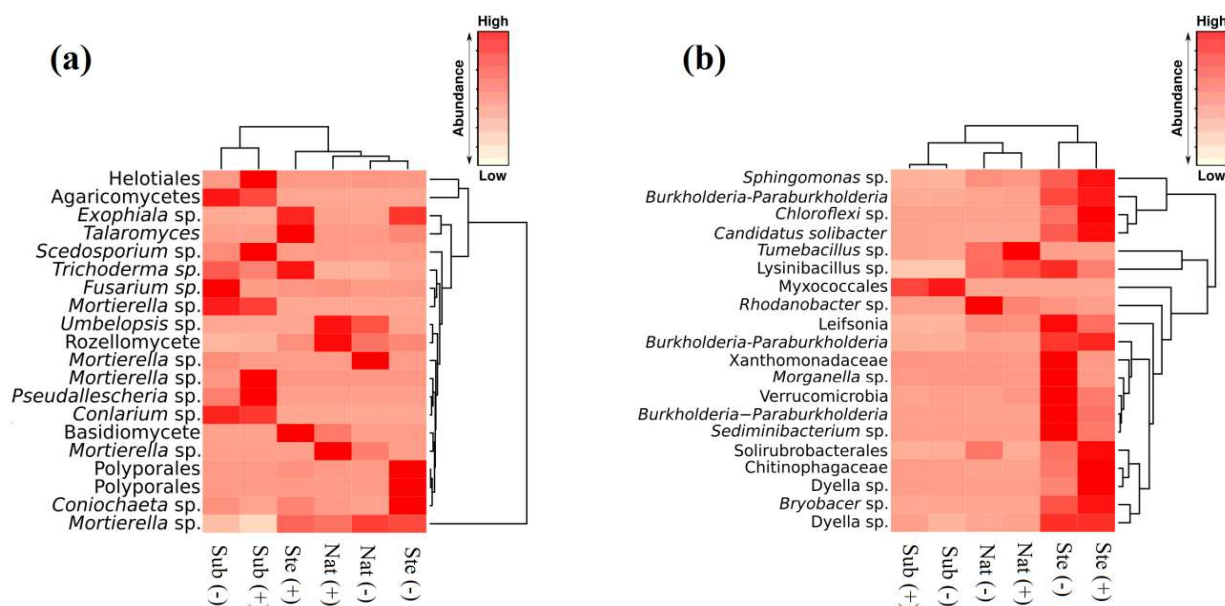
ITS					
Substrato	Cobertura	Riqueza	Chao1	Shannon	Equitabilidade
Sub	0,99	49,75 C	4,33 C	2,84 A	0,50 A
Ste	0,98	82,75 B	5,01 B	2,97 A	0,47 A
Nat	0,96	163,81 A	5,53 A	3,70 A	0,50 A
Inoculação					
Com FM	0,98	101,71 A	4,92 A	3,23 A	0,50 A
Sem FM	0,98	92,39 A	4,96 A	2,08 A	0,48 A
16S					
Substrato	Cobertura	Riqueza	Chao1	Shannon	Equitabilidade
Sub	0,98	2844 A	8,18 A	9,53 A	0,83 A
Ste	0,99	1214 C	7,34 C	7,54 C	0,73 C
Nat	0,99	1847 B	7,78 B	8,18 B	0,75 B
Inoculação					
Com FM	0,99	1934 A	7,75 A	8,41 A	0,79 A
Sem FM	0,99	2008 A	7,78 A	8,42 A	0,79 A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A construção do *Heatmap* permitiu avaliar a distribuição dos grupos mais abundantes correspondentes a fungos (Figura 2 a) e bactéria e archaea (Figura 2 b). É possível observar que existem diferenças quanto à abundância desses microrganismo nos três tipos de substrato de cultivo e que a inoculação com FM gerou algumas alterações na distribuição dos táxons mais abundantes. O substrato comercial (Sub) apresentou abundância de grupos potencialmente fitopatogênicos a exemplo de *Fusarium*, grupos que ocorrem em solos enriquecidos com resíduos orgânicos, como *Mortierella*. O solo esterilizado (Ste) inoculado com FM apresentou a ocorrência de *Thichoderma* e *Exophiala* que são endofítico de plantas; *Coniochaeta* que apresenta esporos que sobrevivem a incêndios florestais. O solo natural

(Nat) apresentou abundância de *Umbelopsis* que ocorre como endofítico ou micorrízico de orquídeas.

O grupo mais abundante de bactéria (16S) para Sub foi Myxococcales que é comumente encontrado em solo rico em matéria orgânica. O solo esterilizado (Ste) apresentou dominância de grupos fitopatogênicos, principalmente quando não inoculado com FM, a exemplo de Xanthomonadaceae (p.ex. *Xanthomonas*). O solo natural (Nat) apresentou abundância de grupos comuns na rizosfera de plantas, *Rhodanobacter* e *Tumebacillus*.



**Figura 2:** Heatmap e agrupamento (Matriz de Bray-Curtis), representando os táxons mais abundantes nos substratos de cultivo de vinhático, sendo (a) região ITS para fungos e (b) região 16S para bactérias e archaeas. O substrato comercial = **Sub**, o solo da área de influência de uma planta adulta esterilizado = **Ste** e solo da área de influência de uma planta adulta = **Nat**. O sinal de (+) são as amostras inoculadas com fungos micorrízicos (FM) e o (-) as amostras não inoculadas.

## Discussão

Este é o primeiro trabalho comparando o efeito do solo proveniente de uma planta adulta de vinhático no crescimento de mudas da espécie, indicando plant-soil-feedback positivo. A inoculação com FM, por sua vez, aumenta a taxa de sobrevivência o crescimento das mudas, bem como altera a composição da comunidade nos substratos de cultivo.

A mortalidade de 100 % das mudas cultivadas em substrato comercial (Sub) evidencia a importância de simbiontes nativos e a necessidade de substratos de cultivo com características físico-químicas, a exemplo de pH, porosidade e aeração, adequadas à permanência de microrganismo benéficos. Embora o uso de substratos comerciais apresente diversas vantagens devido suas características físico-químicas desejáveis (Cunha *et al.*, 2006, Caldeira *et al.*, 2008), e se proponha a ser livre de patógenos (Fernandes *et al.*, 2006; Xavier *et al.*, 2009), a falta de conhecimento das exigências simbióticas da maioria das espécies de

plantas nativas pode comprometer a produção de algumas plantas cultivadas nesse tipo de substrato, assim como foi para vinhático.

O maior crescimento vegetativo ocorreu em solo natural (Nat), possivelmente pela existência de microrganismo benéficos que atuam como promotores de crescimento de plantas (Cortois *et al.*, 2016; Revillini *et al.*, 2016). A planta hospedeira e microrganismo associados podem, em muitos casos, ser considerados um metaorganismo (Vandenkoorhuysen *et al.*, 2015), com alta dependência simbiótica, resultando em maior ou menor sobrevivência e crescimento de plantas (Lakshmanan *et al.*, 2014, Haney *et al.*, 2015, Quiza *et al.* 2015). Reconhecer microrganismo associados a vinhático é importante para favorecer a produção de mudas em condições de viveiro.

Para maior sobrevivência e crescimento de vinhático, na ausência do solo de uma planta adulta da mesma espécie, o qual normalmente contém microrganismo associativos benéficos (Revillini *et al.*, 2016; Cortois *et al.*, 2016), torna-se importante a inoculação de simbiontes, como espécies de FMA, *P. indica* e/ou rizóbio. O argumento da inoculação é reforçado pela alta dependência micorrízica no solo esterilizado (76 %), o qual apresentou maior sobrevivência de plantas quando inoculado com FM. Entretanto, a resposta à inoculação com FMA é mais positiva, em termos de crescimento, em uma comunidade microbiana mais diversa (Hoeksema *et al.*, 2010), como encontrada em Nat comparado ao Ste, possivelmente por realização de funções sinérgicas e/ou complementares entre simbiontes, a exemplo da solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio.

Os FMA são capazes de recrutar microrganismo na micorrizosfera (Azcón-Aguilar & Barea, 2015), os quais auxiliam na promoção do crescimento de plantas. Os FMA (Glomeromycota) são reconhecidos por serem especializados na simbiose mutualista com plantas (Parniske, 2008, Cortois *et al.*, 2016) e podem beneficiá-las por meio da maior absorção de água e nutrientes, visto que podem explorar maior volume de solo, em mais de cem vezes à área de abrangência de uma planta não micorrizada (Smith & Read, 2008) e acessar microporos inacessíveis as raízes. Existem outros benefícios além da aquisição e transferência de nutrientes, como redução do estresse abiótico (Millar & Bennet, 2016) e supressão de doenças (Krishna *et al.*, 2010). Por exemplo, foi observado que a inoculação em Sub diminuiu a abundância de *Fusarium*, existindo indicações que a inoculação com FMA e/ou *P. indica* contribui para mecanismos de resistência ao referido patógeno (Kumar *et al.*, 2009, Moreira *et al.*, 2016). O fungo micorrízico *P. indica* (Basidiomycota, Sebaciales, Sebacinaceae) também confere maior absorção de nutrientes, aumenta a tolerância a estresse hídrico, salino e por metais pesados (Varma *et al.*, 2012), atuam como promotores de crescimento (Kumar *et al.*, 2011, Moreira *et al.*, 2015). Portanto, é preciso reconhecer a

importância de simbiontes nos substratos de cultivos, uma vez que muitos fitopatógenos são facilmente disseminados e apresentam estruturas de resistência como clamidósporos.

Embora a simbiose tripartite envolvendo rizóbios e FMA seja desejável para maior estímulo nutricional (Jesus *et al.*, 2005; Mortimer *et al.*, 2013) devido à alta demanda de P no processo de fixação de N, a nodulação foi escassa em todos os tratamentos. É preciso reconhecer que as fronteiras da relação rizóbio-FMA não são claramente definidas (Bonfante & Anca, 2009), necessitando de mais estudos sobre a simbiose tripartite com vinhático. As condições físico-químicas dos substratos de cultivo podem ter efeitos diversos sobre a microbiota e implicar em maior ou menor nodulação. O uso de biochar no solo, por exemplo, pode aumentar o número de nódulos em leguminosas (Yusif *et al.*, 2016), talvez por alterar as propriedades físico-químicas do solo e favorecer a nodulação. Entretanto, um aspecto importante da inoculação com rizóbios é a eficiência na fixação de nitrogênio (Araújo *et al.*, 2017), pois nem sempre a nodulação indica eficiência simbiótica. Além disso, existem bactérias endofíticas e rizosféricas que fixam nitrogênio e disponibilizam para as plantas, mas que não formam nódulos (Mus *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2017).

O solo natural (Nat) não inoculado com FM apresentou inóculo inicial de FMA estimado em 258 esporos por 100 mL de solo, possivelmente com espécies bem adaptadas à simbiose com vinhático, o que refletiu em maior colonização, porém isto não necessariamente implica em maior crescimento de plantas. A maior percentagem de colonização pode reduzir o crescimento da planta devido a maior demanda por fotoassimilados (Kahiluoto *et al.*, 2000). Além disso, existem diferenças quanto ao hábito simbiótico destes fungos, por exemplo, enquanto Glomeraceae é reconhecida pela grande percentagem de colonização de raízes o que favorece a proteção contra patógenos, Gigasporaceae apresenta grande quantidade de hifas extrarradiculares que favorece a absorção de nutrientes (Maherali & Klironomos, 2007). Assim, trabalhos adicionais deveriam identificar espécies de FMA associados às raízes (Hart *et al.*, 2015) e correlacionar com a sobrevivência e crescimento das plantas.

As diferenças na composição de OTU mais abundantes entre os tratamentos pode auxiliar a explicar a sobrevivência e crescimento de vinhático. O substrato comercial (Sub), conforme indicado pelo *Heatmap* teve maior abundância de grupos de fungos com potencial fitopatogênico (*Fusarium* e Helotiales: *Scleroctinia*) os quais podem acometer leguminosas (Otto-Hanson *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2016). A esterilização do solo (Ste) alterou a composição da microbiota, que deve ter sido recolonizada por eventos aleatórios, pois os microrganismo são ubíquos, de fácil disseminação por vento e animais. O solo esterilizado (Ste) inoculado com FM apresentou abundância de *Thichoderma* que é endofítico de plantas e

reconhecido como biocontrolador de fungos fitopatogênicos (de Souza *et al.*, 2016) e de *Exophiala* que atua como dark septate (Zhang *et al.*, 2008). Entretanto, o solo esterilizado (Ste) também apresentou dominância de alguns grupos de bactérias com potencial fitopatogênico, principalmente quando não inoculado com FM, a exemplo de Xantomonodaceae (p.ex. *Xanthomonas*; Mingma *et al.*, 2014). O solo natural (Nat) apresentou abundância de grupos que comumente não são fitopatogênicos e que podem atuar como endofítico/micorrízico (*Umbelopsis*, Fungi; Gang *et al.*, 2017) ou como antagonistas (*Tumebacillus*, Bacteria; Shen *et al.*, 2015), e assim, contribuir para a supressividade de fitopatógenos e promoção do crescimento vegetal.

Não houve diferença nos índices de diversidade para o fator inoculação. Entretanto, a inoculação pode afetar a composição e estrutura da comunidade, possibilitando a competição de FM e fitopatógenos (Krishna *et al.*, 2010) ou o recrutamento de bactérias benéficas na micorrizosfera dos fungos simbiotes (Revillini *et al.*, 2016). O solo natural (Nat) apresentou maiores índices de diversidade para fungos (Nat > Ste > Sub) e menores índices de diversidade para bactéria e archaea (Ste > Nat > Sub), talvez porque estes respondem menos as características físico-químicas do solo, a exemplo do pH (Rousk *et al.*, 2010) que foi mais alcalino no substrato comercial (Sub), e sejam mais dependentes do crescimento de plantas do que muitas bactérias.

O conjunto de resultados do presente trabalho enfatizam o potencial, importância e necessidade de conhecer interações entre plantas e microrganismo em uma abordagem mais holística, no contexto do *plant-soil feedback*, uma vez que estes são elementos chave para a sobrevivência, proteção e crescimento de plantas.

## **Conclusões**

O solo proveniente de plantas adultas de vinhático ou a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, *P. indica* e rizóbio favorecem a sobrevivência e crescimento de plantas em condições de viveiro, indicando que vinhático apresenta *plant-soil feedback* positivo.

## **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária (Bioagro).

## Referências

- Aamir M, Aslam A, Khan MY, Jamshaid MU, Ahmad M, Asghar HN, Zahir ZA. 2013. Co-inoculation with Rhizobium and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for inducing salinity tolerance in mung bean under Field condition of semi-arid climate. *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 1:17-22.
- Agler MT, Ruhe J, Kroll S, Morhenn C, Kim S, Weigel D, Kemen EM. 2016. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS ONE*, 14.
- Angus A, Lee A, Lum M, Shehayeb M, Hessabi R, Fujishine N, Yerrapragada S, Kano S, Song N, Yang P, Estrada de los Santos P, Faria S, Dakora F, Weinstock G, Hirsch A. 2013. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. *Plant and Soil*, 369(1): 543-562.
- Araújo KS, de Carvalho F, Moreira FMS. 2017. *Burkholderia* strains promote *Mimosa* spp. growth but not *Macroptilium atropurpureum*. *Revista Ciência Agronômica*, 48(1): 41-48.
- Azcón-Aguilar C, BAREA JM. 2015. Nutrient cycling in the mycorrhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 25: 372-396.
- Berendsen R, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8):478-86.
- Bonfante P, Anca IA. 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology*, 63: 363-383.
- Brandon K, Fonseca GAB, Rylands AB, Silva JMC. 2005. Brazilian Conservation: challenges and opportunities. *Biology*, 19: 595-200.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. Working with Mycorrhizas in Floresty and Agriculture. Monograph, 374p.
- Caldeira MVW, Rosa GN, Fenilli TAB, Harbs RMP. 2008. Composto orgânico na produção de mudas de aroeira-vermelha. *Scientia Agraria*, 9:27-33.
- Carvalho PER. 2009. Vinhático *Plathymenia reticulata*. Comunicado Técnico.
- Cortois R, Schröder-Georgi T, Weigelt A, van de Putten WH, de Deyn GB. 2016. Plant-soil feedbacks: role of plant functional group and plant traits. *Journal of Ecology*, 104, 1608-1617.
- Coutinho LM. 2006. O conceito de bioma. *Acta Botanica Brasiliense* 20: 13-23.
- Cunha AM, Cunha GM, Sarmiento RA, Cunha GM, Amaral JFT. 2006. Efeito de diferentes substratos sobre o desenvolvimento de mudas de Acacia sp. *Árvore*, 30: 207-214.

de Souza JT, Trocoli RO, Monteiro FP. 2016. Plants from the Caatinga biome harbor endophytic *Trichoderma* species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. *Biological Control*, 94:25-32.

Denison RF, Kiers ET. 2011. Life histories of symbiotic rhizobia and Mycorrhizal fungi. *Current Biology* 21: 18.

Dias PC, Pereira MSF, Kasuya MCM, de Paiva HN, de Oliveira LS, Xavier A. 2012. Micorriza arbuscular e rizóbios no enraizamento e nutrição de mudas de angico-vermelho. *Revista Árvore*, 36(6): 1027-1037.

Duarte ML, Paiva HN, Alves MO, Freitas AF, Maia FF, Goulart LML. 2015. Crescimento e qualidade de mudas de vinhático (*Platymenia reticulata* Benth.) em resposta à adubação com potássio e enxofre. *Ciência Florestal*, 25: 221-229.

EMBRAPA. 1994. Atlas do meio ambiente do Brasil. Brasília. Ed. Terra Viva.

Fernandes C, Corá JE, Braz LT. 2006. Desempenho de substratos no cultivo do tomateiro do grupo cereja. *Horticultura Brasileira*, 24: 42-46.

Ferreira PA, Boscolo D, Carvalheiro LG, Biesmeijer JC, Rocha PLB, Viana BF. 2015. Responses of bees to habitat loss in fragmented landscapes of Brazilian Atlantic Rainforest. *Landscape Ecology* 30: 2067-2078.

Fonseca MB, França MGC, Zonta EGV. 2010. Crescimento inicial de *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae – Caesalpinioideae) em diferentes condições de fertilidade em solo de cerrado. *Acta Botanica Brasilica* 24: 322-327.

Gang G-H, Cho G, Kwak, Y-S, Park E-H. 2017. Distribution of Rhizosphere and Endosphere Fungi on the First-Class Endangered Plant *Cypripedium japonicum*. *Mycobiology*, 45(2): 97-100.

Gill SS, Gill R, Trivedi DK, Anjum NA, Sharma KK, Ansari MW, Ansari AA, Johri AK, Prasad R, Pererira E, Varma A, Tuteja N. 2016. *Piriformospora indica*: potential and significance in plant stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 7:332.

Giovannetti M, Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.

Glick BR. 2014. Bacterial with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169:30–39.

Goetten LC, Moretto G, Stürmer SL. 2016. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum produced on-farm and phosphorus on growth and nutrition of native woody plant species from Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 30 (1): 9-16.

Haney CH, Samuel BS, Bush J, Ausubel FM. 2015. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptative advantage to plants. *Nature* 1:1-9.

Hart MM, Aleklett K, Chagnon PL, Egan C, Ghignone S, Helgason T, Lekberg Y, Öpik M, Pickles BJ, Waller L. 2015. Navigating the labyrinth: a guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 207: 235–247

Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, Johnson NC, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC et al. 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* 13: 394-407.

Jesus EC, Schiavo JA, Faria SM. 2005. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. *Árvore* 29: 545-552.

Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Pozo MJ. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology* 38: 651-664.

Kahiluoto H, Ketoja E, Vestberg M. 2000. Promotion of utilization of arbuscular mycorrhiza through reduced P fertilization 1. Bioassays in a growth chamber. *Plant and Soil* 227: 191-206.

Krishna H, Das B, Attri BL, Grover M, Ahmed N. 2010. Suppression of *Botryosphaeria* canker of apple by arbuscular mycorrhizal fungi. *Crop protection* 29: 1049-1054.

Kumar K, Rao IU. 2012. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in - Ex Vitro Conditions- A Review. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*. 2(4): 271-283.

Kumar M, Yadav V, Tuteja N, Johri AK. 2009. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology*, 155: 780-790.

Kumar V, Sahai V, Bisaria VS. 2011. High-density spore production of *Piriformospora indica*, a plant growth-promoting endophyte, by optimization of nutritional and cultural parameters. *Bioresource Technology* 102: 3169-3175.

Lacerda DR, Lemos Filho JP, Macedo MDP, Lovato MB. 2002. Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathyenia foliolosa* and *P. reticulata* (Mimosoideae), inferred using RAPD markers. *Plant Systematics Evolution*, 235: 67-77.

Lakshmanan V, Selvaraj G, Bais HP. 2014. Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. *Plant Physiol* 166: 689-700.

Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, First Edition, John Wiley & Sons Inc, New York, pp. 115-175.

Lorenzi H. 1992. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa-SP, Editora Plantarum. 352p.

Lu J, Yang F, Wang S, Ma H, Liang J, Chen Y. 2017. Co-existence of rhizobia and diverse non-rhizobial bacteria in the rhizosphere and nodules of *Dalbergia odorifera* seedlings

inoculated with *Bradyrhizobium elkani*, *Rhizobium multihospitium* – like and *Burkholderia pyrrocinia* – like strains. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2255.

Ma H-K, Pineda A, van der Wurff AWG, Raaijmakers C, Bezemer TM. 2017. Plant–Soil Feedback Effects on Growth, Defense and Susceptibility to a Soil-Borne Disease in a Cut Flower Crop: Species and Functional Group Effects. *Frontiers in Plant Science*, dez 19.

Machado RB, Ramos Neto PE, Caldas DE, Gonçalves D. Santos N, Tabor K, Steininger M. 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. *Conservation International do Brasil*. Brasília, 22p.

Machineski O, Balotal EL, Colozzi Filho A, Andrade DS, de Souza JRP. 2009. Growth responses of peroba rosa seedlings due to arbuscular mycorrhizal fungi inoculation. *Ciência Rural*, 39(2):567-570.

Maherali H, Klironomos JN. 2007. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*, 316 (5832): 1746-1748.

Marques MS, Pagano M, Scotti MRMM. 2001. Dual inoculation of a woody legume (*Centrolobium tomentosum*) with rhizobia and mycorrhizal fungi in south-eastern Brazil. *Agroforestry System* 52: 107-117.

Martos F, Dulormne M, Pailler T, Bonfante P, Faccio A, Fournel J, Dubois M-P, Selosse M-A. 2009. Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist* 184 : 668-681.

Millar NS, Bennett AE. 2016. Stressed out symbiotes: hypotheses for the influence of abiotic stress on arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 182: 625-642.

Mingma R, Pathom-aree W, Trakulnaleamsai S, Thamchaipenet A, Duangmal K. 2014. Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from Leguminosae plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. glycine. *World Journal Microbiol Biotechnol*, 30(1):271-80.

Moreira BC, Mendes FC, Mendes IR, Paula TA, Prates Junior P, Salomão LCC, Stürmer SL, Otoni WC, Guarçoni M A, Kasuya MCM. 2015. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* improves the growth and nutrient uptake in micropropagation-derived pineapple plantlets. *Scientia Horticulturae*, 197: 183-192.

Moreira BC, Prates Júnior P, Jordão TC, da Silva MCS, Stürmer SL, Salomão L C C, Otoni W C, Kasuya MCM. 2016. Effect of inoculation of symbiotic fungi on the growth and antioxidant enzymes' activities in the presence of *Fusarium subglutinans* f. sp. ananas in pineapple plantlets. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38:235.

Mortimer PE, Le Roux MR, Pérez-Fernández MA, Benedito VA, Kleinert A, Xu J, Valentine AJ. 2013. The dual symbiosis between arbuscular mycorrhizal and nitrogen fixing

bacteria benefits the growth and nutrition of the Woody invasive legume *Acacia cyclops* under nutrient limiting conditions. *Plant Soil* 366: 229-241.

Mus F, Crook MB, Garcia K, Costas AG, Geddes BA, Kouri ED, et al. 2016. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Applied Environment Microbiology*, 82, 3698–3710.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

Neeraj, KS. 2011. Organic amendments to soil inoculated arbuscular mycorrhizal fungi and *Pseudomonas fluorescens* treatments reduce the development of root-rot disease and enhance the yield of *Phaseolus vulgaris* L. *European Journal of Soil Biology*, 47: 288-295.

Oelmüller R, Sherameti I, Tripathi S, Varma A. 2009. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis* 49: 1-17.

Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H. 2015. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.3-1.

Orgiazzi A, Bianciotto V, Bonfante P, Daghino S, Ghignone S, Lazzari A, Lumini E, Mello A, Napoli C, Perotto S, et al. 2013. 454 Pyrosequencing Analysis of Fungal Assemblages From Geographically Distant, Disparate Soils Reveals Spatial Patterning and a Core Mycobiome. *Diversity*, 5(1): 73–98.

Otto-Hanson, L., J.R. Steadman, R. Higgins, and K.M. Eskridge. 2011. Variation in *Sclerotinia sclerotiorum* bean isolates from multisite resistance screening locations. *Plant Disease*, 95(11): 1370-1377.

Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature* 6: 763-75.

Phillipis JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Societe* 55: 158-161.

Plenchette C, Fortin JA, Furlan V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil* 70: 199-209.

Quiza L, St-Arnaud M, Yergeau E. 2015. Harnessing phytomicrobiome signaling for rhizosphere microbiome engineering. *Frontiers in Plant Science* 6: 507.

Reed SC, Cleveland CC, Townsend AR. 2011. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. *Annual review of Ecology Evolution and Systematics* 42: 489-512.

- Revillini D, Gehring CA, Johnson NC. 2016. The role of locally adapted mycorrhizas and rhizobacteria in plant-soil feedback systems. *Functional Ecology* 30: 1086-1098.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *142*: 1141-1153.
- Rockström J, Stefen W, Noone K, Persson A, Chapin FS, Lambin EF, Lenton TM Scheffer M, Folke C, Schellnhuber HJ et al. 2009. A safe operating space for humanity. *Nature*, 461: 472-475.
- Rodríguez H, Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319-339.
- Rousk J, Baath E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R, Fierer N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 4(10):1340–1351.
- Sahay NS, Varma A. 1999. *Piriformospora indica*: a new biological hardening tool for micropropagated plants *FEMS Microbiology Letters*, 181: 297-302.
- Schaad, N. W. 1998. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2. ed., St. Paul: American Phytopathological Society. 164p.
- Schnitzer SA, Klironomos J. 2011. Soil microbes regulate ecosystem productivity and maintain species diversity. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1240-1243.
- Shen Z, Ruan Y, Xue C, Zhong S, Li R, Shen Q. Soils naturally suppressive to banana Fusarium wilt disease harbor unique bacterial communities. *Plant Soil*, 393: 21-33.
- Siqueira JO, Saggin-Júnior OJ. 2001. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of Brazilian native woody species. *Mycorrhiza* 5: 245-255.
- Smith SE and Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Edition, Academic Press, London.
- Strullu-Derrien C, Kenrick P, Selosse M-A, 2016. Origins of the mycorrhizal symbioses, in F. Martin (ed.) *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, p. 3-20. Springer, Berlin Heidelberg.
- Thrall PH, Hochberg ME, Burdon JJ, Bever JD. 2007. Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 120-126.
- UNESCO. 2000. *Vegetação no Distrito Federal: tempo e espaço*. Brasília: UNESCO, 2000. P. 31-33p.
- Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, Salamov AA, Chen K, Chang HW, Podar M, Short JM, Mathur EJ, Detter JC, Bork P, Hugenholtz P, Rubin EM. 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308(5721): 554-557.

van der Putten WH, Bardgett, R. D., Bever, J. D., Bezemer, T. M., Casper, B. B., Fukami, T., Kardol, P., Klironomos, J. N., Kulmatiski, A., Schweiter, J. A., Suding, K. N et al. 2013. Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology*, 101: 265-276, 2013.

Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206: 1196–1206.

Varma A, Bakshi M, Lou B, Hartmann A, Oelmüller R. 2012. *Piriformospora indica*: A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. *Agricultural Research* 1: 117-131.

Verma S, Varma A, Rexer K.-H, Hassel A, Kost G, Sarbhoy A, Bisen P, Bütehorn B, Franken P (1998) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*. 90: 896-903.

Vincent JM. 1970. A practical manual for the study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publishers. Ltd. P. 164 International Biological Program Handbook 15.

Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM. 1997. Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277: 494-499.

Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Huckelhoven R, Neumann C, Wettstein DV, Franken P, Kogel K. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38): 13386-13391.

Williams, A. H., Sharma M., Tratcher LF, Singh KB. 2016. Comparative genomics and prediction of conditionally dispensable sequences in legume-infecting *Fusarium oxysporum* formae speciales facilitates identification of candidate effectors. *BMC Genomics* 17(1): 191.

Wu Q.S, Xia RX, Zoua YN. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. 2008. *European Journal of Soil biology*, 44: 122-128.

Xavier A, Wendling I, Silva RL. *Silvicultura clonal - princípios e técnicas*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 272p

Yadav V, Kumar M, Deep DK, Kumar H, Sharma R, Tripathi T, Tuteja N, Saxena AK, Johri AK. 2010. A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in the phosphate transport to the host plant. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 26532-26544.

Yusif, SA, Muhammad I, Hayatu NG, Sauwa MM, Tafinta IY, Mohammed MA, Lukman MA, Abubabar GA, Hussain AM. 2016. Effects of Biochar and Rhizobium Inoculation on Selected Soil Chemical Properties, Shoot Nitrogen and Phosphorus of Groundnut Plants

(*Arachis hypogaea* L.) in Sokoto State, Nigeria. Journal of Applied Life Sciences International, 9(2): 1-9.

Zangaro W, Nisizaki SMA, Domingos JCB, Nakano EM. 2003. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. Journal of Tropical Ecology 19: 315-324.

Zhang Y, Zhang Y, Liu M, Shi X, Zhao Z. 2008. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals in vitro. Journal of Microbiology, 46(6):624-32.

Zhang N, van der Putten W, Veen GF. 2016. Effects of root decomposition on plant-soil feedback of early- and mid-successional species. New Phytologist, 212, 220-231.

## Material Suplementar



**Figura S1:** Mudanças de vinhático aos 180 dias de cultivo em diferentes substratos, inoculados ou não com fungos micorrízicos (FM).

## **CAPÍTULO 2: Adição de solo de uma planta adulta da mesma espécie ao substrato comercial e a inoculação com FMA e rizóbio promovem o crescimento e nodulação de vinhático**

### **Resumo**

O vinhático (*Plathymentia reticulata* Bentham) apresenta baixa sobrevivência em viveiros e pouco se sabe sobre espécies de microrganismos associadas à esta planta, o que pode ser fundamental para a produção comercial de mudas. Os objetivos do presente estudo foi produzir mudas de vinhático inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e *Bradyrhizobium* sp. em diferentes proporções de substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO) quanto (a) a sobrevivência e o crescimento das mudas e (b) grupos de microrganismo rizosféricos. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em um delineamento inteiramente casualizado e dividido em duas avaliações, a primeira com 90 dias e 10 repetições e a segunda com 180 dias e cinco repetições. Os tratamentos foram: (T1) SUB 100% (T2) SUB mais extrato de SOLO, (T3) 2/3 de SUB e 1/3 de SOLO, (T4) 1/2 de SUB e 1/2 de SOLO, (T5) 1/3 de SUB e 2/3 de SOLO e (T6) 100% de SOLO. O extrato de solo foi adicionado para tentar incluir a microbiota nativa de vinhático. Todos os tratamentos foram inoculados com uma mistura de esporos de FMA (*Rhizophagus clarus*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Gigaspora albida*) e *Bradyrhizobium* sp. As medidas de crescimento e os índices de diversidade foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O DNA rizosférico foi avaliado por sequenciamento de *amplicons* (Illumina) e a análise de correspondência canônica (CCA) foi realizada usando características físico-químicas do substrato. Após 90 dias de crescimento, as mudas submetidas ao T1 e T2 não sobreviveram e as submetidas aos T4 e T5 foram as que apresentaram os maiores índices de crescimento. Houve diferença na nodulação, na qual T3 foram observados 122 nódulos, em T4 18 nódulos e T5 5 nódulos, enquanto em T6 nenhum nódulo foi observado. Após 180 dias de cultivo a matéria fresca e seca da parte aérea e nodulação de mudas em T3, T4 e T5 foram maiores que em T6. O CCA revelou que a comunidade de fungos (ITS) e bactérias e archaea (16S) estavam fortemente correlacionadas ao pH, ao CTC e à condutividade elétrica dos substratos. A riqueza dos fungos foi (T3 e T4) > (T5 e T6) e a diversidade em (T3, T4 e T5) > (T6), enquanto a riqueza e a diversidade de Bactérias e Archaea foram (T3, T4 e T5) > (T6). Os resultados revelaram as importantes implicações das características físico-químicas dos substratos de vinhático e sua associação com a microbiota. Conclui-se que vinhático apresenta *plant-soil feedback* positivo, uma vez

que o solo de uma planta adulta de vinhático adicionado ao substrato comercial associado com microrganismo, tais como FMA e rizóbio garantem sua sobrevivência e crescimento.

**Palavras-chave:** *Plathymenia reticulata* Bentham, *Bradyrhizobium*, simbiose, solo rizosférico.

## **Introdução**

O vinhático (*Plathymenia reticulata* Bentham), sinônimo de *P. foliolosa* Bentham, pertence à família Fabaceae e tem ampla ocorrência na Mata Atlântica e no Cerrado (Lacerda *et al.*, 2001; Lacerda *et al.*, 2002; Warnick & Lewis, 2003). A planta tem grande potencial econômico devido a madeira de qualidade e longa durabilidade (Lorenzi, 1992). Além de valor ambiental, sendo recomendada para a recuperação de áreas degradadas e implantação em sistemas agroflorestais (SAF), uma vez que é caducifólia e se desenvolve bem a pleno sol (EMBRAPA, 1994; UNESCO, 2000), possuindo características desejáveis para uso em programas de reflorestamento e arborização urbana.

Entretanto, a produção de mudas de vinhático é comprometida pela baixa sobrevivência em condições de viveiro, associada à ausência de informações específicas para a produção de mudas dessa espécie e problemas que podem se relacionar as características físico-química dos substratos de cultivo, como pH, disponibilidade de nutrientes (p.ex. de Freitas *et al.*, 2017a) e ausência de simbioses (capítulo 1). Os substratos de cultivo, sobretudo os comerciais, são produzidos para fornecer condições físico-químicas favoráveis ao crescimento inicial de plantas, a exemplo de níveis adequados de água, oxigênio, porosidade e suporte (Cunha *et al.*, 2006; Vence, 2008). Além de questões logísticas relacionadas ao transporte, facilidade na manipulação, baixo custo (Fernandes *et al.*, 2006), juntamente com questões fitossanitárias como a ausência de patógenos, pragas e plantas daninhas (Xavier *et al.*, 2009; Pagliarini *et al.*, 2012). Essas características implicam, também, na ausência de microrganismo benéficos, a exemplo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), rizóbios e grupos funcionais capazes de promover o crescimento de plantas nos substratos de cultivos.

O solo é uma matriz dinâmica que funciona como reservatório de biodiversidade e possibilita interações entre plantas e microrganismo (Nielsen *et al.*, 2015). Em condições naturais plantas se associam com microrganismo e formam um holobionte ou metaorganismo (van Breemen & Finzi, 1998; Vandenkoorhuyse *et al.*, 2015), por isso algumas plantas crescem melhor em solo obtido nas proximidades de uma planta adulta da mesma espécie que

em outros tipos de substrato. O modelo *plant-soil feedback* ganha espaço para explicar interferências positivas, quando o solo sob influência de determinada planta, favorece o crescimento de plântulas da mesma espécie (van der Putten *et al.*, 2013; Revillini *et al.*; 2016). Assim, o solo pode ser considerado como parte do fenótipo estendido de uma planta (van Breemen & Finzi, 1998) e deve ser utilizado como fonte de inóculo de microrganismo benéficos.

Para recompor parte da microbiota benéfica naturalmente presente no solo, a inoculação com microrganismo simbioses, a exemplo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e rizóbios pode ser viável para direcionar o microbioma e promover maior sobrevivência e crescimento de plantas (Revillini *et al.*; 2016; Das *et al.*, 2017; García-Parisi *et al.*, 2017). Os FMA são biotróficos obrigatórios e ocorrem naturalmente nos solos associados a mais de 70 % das plantas terrestres (Parniske, 2008; Brundrett, 2009) e aumentam a absorção de água e nutrientes inorgânicos devido as hifas externas que funcionam como extensões do sistema radicular das plantas (Smith & Read, 2008). Deste modo, os FMA possibilitam maior crescimento, estado nutricional e tolerância ao estresse biótico e abiótico de plantas (Wu *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2016), favorecendo seu estabelecimento quando transplantadas para o campo. Os rizóbios se associam a leguminosas (Graham & Vance, 2003; Olivares *et al.*, 2013), pois além de fixar nitrogênio atmosférico, favorece a sobrevivência e o crescimento de plantas de interesse agrícola ou florestal (Fonseca *et al.*, 2010, Yusif *et al.*, 2016) e juntos com os FMA podem formar simbiose tripartite com algumas plantas (Ossler *et al.*, 2015; Omirou *et al.*, 2016), maximizando os benefícios.

Há evidências da existência de PSF positivo e maior sobrevivência e crescimento de vinhático com a inoculação com FMA (capítulo 1). Entretanto, pouco é conhecido sobre a adição de solo como fonte de inóculo em outros substratos de cultivo para garantir um *plant-soil feedback* positivo e aumentar o crescimento de plantas por meio da nodulação, colonização micorrízica e atividade de microrganismo benéficos. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o crescimento das mudas de vinhático inoculadas com FMA e rizóbio em diferentes concentrações de substrato comercial e solo de uma planta adulta da mesma espécie em diferentes proporções.

## **Material e métodos**

### **Obtenção de sementes e substratos**

As sementes de vinhático foram obtidas com a SIF (Sociedade de Investigações Florestais) e desinfestadas superficialmente com etanol a 70 % por 30 s e hipoclorito de sódio (2,5 %, v:v) por 10 min, com lavagens sucessivas em água esterilizada, em condições assépticas. As sementes foram transferidas para placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada e esterilizada, posteriormente incubadas por sete dias a temperatura ambiente e quando pré-geminadas foram selecionadas e dispostas nos vasos de cultivo.

O solo proveniente de uma planta adulta de vinhático (SOLO) foi obtido no município de Viçosa-MG, na localidade de Duas Barras (S 20° 39' 925", W 42° 59' 549", 563 m de altitude, fragmento de mata), nas proximidades (raio de 2 m) de uma planta adulta, na camada de 0-20 cm de profundidade, em pontos distribuídos aleatoriamente para obtenção de uma amostra composta. As amostras de solos foram peneiradas em campo, homogeneizadas e armazenadas. O substrato comercial (SUB – Tropstrato Florestal, Vidaverde®) utilizado foi à base de casca de pinus e vermiculita expandida, acrescida de macro e micronutrientes.

### **Obtenção de inoculantes de FMA e rizóbio**

Os isolados de fungos micorrízicos arbusculares, *Claroideoglossum etunicatum* RJN101A (= *Glomus etunicatum*), *Rhizophagus clarus* RJN102A (= *Glomus clarum*) e *Gigaspora albida* PRN201A foram obtidos da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG, [www.furb.br/cicg](http://www.furb.br/cicg)) da Universidade Regional de Blumenau (FURB), Santa Catarina, Brasil. Os isolados foram multiplicados em solo:areia: (1:1, v:v) cultivados com braquiária (*Urochloa brizantha* Hochst Stapf).

O isolamento de *Bradyrhizobium* sp. foi a partir de nódulos de plantas de vinhático, crescendo em viveiro do IEF (Instituto Estadual de Florestas, Minas Gerais, Brasil). Os nódulos foram desinfestados superficialmente em etanol a 70 % por 30 s, seguido por imersão em hipoclorito de sódio a 2 % por 10 min e lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada. Os nódulos foram pressionados com uma pinça sobre a placa de Petri com meio de cultura YMA com vermelho Congo (Vincent, 1970), pH 6,9, incubadas a 25 °C, seguido por repicagem para obtenção de colônias isoladas. As colônias foram repicadas após a confirmação da pureza e preservadas a -80 °C em meio NBY (Schaad, 1998). O isolado teve o DNA extraído com o kit Nucleo Spin® Soil (Macherey-Nagel), a partir de células cultivadas em três dias em meio de cultivo YMA. Para a amplificação parcial do gene 16S rRNA, foram

utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991). O resultado do sequenciamento foi avaliado por comparação a sequências depositadas no GenBank (NCBI) por meio da ferramenta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **Desenho experimental e inoculação**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em um delineamento inteiramente casualizado e dividido em duas avaliações, a primeira com 90 dias e 10 repetições e a segunda com 180 dias e cinco repetições. Os tratamentos consistiram em diferentes proporções de substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO) (v:v): (T1) SUB 100 % (T2) SUB mais extrato de SOLO, (T3) 2/3 de SUB e 1/3 de SOLO, (T4) 1/2 de SUB e 1/2 de SOLO, (T5) 1/3 de SUB e 2/3 de SOLO, e (T6) 100 % de SOLO. Todos os tratamentos foram inoculados com uma mistura de FMA (*C. etunicatum*, *R. claru* e *G. albida*). As sementes previamente germinadas foram embebidas em meio YM com rizóbio por 10 min e, em seguida, transplantadas para vasos plásticos com capacidade de um litro. As plantas foram transferidas para o substrato de cultivo juntamente com os inóculos de FMA.

Para recompor parte da microbiota indígena foram adicionados 90 mL do SOLO em cada vaso do tratamento T2, obtida pela mistura de SOLO e água na proporção 1:2,5 (v:v), seguido por agitação em Shaker a 180 rpm por 30 min e filtração rápida em papel filtro faixa preta (0,20 mm).

As mudas foram irrigadas, conforme a necessidade, tentando manter a umidade próxima à capacidade de campo e 50 mL de solução com macro e micronutrientes foram aplicadas a cada vaso, a cada 15 dias (Clark, 1975).

### **Medidas de crescimento, teor de nutrientes e nodulação**

Foram avaliadas a percentagem de sobrevivência, número de folhas (NF), diâmetro do caule (D) a 1,5 cm do solo, altura (H), matéria fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea e matéria fresca (MFRA) e seca (MSRA) da raiz, número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN). A MSPA e MSRA foram determinadas após secagem até massa constante a 70 °C em estufa com ventilação forçada. Posteriormente, todo o conteúdo da MSPA foi processado em moinho Willey com peneira de 40 mesh de malha e submetido à digestão nitroperclórica (Johnson & Ulrich, 1959), para determinação das concentrações dos nutrientes

K, Ca, Mg e S, por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente acoplado (Optima 8300 ICP-OES Spectrometer, PerkinElmer). O teor de N na parte aérea foi determinado pelo método Kjeldahl (Embrapa, 1999) e o de P, colorimetricamente, pelo método da vitamina C, modificado por Braga & Defelipo (1974).

### **Caracterização físico-química dos substratos de cultivo**

Os substratos de cultivo foram caracterizados, conforme a Instrução Normativa nº 17 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), brasileiro (Brasil, 2008). As amostras em sua totalidade passaram pela peneira de malha de 19 x 19 mm (ASTM ¾”). Foi determinada a densidade volumétrica, a capacidade de retenção de água, o pH, a condutividade elétrica e a capacidade de troca catiônica.

A densidade foi determinada pelo método de autocompactação em proveta plástica de 500 mL, fazendo-se a determinação da umidade atual, previamente, com uma alíquota de 100 g da amostra levada à estufa (65 °C) até massa constante. O cálculo da compactação da massa do substrato foi efetuado conforme a fórmula:

$$D \text{ seca} = D \text{ úmida} * \frac{(100 - U \text{ atual})}{100}$$

Sendo, D seca = densidade volumétrica da amostra seca (kg m<sup>-3</sup>), D úmida = densidade volumétrica da amostra úmida (kg m<sup>-3</sup>) e U atual = umidade atual da amostra (%).

A capacidade de retenção de água (CRA) foi realizada após preenchimento dos anéis, com 100 mm de diâmetro e 50 mm de altura, conforme a densidade seca de cada amostra, seguido por saturação dos cilindros por 24 h e colocação dos anéis em mesa de tensão a 0,01 kPa por 48 h. A massa das amostras foi avaliada após a retirada da mesa e secas em estufa a 65 °C por 48 h, utilizando-se a seguinte equação:

$$CRA \ 10 \left( \% \frac{v}{v} \right) = \frac{[(\text{massa } 1 \text{ (g)} - \text{massa } 2 \text{ (g)}) * 100]}{\text{volume do anel (cm}^3\text{)}}$$

O pH e a condutividade elétrica foram determinado em água a 25 °C na razão 1:5, v:v, após agitação a 40 rpm durante 1 h. O pH foi medido em pHmetro e a condutividade elétrica foi realizada após filtragem em papel filtro faixa branca, utilizando-se condutivímetro.

A determinação da capacidade de troca catiônica (CTC) foi baseada na ocupação dos sítios de troca dos substratos pelos íons hidrogênio provenientes da solução de ácido clorídrico HCl (0,5 mol/L), que foram deslocados com a solução de acetato de cálcio a pH 7. Para evitar as perdas dos materiais orgânicos solúveis durante a lavagem foi utilizado carvão

ativado. A titulação foi realizada com NaOH (0,1 mol/L) e fenolftaleína 1 %. Sendo a CTC calculada pela fórmula:

$$CTC \left( \frac{\text{mmol}}{\text{kg}} \right) = \left\{ \left[ (V_a - V_b) \times C_{NaOH} \left( \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) \right] * 1000 \right\} m (g)$$

V<sub>a</sub> = volumes, em mL, de solução de NaOH 0,1 mol/L gastos nas titulações das soluções das amostras; V<sub>b</sub> = volumes, em mL, de solução de NaOH 0,1 mol/L gastos nas titulações das soluções das amostras das provas em branco; m = massa em gramas da amostra de substrato.

### **Avaliação do perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de vinhático**

O perfil da comunidade microbiana dos substratos de cultivo foi avaliado pela técnica de sequenciamento de *amplicon*. Uma amostra composta dos substratos foi obtida da rizosfera de quatro repetições, após 180 dias de cultivo, para cada um dos quatro tratamentos (T3, T4, T5 e T6), os quais apresentaram plantas sobreviventes, totalizando 16 unidades amostrais. O DNA total das amostras foi extraído com o kit Nucleo Spin<sup>®</sup> Soil (Macherey-Nagel) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram encaminhadas para o sequenciamento de amplicon das regiões 16S e ITS1 do rDNA de Bactérias/Archaeas e Fungos, respectivamente, por meio da plataforma Illumina<sup>®</sup> MiSeq (Illumina Inc.) (Bactéria e Archaea = MiSeq 151X151 Cycle Run e Fungos = MiSeq 250X250 Cycle Run). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology Software (QIIME v.1.8.0), utilizando os parâmetros do protocolo desenvolvido pelo Brazilian Microbiome Project (BMP) para as regiões 16S e ITS1. As sequências com similaridade maior que 97 % foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e a taxonomia foi atribuída às OTU, utilizando o UNITE e o Silva como bancos de dados de referência.

Foi realizada Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada nas matrizes de dissimilaridade entre os tratamentos (Matriz de Bray-Curtis) para avaliar diferenças na composição entre os quatro tratamentos. A análise de correspondência canônica (CCA) foi realizada considerando as OTU e as características físico-químicas dos tratamentos. Os *heatmap* foram elaborados para auxiliar no entendimento das diferenças e semelhanças na composição dos táxons mais abundantes em cada tratamento.

## Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) com  $\alpha$  de 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando o software R. Os dados relacionados à colonização micorrízica foram previamente normalizados via  $\arcsen\sqrt{(x/100)}$  para realização da ANOVA. Para descrever os índices de diversidade (Riqueza, Chao1, Shannon e Equitabilidade) foi utilizado o pacote Biodiversity do R e a PCoA, CCA e Heatmap foram realizadas com o pacote Vegan (Oksanen *et al.*, 2015).

## Resultados

### Sobrevivência, crescimento, teor de nutrientes e nodulação

As plantas cultivadas em substrato comercial puro (T1) ou acrescido de extrato de SOLO (T2) não sobreviveram até os 90 dias de cultivo, enquanto plantas cultivadas em T3, T4 e T6 apresentaram 90 % de sobrevivência e, T5 100 %. Nos tratamentos T4 e T5 foram constatados maiores índices de crescimento em NF, H, D, MFPA, MFRA (Tabela 1). Constatou-se diferença entre os tratamentos na média de nódulos, sendo que plantas cultivadas em T3 foram observados 122 nódulos, em T4 18 nódulos e em T5 5 nódulos, enquanto em plantas cultivadas T6 nenhum nódulo foi observado (Tabela 1).

**Tabela 1:** Medidas de crescimento de vinhático após 90 dias de cultivo em casa de vegetação em substratos com diferentes composições: (T3) 2/3 do substrato comercial (SUB) e 1/3 do solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO), (T4) 1/2 (SUB) e 1/2 do SOLO, (T5) 1/3 SUB e 2/3 do SOLO, e (T6) 100% SOLO.

Medidas de crescimento e nodulação*				
	T3	T4	T5	T6
NF	9,400 b	11,700 a	11,700 a	9,111 c
H (cm)	21,570 b	26,240 a	28,850 a	17,767 b
D (mm)	3,023 b	3,551 a	3,981 a	2,268 c
MFPA (g)	3,832 b	5,780 a	6,709 a	2,365 b
MFRA (g)	0,798 b	1,999 a	1,926 a	0,596 b
MSPA (g)	1,428 c	2,182 b	2,719 a	0,957 d
MSRA (g)	0,496 b	1,116 a	1,212 a	0,460 b
NN	121,556 a	18,400 b	5,300 b	0,000 b
MSN (g)	0,209 a	0,014 b	0,007 b	0,000 b

\*NF= número de folhas; D = diâmetro do caule; H = altura da planta; MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; MFRA =matéria fresca da raiz; MSRA = matéria seca da raiz; NN= número de nódulos e MSN = matéria seca dos nódulos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas mesmas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A avaliação do teor de nutrientes nos tecidos vegetais após 90 dias de cultivo demonstrou que T4 e T5 apresentaram diferenças apenas no conteúdo de K e Ca (Tabela 02). O maior acúmulo de N e Mn ocorreu em T6, enquanto o maior acúmulo de P, Mg e S foi em T3 (Tabela 02). Não houve diferença para Zn e Fe e o conteúdo de Cu foi menor em T5 comparado a T3 (Tabela 02).

**Tabela 2:** Teor de nutrientes na parte aérea de vinhático após 180 dias de cultivo em casa de vegetação em substratos com diferentes composições: (T3) 2/3 do substrato comercial (SUB) e 1/3 do solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO), (T4) 1/2 (SUB) e 1/2 do SOLO, (T5) 1/3 SUB e 2/3 do SOLO, e (T6) 100% SOLO.

Nutrientes	Unidade	Substrato			
		T3	T4	T5	T6
N	dag/kg	1,95 B	1,35 C	1,45 C	3,02 A
P	dag/kg	0,72 A	0,37 B	0,24 B	0,07 C
K	dag/kg	1,35 A	1,18 B	1,00 C	1,02 C
Ca	dag/kg	1,19 A	0,78 B	0,61 C	0,42 D
Mg	dag/kg	0,31 A	0,25 B	0,21 B	0,12 C
S	dag/kg	0,35 A	0,26AB	0,22BC	0,15 C
Zn	dag/kg	12,50 A	13,75 A	12,75 A	15,75 A
Fe	dag/kg	115,00 A	87,50 A	112,00 A	112,25 A
Mn	dag/kg	100,50 B	125,25 B	138,50 B	365,25 A
Cu	dag/kg	14,00 A	8,00AB	5,50 B	10,50AB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas mesmas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Após 180 dias de cultivo em casa de vegetação as plantas não apresentaram diferença em número de folhas (NL) e matéria seca da raiz (MSRA); sendo a altura (H) maior para os tratamentos T4 e T5 comparado a T3 e T6; o diâmetro (D), a matéria fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea foi maior em T3, T4 e T5 comparado a T6, porém a matéria fresca da raiz (MFRA) foi maior em T6 que em T3 (Tabela 3). A nodulação (NN) em T3 (301), T4 (393), T5(388) foi maior que em T6 (3,4) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Medidas de crescimento de vinhático após 180 dias de cultivo em substratos com diferentes composições: (T3) 2/3 do substrato comercial (SUB) e 1/3 do solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO), (T4) 1/2 (SUB) e 1/2 do SOLO, (T5) 1/3 SUB e 2/3 do SOLO, e (T6) 100% SOLO.

Medidas de crescimento e nodulação				
	T3	T4	T5	T6
NF	16,250 a	12,800 a	17,000 a	13,800 a
H (cm)	51,475 ab	52,850 a	53,300 a	42,520 b
D (mm)	6,835 ab	7,022 a	7,452 a	5,860 b
MFPA (g)	19,820 a	17,781a	17,771 a	11,318 b
MFRA (g)	3,986 b	5,102 ab	5,053 ab	6,184 a
MSPA (g)	8,544 a	8,168 a	8,41780 a	4,977 b
MSRA (g)	2,518 a	3,016 a	3,188 a	3,016 a

NN	300,750 a	392,750 a	387,800 a	3,400 b
DMN (g)	1,641 a	1,269 b	1,134 b	0,010 c

\*NF= número de folhas; D = diâmetro do caule; H = altura da planta; MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; MFRA =matéria fresca da raiz; MSRA = matéria seca da raiz; NN= número de nódulos e MSN = matéria seca dos nódulos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas mesmas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

### Caracterização físico-química dos substratos de cultivo

Os tratamentos substrato comercial (T1) e substrato comercial acrescido de extrato de solo (T2) não apresentaram diferenças para nenhuma das características avaliadas. A densidade volumétrica não diferiu entre T4 (0,784) e T5 (0,878), a CRA foi igual para todos os tratamentos, o pH não diferiu entre T5 (5,016) e T6 (5,123), a condutividade elétrica e a CTC foram menores em T6 (0,180; 17,53, respectivamente) e maiores para T3, T4 e T5 que correspondem as proporções de solo e substrato comercial (Tabela 4).

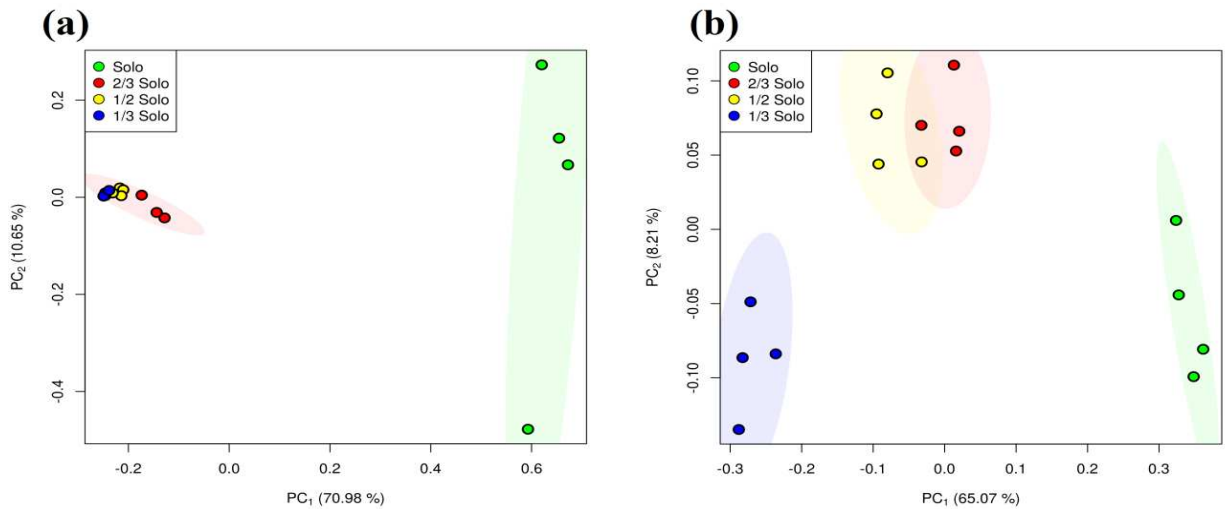
**Tabela 4:** Caracterização físico-química dos substratos de cultivo de vinhático, sendo substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma (SOLO) e (T1) 100 % de SUB, (T2) SUB acrescido de extrato de SOLO, (T3) 2/3 de SUB e 1/3 de SOLO, (T4) 1/2 de SUB e 1/2 de SOLO, (T5) 1/3 de SUB e 2/3 de SOLO, e (T6) 100% SOLO.

Caracterização físico-química	T1 T2 T3 T4 T5 T6					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Densidade Volumétrica (g/cm <sup>3</sup> )	0,426 d	0,443 d	0,668 c	0,784 b	0,878 b	1,027 a
Capacidade de retenção de água (CRA) % (m/m)	53,871 a	54,786 a	55,850 a	53,998 a	53,156 a	51,664 a
pH	5,813 a	5,770 a	5,533 b	5,343 c	5,016 d	5,123 d
Condutividade elétrica mS* cm <sup>-1</sup>	0,773 a	0,748 a	0,379 b	0,368 b	0,355 b	0,180 c
CTC mmol dm <sup>3</sup>	58,65 a	58,09 a	33,87 b	33,02 b	24,70 bc	17,53 c

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas mesmas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

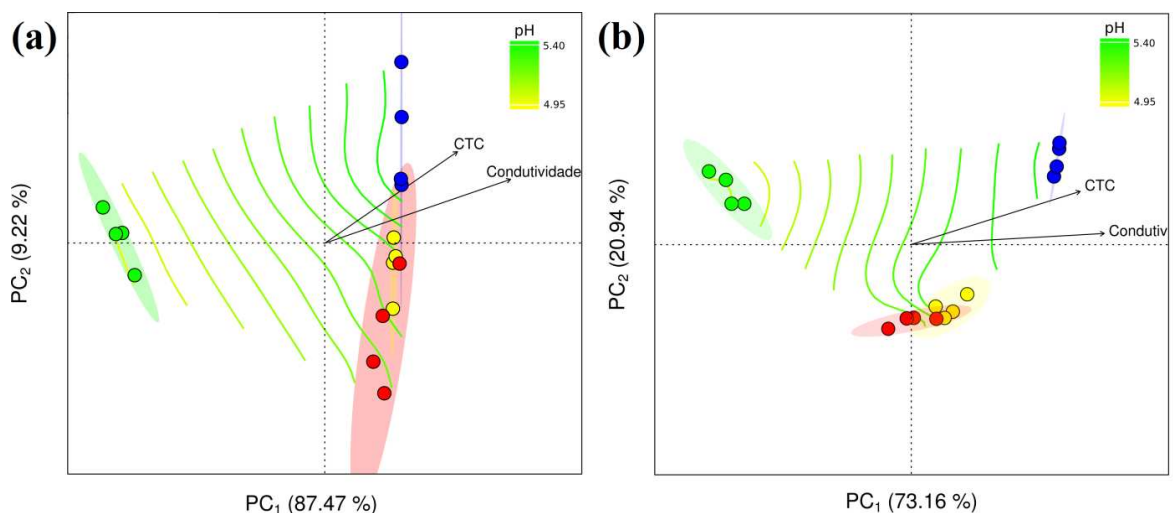
### Perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de vinhático

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) demonstrou que a comunidade fúngica formou dois agrupamentos, o primeiro composto das proporções de solo e substrato comercial (T3, T4 e T5) e o segundo por 100 % de solo (T6), com distribuição mais dispersa dos pontos (Figura 1 a). A comunidade bacteriana e de archaea apresentou o grupo T3 isolado, T4 e T5 com sobreposição e T6 um grupo separado (Figura 1 b).



**Figura 1:** Diagrama de ordenação produzido pela Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (a) região ITS, (b) região 16S, sendo substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO). As amostras estão representadas por círculos, com as seguintes identificações, azul = (T3) 2/3 de SUB e 1/3 de SOLO, amarelo = (T4) 1/2 de SUB e 1/2 de SOLO, vermelho = (T5) 1/3 de SUB e 2/3 de SOLO, e verde = (T6) 100 % de SOLO.

A análise de correspondência canônica (CCA) para a comunidade fúngica (Figura 2 a) permitiu correlacionar os parâmetros físico-químicos apresentados na Tabela 4, demonstrando que o gradiente de pH, condutividade elétrica e CTC crescendo em direção as proporções de solo e substrato (T3, T4 e T5), o eixo 1 da CCA explica cerca de 87 % da variabilidade. A CCA para bactéria e archaea (Figura 2 b) evidenciou um padrão similar ao encontrado para fungo, com a CTC e condutividade elétrica influenciando fortemente a composição da comunidade de T3 e o eixo 1 explicando 73 % da variabilidade.



**Figura 2:** Diagrama de ordenação produzido pela Análise de Correspondência Canônica (CCA), (a) região ITS, (b) região 16S, sendo substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO). As amostras estão representadas por círculos, com as seguintes identificações, azul = (T3) 2/3 de SUB e 1/3 de SOLO, amarelo = (T4) 1/2 de SUB e 1/2 de SOLO, vermelho = (T5) 1/3 de SUB e 2/3 de SOLO, e verde = (T6) 100 % de SOLO.

Quanto aos índices de riqueza (Riqueza e Chao1) para a região ITS, T3 e T4 foram similares e apresentaram maior valor, enquanto para o índice de diversidade (Shannon) T6 apresentou maior valor, diferindo de T3, T4 e T5. Para 16S o T6 apresentou menor riqueza e diversidade que os demais tratamentos (Tabela 4).

**Tabela 4:** Índices de diversidade de amplicons para ITS e 16S da rizosfera de vinhático, sendo substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO), azul = (T3) 2/3 de SUB e 1/3 de SOLO, amarelo = (T4) 1/2 de SUB e 1/2 de SOLO, vermelho = (T5) 1/3 de SUB e 2/3 de SOLO, e verde = (T6) 100 % de SOLO. A região ITS corresponde ao sequenciamento para fungos e região 16S para bactérias e archaeas.

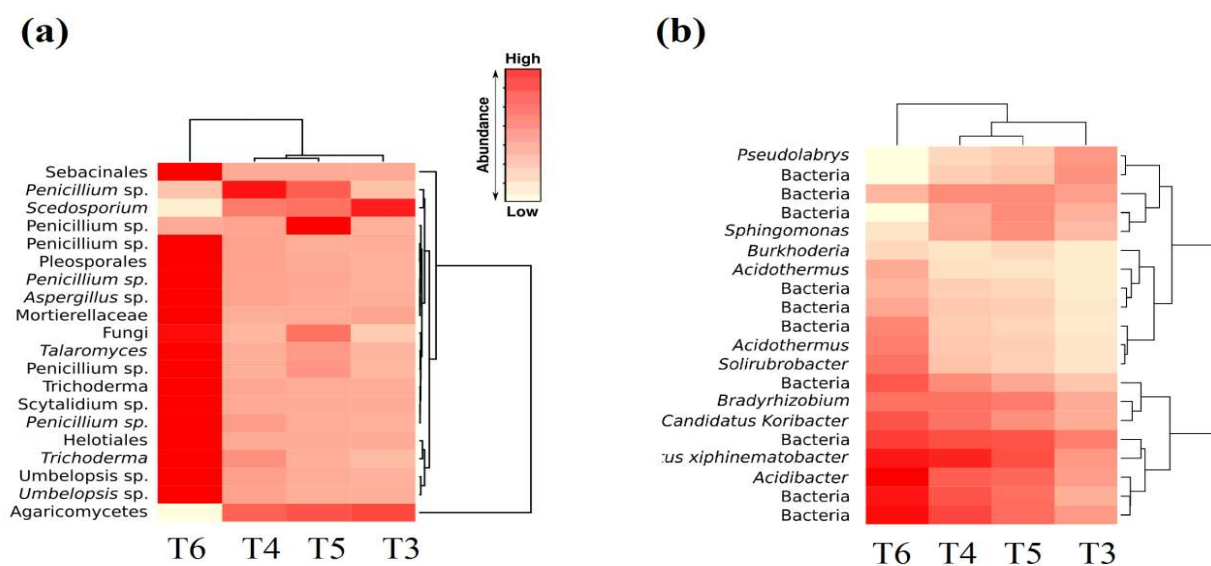
ITS					
Substrato	Cobertura	Riqueza	Chao1	Shannon	Equitabilidade
T3	0,99	205,25 A	5,52 A	3,31 B	0,43 B
T4	0,99	194,75 A	5,55 A	2,87 B	0,37 B
T5	0,99	150,00 B	5,29 B	2,82 B	0,39 B
T6	1,00	154,50 B	5,15 B	5,03 A	0,69 A

16S					
Substrato	Cobertura	Riqueza	Chao1	Shannon	Equitabilidade
T3	0,97	1205 A	1585 A	8,15 A	0,43 B
T4	0,97	1240 A	1595 A	8,30 A	0,37 B
T5	0,97	1322 A	1682 A	8,60 A	0,39 B
T6	0,98	865,75 B	1081 B	7,55 B	0,69 A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas mesmas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

O *Heatmap* demonstrou que o tratamento 100 % de solo (T6) apresentou abundância de vários grupos de fungos com potencial endofítico a exemplo de Sebaciales, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Umbelopsis*. O gênero *Scedosporium* foi abundante nas proporções de substrato comercial e solo (T3, T4 e T5), assim como *Penicillium* e Agaromycetes. O tratamento 100 % de solo (T6) apresentou abundância de vários grupos de bactéria não identificados e grupos endofíticos como *Solirubrobacter* e acidófilas como *Acidothermus*, *Acidibacter* e *Candidatus Koribacter*.



**Figura 3:** Heatmap e agrupamento (Matriz de Bray-Curtis), representando os táxons mais abundantes nos substratos de cultivo de vinhático, sendo (a) região ITS para fungos e (b) região 16S para bactérias e archaeas. O (T3) 2/3 do substrato comercial (SUB) e 1/3 do solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO), (T4) 1/2 (SUB) e 1/2 do SOLO, (T5) 1/3 SUB e 2/3 do SOLO, e (T6) 100% SOLO.

## Discussão

O extrato de SOLO pode ser uma fonte importante de microrganismo benéficos (capítulo 5), entretanto, as condições físico-químicas e biológicas do próprio substrato não favoreceram a microbiota simbiótica de vinhático (capítulo 1). Nesse caso, uma estratégia seria o uso de subsolo amplamente utilizada por viveiristas (de Freitas *et al.*, 2017b), em proporções com substrato comercial, acrescido do extrato de SOLO como fonte de inóculo. A sobrevivência igual ou superior a 90 % dos demais tratamentos e o maior crescimento em T4 e T5 aos 90 dias de cultivo parece estar relacionada não apenas as condições ótimas de crescimento para as plantas, como pH, matéria orgânica e porosidade, mas do efeito destas condições sobre a comunidade microbiana, conforme observado pelas diferenças na nodulação. Sabe-se que a sobrevivência e crescimento de plantas são afetados pela disponibilidade de nutrientes e microbiota associada (De Deyn *et al.*, 2004; van der Putten *et al.*, 2013; Baxendale *et al.*, 2014; Revillini *et al.*, 2016), uma vez que estes tem efeitos importantes na fisiologia, resistência a doenças e liberação de nutrientes.

Após 180 dias de cultivo, esperava-se que os tratamentos mantivessem o mesmo padrão (T4 = T5 > T3 e T6), entretanto, o T3 apresentou medidas de crescimento semelhante a T4 e T5. Os vasos tinham capacidade de um litro, isto pode ter limitado o crescimento das plantas em T4 e T5, além disso, mudanças sucessionais na microbiota pode ter favorecido T3.

De qualquer modo, 100 % de solo (T6) não favoreceu o crescimento (H, D, MFPA e MSPA) nem a nodulação das plantas quando comparado às proporções de solo e substrato (T3, T4 e T5). Esses resultados sugerem que mudanças nas características físico-químicas dos substratos de cultivo promovem melhorias como aeração, estimula a microbiota e a nodulação, talvez porque o aumento da heterogeneidade modula a resposta da planta na busca por nutrientes (Gleason, 1939; Hodge, 2004; Wubs & Bezemer, 2016). Essa questão tem implicações no modelo *plant-soil feedback*, devido a distribuição de nutrientes no solo e estratégias simbióticas para alocação de recursos.

É preciso reconhecer que a maior nodulação nem sempre implica em aumento da fixação biológica de nitrogênio (Angus *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2017) ou aumento do crescimento de plantas. Além disso, os rizóbios interagem com outros microrganismos que podem ou não estimular a formação de nódulos e o crescimento das plantas (Zahir *et al.*, 2011; Lahrouni *et al.*, 2012). Estratégias relacionadas a mudanças no próprio substrato de cultivo podem ter efeitos positivos maiores que estratégias de adubação apenas, quando as plantas são inoculadas com microrganismo simbiotes como FMA e rizóbio, podendo resultar em aumento do crescimento. Em condições ideais para a simbiose, promovida pela adição de condicionadores de solo como biochar, ou frente à limitação de nutrientes, rizóbios e/ou FMA podem maximizar a absorção de nutrientes limitantes como N e P (Johnson *et al.*, 2010; Yusif *et al.*, 2016), diminuindo a necessidade de agroquímicos por meio do estímulo de relações simbióticas.

Os resultados para o teor de nutrientes da parte aérea podem indicar diferenças na composição da comunidade microbiana e como esta se associa a planta e disponibiliza nutrientes. Por exemplo, T6 apresentou menor nodulação e menor crescimento, mas teve maior teor de nitrogênio nos tecidos vegetais, o que pode indicar a presença de microrganismos associativos capazes de fixar nitrogênio e disponibilizar para a planta (Boyd *et al.*, 2015; Doty *et al.*, 2016). Por outro lado, os teores de P, K, Ca, Mg e S foi maior em T3 e diminuiu com o aumento da proporção de solo, indicando que as características físico-químicas do substrato, a exemplo de maior CTC e pH pode ter favorecido a disponibilidade destes nutrientes. Existem muitos trabalhos descrevendo o aumento da absorção de nutrientes como P, N, K, S, Cu, Zn, Ca, Fe e Mn (Karagiannidis *et al.*, 2011; Rodríguez-Romero *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2013, Xie *et al.*, 2014, Moreira *et al.*, 2015), em plantas inoculadas com FMA. Entretanto, pouco é conhecido sobre os efeitos das alterações físico-químicas nos substratos de cultivo e como isso implica em alterações na microbiota e, conseqüentemente, na sobrevivência e

crescimento de plantas. Deste modo, torna-se importante avaliar como os fatores abióticos afetam as interações e modifica a microbiota *core* associada a vinhático (Agler *et al.*, 2016), garantindo a produção de mudas de qualidade.

Embora o vinhático possa responder negativamente ao aumento da saturação por base (de Freitas *et al.*, 2017b) e a mistura de solo com substrato comercial tenha elevado o pH, esse parâmetro pode interagir sinérgica ou antagonicamente com outros fatores e favorecer o crescimento da planta. Substratos mais aerados facilitam, por exemplo, a difusão de voláteis que são utilizados na comunicação das comunidades microbianas, podendo estimular determinados grupos em detrimento de outros (Effmert *et al.*, 2012; Schulz-Bohm *et al.*, 2017; van Agtmaal *et al.*, 2018) e favorecer *fitness* de plantas que tem maior dependência por sua microbiota associada, como acontece com vinhático.

A PCoA e a CCA demonstraram que existe sobreposição em termos da composição da comunidade fúngica para as proporções de substrato comercial e solo de uma planta adulta da mesma espécie (T3, T4 e T5) ou sobreposição de T4 e T5 para a comunidade de bactérias e archaea, indicando que as misturas criam condições para microrganismo distintos, devido a alterações nas características físico-químicas do substrato de cultivo. O pH foi o fator que mais afetou a estrutura da comunidade de fungos (ITS) e bactérias e archaea (16S), sendo que os solos do Cerrado e de Mata Atlântica nos quais vinhático naturalmente ocorre são mais ácidos (Duarte *et al.*, 2015; de Freitas *et al.*, 2017b). O pH afetou a estrutura da comunidade, sobretudo das comunidades bacterianas que são mais sensíveis a variações de pH quando comparada as comunidades fúngicas (Rousk *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2017), sendo este mais alcalino nas proporções de substrato comercial (T3, T4 e T5) que em 100 % de solo (T6). Estudos têm reportado que a diversidade de bactérias aumenta em solos com pH mais próximo do neutro e com baixo teor de alumínio disponível (Lauber *et al.*, 2009; He *et al.*, 2012; Joa *et al.*, 2014). Entretanto, a mortalidade das plantas em T1 e T2 é um indicativo que existe um pH ótimo para vinhático e sua microbiota associada.

Os grupos mais abundantes de bactéria (16S) diferiram do padrão dos grupos mais abundantes de fungos (ITS), uma vez que alguns grupos responderam ao gradiente físico-químico formado pelas proporções de substrato comercial e solo, diminuindo a abundância com o aumento da quantidade de solo, a exemplo de *Pseudolabrys*, ou aumentando a abundância em maior quantidade de solo, a exemplo de *Bradyrhizobium*, *Candidatus Koribacter*, *Candidatus xiphinematobacter*, *Acidibacter*, as quais podem ser dominantes em diversos tipos de solos (Joa *et al.*, 2014; Tin *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). A abundância de

bactérias acidófilas como *Acidothermus*, *Acidibacter* e *Candidatus Koribacter* na rizosfera em T6 pode ser uma estratégia adaptativa importante para vinhático. Assim, o controle do pH juntamente com outras características físico-químicas dos substratos não são questões triviais e devem ser utilizados como forma de manipular simbioses e promover a sobrevivência, crescimento, nodulação e teor de nutrientes de plantas dependentes de microrganismo simbioses.

## Conclusões

As proporções de substrato comercial e solo proveniente de uma planta adulta da mesma espécie (T3, T4 e T5) aumentam o crescimento e a nodulação de mudas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e rizóbios, bem como modifica a composição da microbiota da rizosfera de vinhático.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à FAPEMIG e ao Bioagro (Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária).

## Referências

Agler MT, Ruhe J, Kroll S, Morhenn C, Kim S, Weigel D, Kemen EM. 2016. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. PLoS ONE, 14.

Angus A, Lee A, Lum M, Shehayeb M, Hessabi R, Fujishine N, Yerrapragada S, Kano S, Song N, Yang P, Estrada de los Santos P, Faria S, Dakora F, Weinstock G, Hirsch A. 2013. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. Plant and Soil, 369(1): 543-562.

Araújo KS, de Carvalho F, Moreira FMS. 2017. *Burkholderia* strains promote *Mimosa* spp. growth but not *Macroptilium atropurpureum*. Revista Ciência Agronômica, 48(1): 41-48.

Baxendale, C., Orwin, K.H., Poly, F., Pommier, T. & Bardgett, R.D. 2014. Are plant–soil feedback responses explained by plant traits? New Phytologist, 204, 408–423.

Boyd ES, Garcia Costas AM, Trinity HL, Florence M, Peters JW. 2015. Journal of Bacteriology, 197(9): 1690-1699.

Braga, J.M.; Defelipo, B.V. 1974. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e planta. *Revista Ceres*, 21(113): 73-85.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N.º 31, de 23 de outubro de 2008. Altera os subitens 3.1.2, 4.1 e 4.1.2, do Anexo à Instrução Normativa SDA n.º 17, de 21 de maio de 2007. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 24 out. 2008. Seção 1, p.20.

Brundrett MC, 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320: 37–77.

Clark RB. 1975. Characterization of phosphatases of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 458-460.

Cunha AM, Cunha GM, Sarmiento RA, Cunha GM, Amaral JFT. 2006. Efeito de diferentes substratos sobre o desenvolvimento de mudas de *Acacia* sp. *Árvore*, 30: 207-214.

Das K, Prasanna R, Saxena AK. 2017. Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiologica*, 62:425–435.

De Deyn GB, Raaijmakers CE, van der Putten WH. 2004. Plant community development is affected by nutrients and soil biota. *Journal of Ecology*, 92: 824–834.

de Freitas ECS, de Paiva HN, Leite HG, de Oliveira Neto SN. 2017a. Crescimento e qualidade de mudas de *Cassia grandis* Linnaeus f. em resposta à adubação fosfatada e calagem. *Ciência Florestal*, 27 (2), 509-519.

de Freitas ECS, Paiva HN, Leite HG, Oliveira Neto SN. 2017b. Effect of phosphate fertilization and base saturation of substrate on the seedlings growth and quality of *Platymenia foliolosa* Benth. *Revista Árvore*, 41 (1): 1-9.

Dias PC, Pereira MSF, Kasuya MCM, de Paiva HN, de Oliveira LS, Xavier A. 2012. Micorriza arbuscular e rizóbios no enraizamento e nutrição de mudas de angico-vermelho. *Revista Árvore*, 36(6): 1027-1037.

Doty SL, Sher AW, Fleck ND, Khorasani M, Bumgarner RE, Khan Z, Ko AWK Kim S-H, DeLuca TH. 2016. Variable Nitrogen Fixation in Wild Populus. *PLoS ONE*, 11 (5).

Duarte ML, Paiva HN, Alves MO, Freitas AF, Maia FF, Goulart LML. 2015. Crescimento e qualidade de mudas de vinhático (*Platymenia reticulata* Benth.) em resposta à adubação com potássio e enxofre. *Ciência Florestal*, 25: 221-229.

- Effmert U, Kalderás J, Warnke R, Piechulla B. 2012. Volatile Mediated Interactions Between Bacteria and Fungi in the Soil. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6): 665-703.
- Embrapa. 1994. Atlas do meio ambiente do Brasil. Brasília. Ed. Terra Viva.
- Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária – Embrapa. 1999. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Rio de Janeiro, 370p.
- Fernandes C, Corá JE, Braz LT. 2006. Desempenho de substratos no cultivo do tomateiro do grupo cereja. *Horticultura Brasileira*, 24: 42-46.
- Fonseca MB, França MGC, Zonta EGV. 2010. Crescimento inicial de *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae – Caesalpinioideae) em diferentes condições de fertilidade em solo de cerrado. *Acta Botanica Brasilica*, 24: 322-327.
- García-Parisi PA, Lattanzi FA, Grimoldi AA, Druille M, Omacini M. 2017. Three symbionts involved in interspecific plant-soil feedback: epichloid endophytes and mycorrhizal fungi affect the performance of rhizobia-legume symbiosis. *Plant and soil*, 412: 151.
- Gleason HA. 1939. The individualistic concept of the plant association. *American Midland Naturalist*, 21 (1): 92-110.
- Graham PH, Vance CP, 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131: 872-877.
- He G, Lin J, Liu Q, Zhang J, Wu J. 2012. The effects of aluminum stress on bacterial community diversity in acidic red soils by polymerase chain reaction (PCR)-amplified restriction fragment length polymorphism. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 3707– 3715.
- Hodge A. 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist*, 162:9–24.
- Joa JH, Weon HY, Hyun HN, Jeun YC, Koh SK. 2014. Effect of Long-Term Different Fertilization on Bacterial Community Structures and Diversity in Citrus Orchard Soil of Volcanic Ash. *Journal of Microbiology*, 52(12): 995–1001.
- Johnson CM, Ulrich A. 1959. Analytical methods for use in plants analyses. Los Angeles: University of California, Bulletin 766: 32-33.
- Johnson NC, Wilson GWT, Bowker M, Wilson J, Miller RM, 2010. Resource limitation is a driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 2093-2098.

Karagiannidis N, Thomidis T, Lazari D, Panou-Filotheou E, Karagiannidou C. 2011. Effect of three Greek arbuscular mycorrhizal fungi in improving the growth, nutrient concentration, and production of essential oils of oregano and mint plants. *Scientia Horticulturae*. 129: 329-334.

Lacerda DR, Acedo MDP, Lemos Filho JP, Lovato MB. 2001. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymentia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Molecular Ecology*, 10: 1143-1152.

Lacerda DR, Lemos Filho JP, Acedo MDP, Lovato MB. 2002. Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymentia foliolosa* and *P. reticulata* (mimosoideae), inferred using RAPD markers. *Plant Systematic Evolution*, 235:1-4.

Lahrouni M, Oufdou K, Faghire M, Peix A, El Khalloufi F, Vasconcelos V, Oudra B. 2012. Cyanobacterial extracts containing microcystins affect the growth, nodulation process and nitrogen uptake of faba bean (*Vicia faba* L., Fabaceae). *Ecotoxicology* 21: 681.

Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, First Edition, John Wiley & Sons Inc, New York, pp. 115-175.

Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied Environment Microbiology*, 75, 5111–5120.

Lorenzi H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa-SP, Editora Plantarum. 352p.

Moreira BC, Mendes FC, Mendes IR, Paula TA, Prates Junior P, Salomão LCC, Stürmer SL, Otoni WC, Guarçoni M A, Kasuya MCM. 2015. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* improves the growth and nutrient uptake in micropropagation-derived pineapple plantlets. *Scientiae Horticulturae*, 197: 183-192.

Moreira SLS, Prates Júnior P, Fernandes RBA, da Cunha ACMM, Campo ANR. 2016. Growth and nutrients uptake in *Euterpe edulis* Martius inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46 (2):169-176.

Nielsen, U. N., Wall, D. H. & Six, J. Soil biodiversity and the environment. 2015. *Annual Review of Environment and Resources*, 40: 63–90.

Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H. 2015. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.3-1.

Olivares J, Bedmar EJ, Sanjuán J. 2013. Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26 (5), p. 486-494.

Omirou M, Fasoula DA, Ioannide IM. 2016. *Bradyrhizobium* inoculation alters indigenous AMF community assemblages and interacts positively with AMF inoculum to improve cowpea performance. *Applied Soil Ecology*, 108:381-389.

Ossler J, Zielinski CA, Heath D. 2015. Tripartite mutualism: Facilitation or trade-offs between rhizobial and mycorrhizal symbionts of legume hosts. *American Journal of Botany*, 102: 1332-1341.

Pagliarini MK, Castilho RMM, Alves MC. 2012. Caracterização físico-química de misturas de componentes de substrato com resíduo de celulose para fins de produção de mudas. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 7: 160-169.

Parniske, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature*, 6:763-775.

Revillini D, Gehring CA, Johnson NC. 2016. The role of locally adapted mycorrhizas and rhizobacteria in plant-soil feedback systems. *Functional Ecology*, 30: 1086-1098.

Rodríguez-Romero, A.S.; Azcón, R.; Jaizme-Vega, M.C. 2011. Early mycorrhization of two tropical crops, papaya (*Carica papaya* L.) and pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.], reduces the necessity of P fertilization during the nursery stage. *Fruits*. 66 (1): 3-10.

Rousk J, Baath E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R, Fierer N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, 4(10):1340–1351.

Schaad NW. 1998. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2. ed., St. Paul: American Phytopathological Society. 164p.

Schulz-Bohm K, Martín-Sánchez L, Garbeva P. 2017. Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra and inter-kingdom interactions. *Frontiers in Microbiology*, 8.

Smith SE. and Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Edition, Academic Press, London.

Tin HS, Palaniveloo K, Anilik J, Vickneswaran M, Tashiro Y, Vairappan CS, Sakai K. 2018. Impact of land-use change on vertical soil bacterial communities in Sabah. *Microbial Ecology*, 75: 459-467.

Tong Y, Gabriel-Neumann E, Ngwene B, Krumbein A, Baldermann S, Schreiner M, George E. 2013. Effects of single and mixed inoculation with two arbuscular mycorrhizal

fungi in two different levels of phosphorus supply on  $\beta$ -carotene concentrations in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) tubers. *Plant Soil*. 372: 361-374.

UNESCO. 2000. *Vegetação no Distrito Federal: tempo e espaço*. Brasília: UNESCO, 2000. P. 31-33p.

van Agtmaal M, Straathof AL, Termorshuizen A, Lievens B, Hoffland E, de Boer W. 2018. Volatile-mediated suppression of plant pathogens is related to soil properties and microbial community composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 117: 164-174.

van Breemen N, Finzi IAC. 1998. Plant-soil interactions: ecological aspects and evolutionary implications. *Biogeochemistry* 42:1-19.

van der Putten WH, Bardgett RD, Bever JD, Bezemer TM, Casper BB, Fukami T, Kardol P, Klironomos JN, Kulmatiski A, Schweiter JA, Suding KN, van der Voorde TFJ, Wardle DA. 2013. Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology* 101: 265-276.

Vandenkoorhuysen P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*. 206: 1196-1206.

Vence LB. 2008. Disponibilidade de água-aire em substratos para plantas. *Ciencia del Suelo*, v.26, p.105-114,

Vincent JM. 1970. *A practical manual for the study of root-nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publishers. Ltd. P. 164 International Biological Program Handbook 15.

Wang H, Zeng Y, Guo C, Bao Y, Lu G, Reinfelder JR, Dang Z. 2018. Bacterial, archaeal, and fungal community responses to acid mine drainage-laden pollution in rice paddy soil ecosystem. *Science of the Total Environment*, 616-617, 107-116.

Warwick MC, Lewis GP. 2003. Revision of *Plathymentia* (Leguminosae—Mimosoideae). *Edinburgh Journal of Botany* 60: 111–119.

Wu Y, Zeng J, Zhu Q, Zhang Z, Lin X. 2017. pH is the primary determinant of the bacterial community structure in agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Scientific Reports*, 7: 40093.

Wu Q-S, Xia R-X, Zou Y-N. 2008. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European J. Soil Biol.*, 44: 122–128.

Wubs JER, Bezemer MT. 2016. Effects of spatial plant-soil feedback heterogeneity on plant performance in monoculture. *Journal of Ecology*, 104, 364-376.

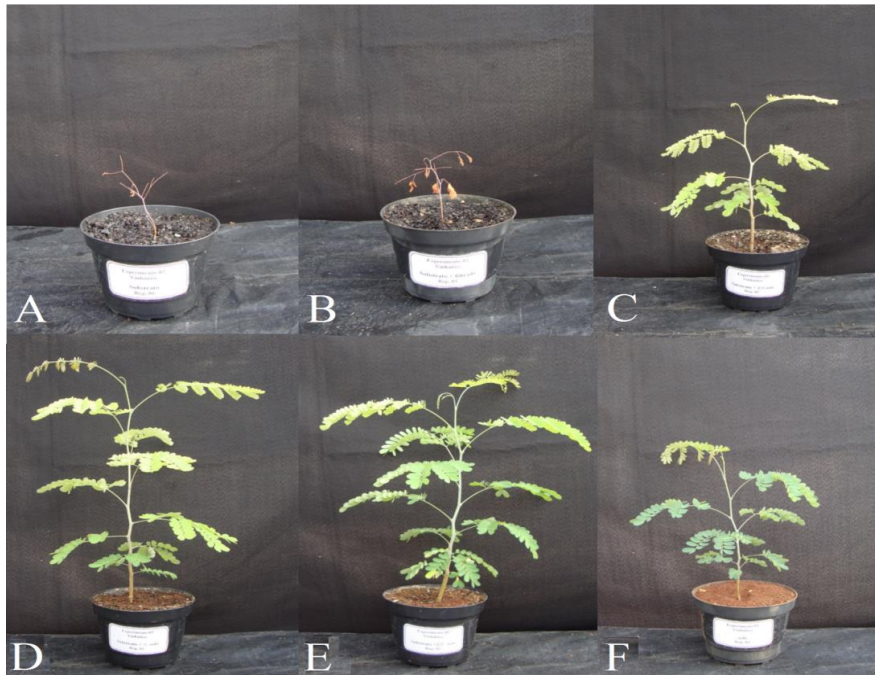
Xavier A, Wendling I, Silva RL. 2009. *Silvicultura clonal - princípios e técnicas*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 272 p.

Xie X, Weng B, Cai B, Dong Y, Yan C. 2014. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus supply on the growth and nutrient uptake of *Kandelia obovata* (Sheue, Liu & Yong) seedlings in autoclaved soil. *Applied Soil Ecology*. 75: 162-171.

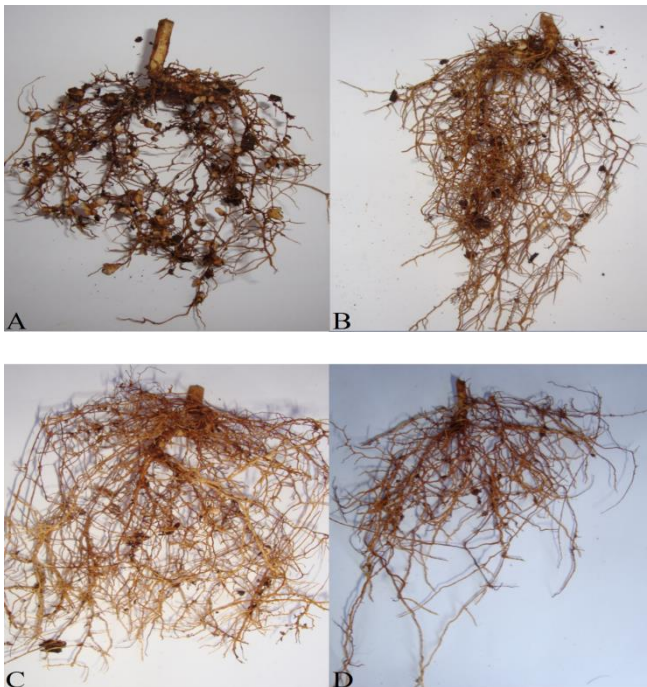
Yusif SA, Muhammad I, Hayatu NG, Sauwa MM, Tafinta IY, Mohammed MA, Lukman MA, Abubabar GA, Hussain AM. 2016. Effects of Biochar and Rhizobium Inoculation on Selected Soil Chemical Properties, Shoot Nitrogen and Phosphorus of Groundnut Plants (*Arachis hypogaea* L.) in Sokoto State, Nigeria. *Journal of Applied Life Sciences International*, 9(2): 1-9.

Zahir ZA, Zafar-ul-Hye M, Sajjad S, Naveed M. 2011. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for coinoculation with *Rhizobium leguminosarum* to improve growth, nodulation, and yield of lentil. *Biology and Fertility of Soils*, 47: 457-465.

## Material Suplementar



**Figura Suplementar 1:** Padrão de crescimento de vinhático com 90 dias de cultivo, em diferentes proporções de substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO), sendo (A) 100 % de SUB = T1; (B) SUB mais extrato de SOLO = T2; (C) 2/3 de SUB e 1/3 de SOLO = T3; (D) 1/2 de SUB e 1/2 de SOLO = T4; (E) 1/3 de SUB e 2/3 de SOLO; (F) 100 % de SOLO.



**Figura Suplementar 2:** Crescimento radicular e formação de nódulos nas raízes de mudas de vinhático em diferentes de substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO). (A) 2/3 de SUB e 1/3 de SOLO. (B) 1/2 de SUB e 1/2 de SOLO. (C) 1/3 de SUB e 2/3 de SOLO. D) 100 % de SOLO.

### **CAPÍTULO 3: Fungos micorrízicos arbusculares aumentam o crescimento e melhoram o aproveitamento de fósforo durante a produção de mudas de *Plathyenia reticulata* Bentham**

#### **Resumo**

*Plathyenia reticulata* Bentham, conhecida como vinhático, é uma espécie florestal que possui grande potencial para produção de madeira e para uso em recuperação de áreas degradadas. Porém, ela possui baixa sobrevivência em condições de viveiro que pode estar relacionada à ausência de simbioses nos substratos comerciais de cultivo. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) favorecem a absorção de água e nutrientes pela planta em associações simbióticas com as raízes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de mudas de vinhático inoculadas com FMA em diferentes concentrações de fósforo (P), inoculadas ou não com FMA. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado com desdobramento fatorial (2X5). As mudas foram cultivadas sem ou inoculação de três espécies de FMA (*Rhizophagus clarus*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Gigaspora albida*) e quatro doses de P (50, 150, 300 e 450 mg dm<sup>-3</sup> de solo) na forma de fosfato dibásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). As mudas sem ou com inoculação também foram crescidas sem a adição fonte de P. Além disso, essas mudas foram inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. Aos 90 dias foram avaliadas o diâmetro do caule, altura da planta, matéria fresca e seca de parte aérea, matéria fresca e seca de raiz. As plantas inoculadas com FMA apresentaram maior crescimento que as não inoculadas para todas as características avaliadas. O crescimento máximo foi observado entre 160 a 280 mg dm<sup>-3</sup> de P. Portanto, a inoculação de FMA favorece o crescimento e o aproveitamento de P de mudas de vinhático.

**Palavras-chave:** FMA, *plant-soil feedback*, *Bradyrhizobium*, simbiose tripartite, vinhático.

#### **Introdução**

A Mata Atlântica e o Cerrado apresentam altos índices de endemismo e são consideradas áreas prioritárias para a conservação (Myers *et al.*, 2000), bem como apresentam muitas espécies de plantas e microrganismo pouco conhecidas. Entretanto, processos históricos de ocupação territorial têm levado a substituição de amplas áreas nativas por centros urbanos, culturas agrícolas e pastagens, matéria prima para a indústria madeireira e carvão para as siderúrgicas (Vitousek *et al.*, 1997, Brandon *et al.*, 2005, Rockström *et al.*, 2009). Estes biomas foram reduzidos a menos de 12 % (Ribeiro *et al.*, 2009) e 45 % (Machado *et al.*, 2004), respectivamente, da sua área original, o que favorece a extinção de

espécies (Brooks *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2015) e a perda de serviço ecossistêmicos. Para reverter esse quadro, torna-se importante a recomposição de áreas, sendo o plantio de mudas um método amplamente utilizado (Duarte *et al.*, 2015; de Oliveira *et al.*, 2017) por direcionar o início do processo de revegetação.

Algumas espécies florestais nativas, a exemplo de vinhático (*Platymenia reticulata* Bentham) têm características desejáveis para o reflorestamento e potencial para a recuperação de áreas degradadas (EMBRAPA, 1994; Lacerda *et al.*, 2001), bem como valor comercial devido a durabilidade e qualidade da madeira (Lorenzi, 1992). O vinhático é uma espécie pertencente à família Fabaceae, Mimosoideae (sinônimo de *P. foliolosa* Bentham), ocorre na Mata Atlântica e no Cerrado como ecótipos distintos (Lacerda *et al.*, 2002; Warwick & Lewis 2003), sendo uma planta decídua, secundária inicial a clímax (Carvalho, 2009). Contudo, tem produção de mudas limitada, visto à baixa sobrevivência em viveiro, quando cultivadas em substrato comercial. Esta limitação pode estar associada à ausência de microrganismo simbioses nos substratos de cultivos (capítulo 1 e 2). A dependência simbiótica dessa espécie pode ser uma estratégia adaptativa aos solos oligotróficos e ácidos comuns em sua área de ocorrência natural (Pagano *et al.*, 2009; Carvalho, 2009; de Freitas *et al.*, 2017), o que possibilita maior eficiência na absorção e utilização de nutrientes.

As informações sobre requerimentos nutricionais de espécies florestais nativas são escassas, devido às exigências distintas, associada a grande variabilidade genética e ocupação de diferentes nichos ecológicos, podendo existir variações entre espécies pioneiras, secundárias ou de clímax. Assim, essas plantas podem responder de modo diferente a oferta de nutrientes fornecidos pela fertilização, promovendo o aumento ou decréscimo no crescimento (Santos *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2012). Os macronutrientes como N, P e K são requeridos em grandes quantidades e normalmente são encontrados em baixas concentrações na maioria dos solos brasileiros. Para vinhático é conhecido que a planta responde à adubação potássica (Duarte *et al.*, 2015) e adubação fosfatada (Duarte *et al.*, 2015). Entretanto, não são reconhecidas informações sobre como as relações simbióticas dessa espécie favorecem o crescimento e absorção de nutrientes por meio de fertilização.

O vinhático estabelece simbiose mutualista com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e rizóbio e apresenta *plant-soil feedback* positivo (capítulo 01 e 02). O solo de uma planta adulta da mesma espécie, na perspectiva do *plant-soil feedback* positivo, pode apresentar espécies de FMA e rizóbio localmente adaptados (van der Putten *et al.*, 2013; Revillini *et al.*, 2016) capazes de favorecer a sobrevivência, o crescimento e o melhor

aproveitamento de nutrientes. A inoculação com FMA promove o crescimento de plantas, diminui o tempo de formação de mudas em viveiro, melhora o estado nutricional e aumenta o estabelecimento de mudas em campo (Machineski *et al.*, 2009; Goetten *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2016). Plantas associadas aos FMA exploram maior volume de solo (Smith & Read, 2008), apresentam maior absorção de nutrientes, a exemplo de N e P (Parniske, 2008), tolerância ao estresse biótico e abiótico (Wu *et al.*, 2008; Sikes *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010) e aumentam a densidade de bactérias na rizosfera ou micorrizosfera (Neeraj, 2011; Revillini *et al.*, 2016). Os FMA podem contribuir para maior nodulação e crescimento de leguminosas (Jesus *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2012), devido ao aumento na absorção de P, que é um dos fatores indispensáveis para que haja fixação de N (Almeida *et al.*, 2000; Scheublin *et al.*, 2004). Para vinhático são necessários estudos que relacionem a produção de mudas com a fertilização e suas relações simbióticas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de mudas de vinhático à adubação fosfatada e a inoculação com FMA, quando cultivadas em solo proveniente de uma planta adulta da mesma espécie.

## **Material e métodos**

### **Sementes e substratos**

As sementes de vinhático foram obtidas com a SIF (Sociedade de Investigações Florestais) e desinfestadas superficialmente com etanol a 70 % por 30 s e hipoclorito de sódio (2,5 %, v:v) por 10 min, com lavagens sucessivas em água esterilizada, em condições assépticas. As sementes foram transferidas para placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada e esterilizada, posteriormente incubadas por sete dias a temperatura ambiente e quando pré-geminadas foram selecionadas e dispostas nos vasos de cultivo.

O solo proveniente de uma planta adulta de vinhático foi obtido no município de Viçosa-MG, na localidade de Duas Barras (S 20° 39' 925", W 42° 59' 549", 563 m de altitude, fragmento de mata), nas proximidades (raio de 2 m) de uma planta adulta, na camada de 0-20 cm de profundidade, em pontos distribuídos aleatoriamente para obtenção de uma amostra composta. O solo foi peneirado em campo, homogeneizado e armazenado para posterior caracterização química e granulométrica (Tabela 1).

**Tabela 1:** Características químicas e granulométricas do solo de uma planta adulta da mesma espécie utilizado como substrato de cultivo.

pH	P	K	SB	CTC (T)	CTC (t)	m	P-rem	Classe textural
H <sub>2</sub> O	mg dm <sup>-3</sup>			cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>		%	mg L <sup>-1</sup>	
4,25	3,9	53	0,73	12,93	2,31	68,4	22,3	Argilo-arenosa

Extratores utilizados: P, K = Extrator Mehlich 1; pH em água, relação 1:2,5; SB= soma de bases trocáveis; CTC (T) = Capacidade de Troca Catiônica a pH; m = índice de saturação por alumínio.

### Obtenção de inoculantes de FMA e rizóbio

Os isolados de fungos micorrízicos arbusculares, *Claroideoglossum etunicatum* RJN101A (= *Glomus etunicatum*), *Rhizophagus clarus* RJN102A (= *Glomus clarum*) e *Gigaspora albida* PRN201A foram obtidos da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG, [www.furb.br/cicg](http://www.furb.br/cicg)) da Universidade Regional de Blumenau (FURB), Santa Catarina, Brasil. Os isolados foram multiplicados em solo:areia (1:1, v:v) cultivados com braquiária (*Urochloa brizantha* Hochst Stapf).

O isolado de *Bradyrhizobium* sp. foi obtido a partir de nódulos de uma planta de vinhático, crescendo em viveiro do IEF (Instituto Estadual de Florestas, Minas Gerais, Brasil). O nódulo foi desinfestado superficialmente em etanol a 70 % por 30 s, seguido por imersão em hipoclorito de sódio a 2 % por 10 min e lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada. O nódulo foi pressionado com uma pinça sobre a placa de Petri com meio de cultura YMA com vermelho Congo (Vincent, 1970), pH 6,9, incubadas a 25 °C, seguido por repicagem para obtenção de colônias isoladas. A colônia foi repicada após a confirmação da pureza e preservadas a -80 °C em meio NBY (Schaad, 1998). O isolado teve o DNA extraído com o kit Nucleo Spin<sup>®</sup> Soil (Macherey-Nagel), a partir de células cultivadas em três dias em meio de cultivo YMA. Para a amplificação parcial do gene 16S rRNA, foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991). O resultado do sequenciamento foi comparado a sequências depositadas no GenBank (NCBI) por meio da ferramenta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### Desenho experimental e inoculação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições e arranjo fatorial (5x2), sendo cinco doses de P (D1 = 0, D2 = 50, D3 = 150, D4 = 300 e D5 = 450 mg dm<sup>-3</sup> de solo), na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> via solução, inoculados ou não com uma mistura de FMA (*Rhizophagus clarus*, *Claroideoglossum*

*etunicatum*, *Gigaspora albida*) e sete repetições. As sementes previamente germinadas foram embebidas em meio YM com *Bradyrhizobium* sp. por 10 minutos, em seguida transplantadas para vasos plásticos de um litro de capacidade. As plantas foram transferidas para o substrato de cultivo, que consistia no solo de uma planta adulta da mesma espécie, juntamente com os inóculos de FMA.

As mudas foram irrigadas, conforme a necessidade, tentando manter a umidade próxima à capacidade de campo e 50 mL de solução com macro e micronutrientes sem adição de P foram aplicadas a cada vaso, a cada 15 dias (Clark, 1975).

### **Medida de crescimento, teor de nutrientes, dependência micorrízica e nodulação**

Após o período de 90 dias foi avaliada a altura das plantas, diâmetro do caule (D) a 1,5 cm do solo, matéria fresca da parte aérea (MFPA) massa fresca da raiz (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), número de nódulos e a dependência micorrízica. A MSPA e MSR foram determinadas após secagem até peso constante a 70 °C em estufa com ventilação forçada. Posteriormente, todo o conteúdo da MSPA foi processada em moinho Willey com peneira de 40 mesh de malha e submetido à digestão nitroperclórica (Johnson & Ulrich, 1959), para determinação do teor dos nutrientes K, Ca, Mg e S, por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente acoplado (Optima 8300 ICP-OES Spectrometer, PerkinElmer). O teor de N na parte aérea foi determinado pelo método Kjeldahl (Embrapa, 1999) e o de P, colorimetricamente, pelo método da vitamina C, modificado por Braga & Defelipo (1974).

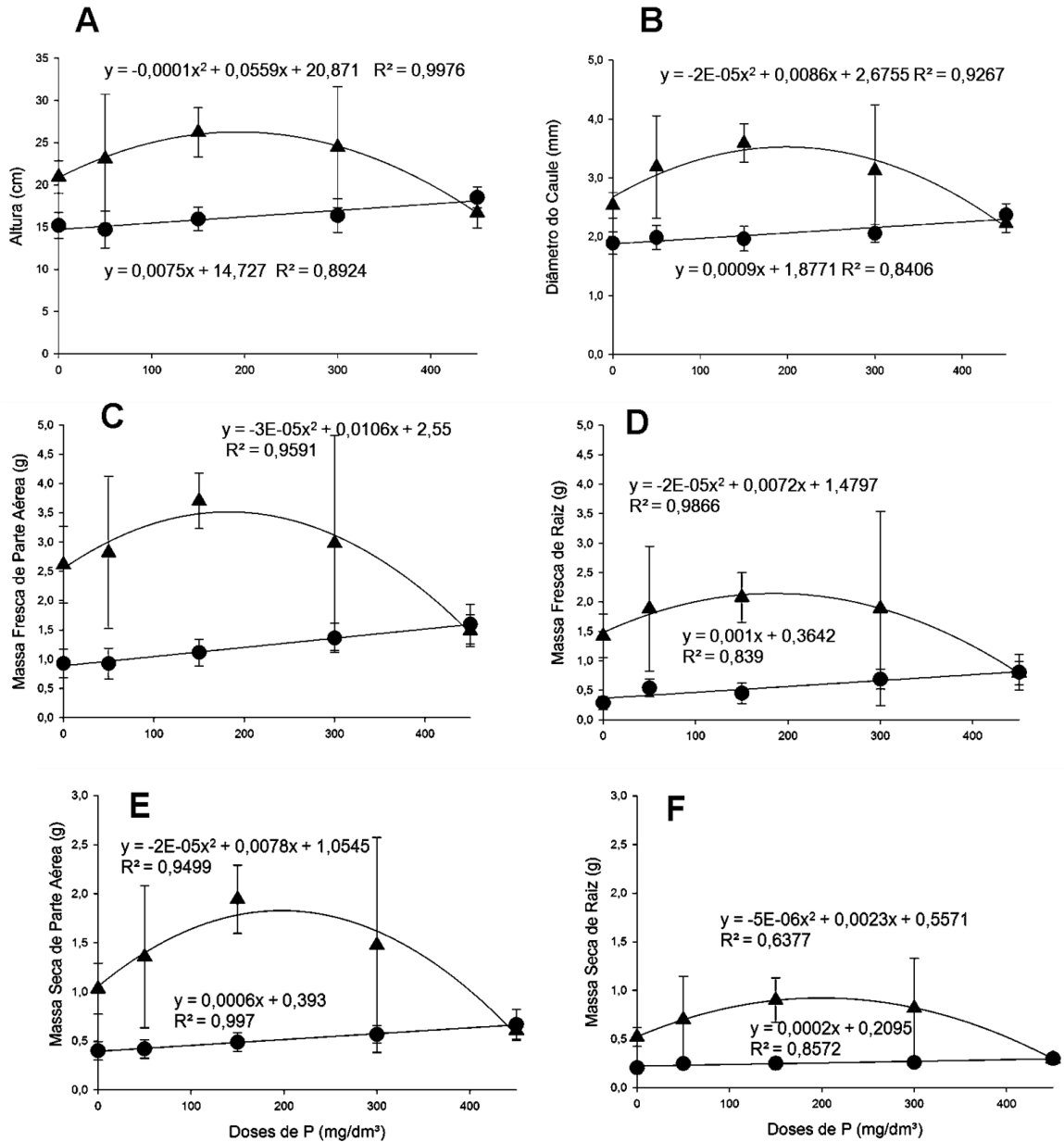
A dependência micorrízica (DM) foi determinada utilizando a equação:  $(DM) = \{(massa\ seca\ total\ de\ plantas\ inoculadas - massa\ seca\ total\ de\ plantas\ não\ inoculadas) / massa\ seca\ total\ de\ plantas\ inoculadas\} \times 100$  (Plenchette *et al.*, 1983). Os dados referentes à dependência micorrízica foram considerados: > 75 % = dependência excessiva, 50-75 % = dependência alta, 25-50 % = dependência moderada, < 25 % dependência baixa.

## **Resultados**

### **Medidas de crescimento, teor de nutrientes, dependência micorrízica e nodulação**

As regressões indicaram que as plantas inoculadas com FMA apresentaram maiores valores com relação às plantas não inoculadas para todas as características avaliadas com pontos de máxima entre 160 a 280 mg dm<sup>-3</sup> de P. As mudas inoculadas com FMA apresentaram maior crescimento que as não inoculadas até a D4 (300 mg dm<sup>-3</sup>). Os

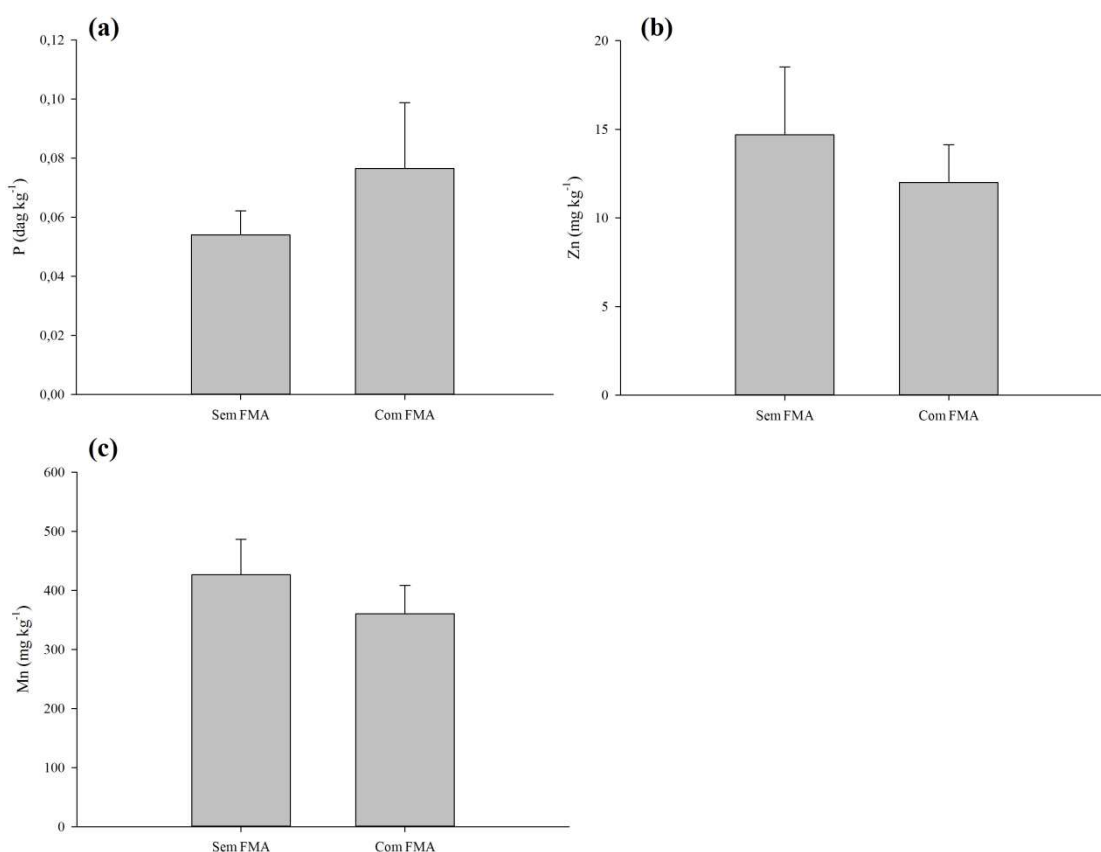
incrementos variaram até D4 de 55 a 75 % em D, de 60 a 73 % em H, de 30 a 46 % em MFPA, de 20 a 36 % em MFRA, de 24 a 39 % em MSPA e de 30 a 46 % em MSRA. Para a dose mais alta testada ( $D5 = 450 \text{ mg dm}^{-3}$ ), houve equivalência ou mesmo redução de crescimento para as mudas inoculadas com FMA (Figura 1).



**Figura 1:** Resposta de mudas de vinhático a doses de P (0, 50, 150, 300 e 450  $\text{mg dm}^{-3}$  de solo), na forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  via solução, inoculados (triângulo verde) ou não inoculados (círculo vermelho) com uma mistura de três espécies de FMA, no crescimento de vinhático após 90 dias de cultivo: (A) altura; (B) diâmetro; (C) massa fresca da parte aérea; (D) massa fresca da raiz; (E) massa seca da parte aérea; (F) massa seca da raiz.

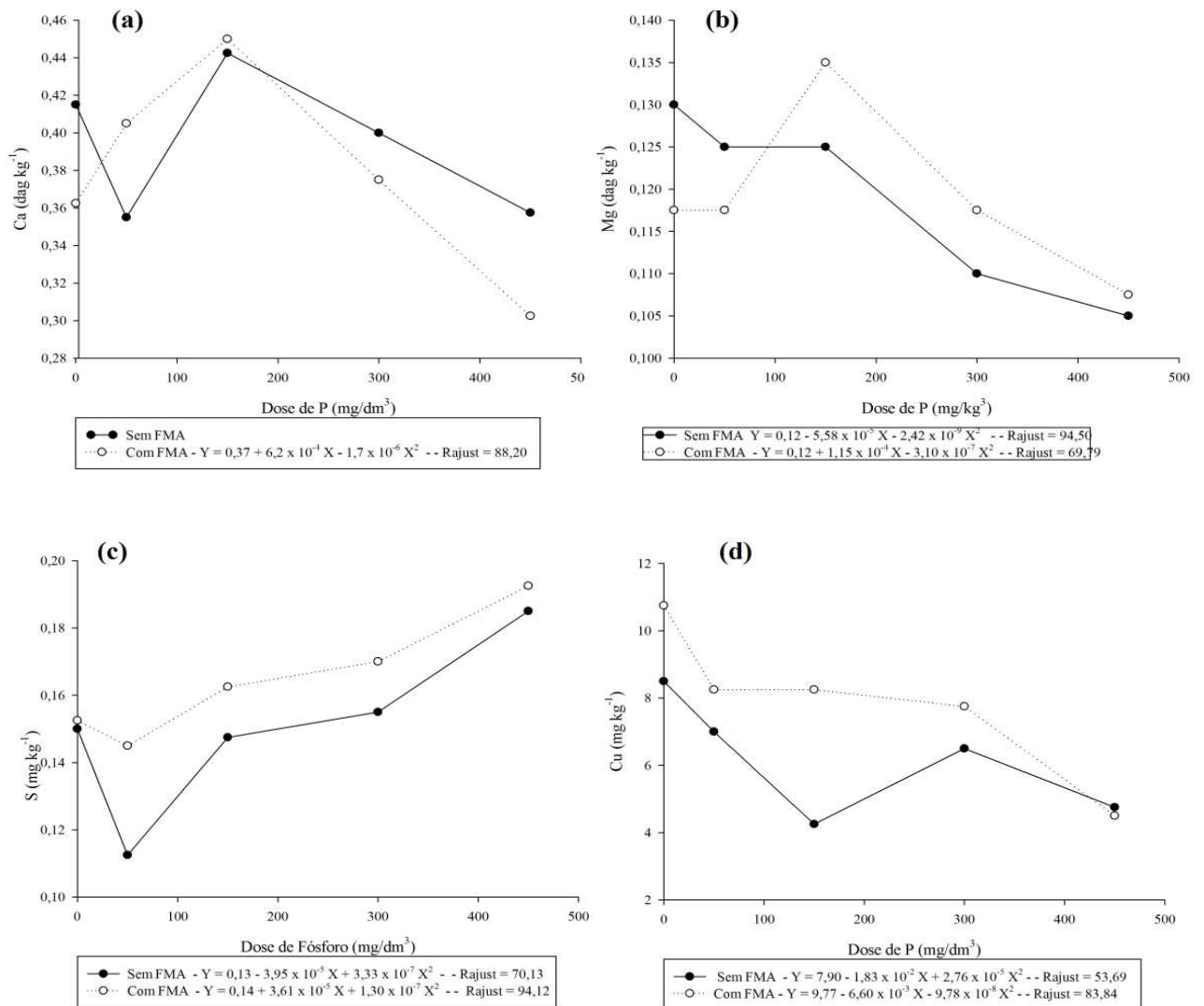
A fertilização com P influenciou o teor de nutrientes na parte aérea das plantas e não houve interação entre dose e inoculação para nenhum dos nutrientes avaliados. O N (média de

2,60 ± 0,25 dag/kg) e Fe (306,45 ± 163,63 mg/kg) não apresentaram diferenças nem para o fator dose de P (D1 = 0, D2 = 50, D3 = 150, D4 = 300 e D5 = 450 mg dm<sup>-3</sup> de solo), nem para o fator inoculação (inoculados ou não com uma mistura de FMA). O P, Zn e Mn não apresentaram diferença para o fator dose, mas apresentaram diferença para o fator inoculação, sendo o P maior no tratamento com FMA, enquanto Zn e Mn foram maiores nos tratamentos sem FMA (Figura 2).



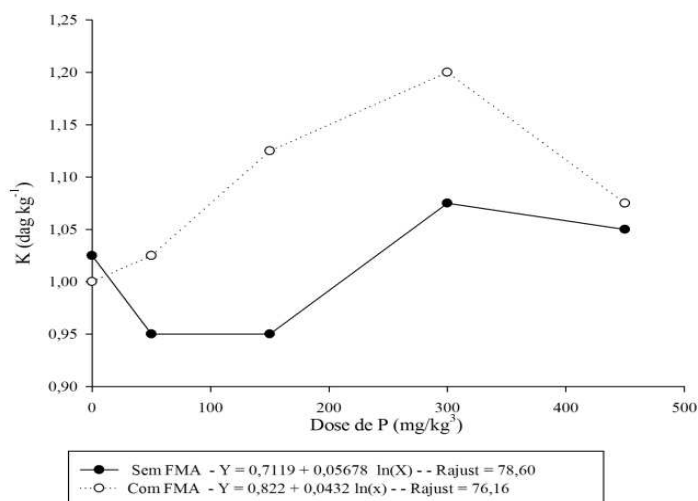
**Figura 2:** Teor de nutrientes (a) P, (b) Zn e (c) Mn na parte aérea de mudas de vinhático após 90 dias de cultivo, fertilizado com P (0, 50, 150, 300 e 450 mg dm<sup>-3</sup> de solo), na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> via solução, inoculados ou não com uma mistura de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

O teor dos nutrientes Ca, Mg, S e Cu apresentaram diferenças para dose e não responderam ao fator inoculação (Figura 3), com exceção do teor Ca sem FMA que não se ajustou bem a nenhum modelo de regressão. A D2 implicou em decréscimo no teor dos referidos nutrientes, sobretudo, quando inoculada com FMA. De modo geral, a partir de D3 (150 mg dm<sup>-3</sup>) Ca, Mg e Cu decresceram com o aumento da dose, enquanto o S teve incremento. O teor de Mg, S e Cu foram maiores nas plantas inoculadas e o teor de Ca foi maior nas plantas não inoculadas.



**Figura 3:** Teor de nutrientes (a) Ca, (b) Mg, (c) S e (d) Cu, na parte aérea de mudas de vinhático após 90 dias de cultivo, fertilizado com P, na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> via solução (0, 50, 150, 300 e 450 mg dm<sup>-3</sup> de solo), inoculados ou não com uma mistura de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

O teor de K apresentou diferença tanto para as doses quanto para a inoculação com FMA (Figura 4). Nas plantas inoculadas houve incremento de K até a D4, seguido por decréscimo na D5. Para as plantas inoculadas com FMA houve decréscimo em D2 e D3 quando comparado a D1, seguido por aumento em D4.



**Figura 4:** Teor de K, na parte aérea de mudas de vinhático após 90 dias de cultivo, fertilizado com P (0, 50, 150, 300 e 450 mg dm<sup>-3</sup> de solo), na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> via solução, inoculados ou não com uma mistura de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

A dependência micorrízica foi alta para D1 (61,3), D2 (69,2), D3 (75,0) e D4 (61,7) e negativa em D5 (-9,90), no qual o crescimento das plantas inoculadas foi equivante ao das não inoculadas. As plantas não apresentaram nódulos em nenhum dos 10 tratamentos.

## Discussão

Estudos sobre o efeito da inoculação de FMA e rizóbio em conjunto com fertilização de mudas arbóreas florestais nativas, são escassos e contribuem para melhor utilização da simbiose, acelerando a produção de mudas de espécies como o vinhático. A resposta de vinhático à fertilização com P quando inoculado com FMA, apresentou comportamento quadrático, indicando que o maior crescimento de plantas ocorre principalmente quando a disponibilidade de P é inferior a dose recomendada de 300 mg dm<sup>-3</sup> (de Freitas *et al.*, 2017). Sabendo que vinhático apresenta alta dependência micorrízica (capítulo 1), recomendam-se doses menores de P, entre 160 a 280 mg dm<sup>-3</sup>, implicando em economia financeira e menor tempo para produção das mudas. As doses maiores de P (> 300 mg dm<sup>-3</sup>) reduzem os benefícios da associação micorrízica, possivelmente porque quando o P está facilmente disponível para as plantas, os FMA podem atuar como um dreno de fotoassimilados (Johnson *et al.*, 1997), conforme verificado na dependência micorrízica negativa em D5 e positiva para as demais doses.

De qualquer modo, os benefícios da inoculação com FMA podem ir além do aumento do crescimento, uma vez que aumenta a tolerância ao estresse biótico e abiótico (Wu *et al.*, 2008; Sikes *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010), aumenta o vigor e teor de nutrientes nos tecidos (Moreira *et al.*, 2015; Goetten *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2016), conforme observado para P, K, Mg, S e Cu. O maior teor de nutrientes nos tecidos é um bom indicativo de mudas saudáveis e podem favorecê-las quando transplantadas para o campo. Embora o teor de nutrientes como Zn, Mn e Ca tenha sido maiores em plantas não inoculadas, é preciso ressaltar que existe um efeito de diluição embutido nas análises, uma vez que a maior absorção de nutrientes pode ser direcionada para produção de biomassa e não em maior concentração de nutrientes nos tecidos da planta (Farzaneh *et al.*, 2011). A inoculação é uma estratégia importante para melhor aproveitamento dos nutrientes nos substratos de cultivo, sobretudo os pouco móveis como P, Zn e Cu (Liu *et al.*, 2000), devido à capacidade que os FMA têm de explorar maior volume (Smith & Read, 2008) e diminuir a lixiviação de nutrientes como o N (Köhl & van der Heijden, 2016), possibilitando o acúmulo nos tecidos da planta.

A ausência de diferenças no teor de N e ausência de nódulos em todos os tratamentos pode ser um indicativo da presença de microrganismo associativos, na rizosfera ou como endofíticos, capazes de promover o crescimento das plantas e suprir parte da demanda de N. Microrganismo tais como rizóbio respondem a heterogeneidade no solo (Wubs & Bezemer; Yusif *et al.*, 2016) e a mudanças nas características físico-químicas dos substratos de cultivo, sobretudo o pH (Yang *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2016). Assim, para maior aproveitamento da simbiose com rizóbio recomenda-se à adequação das características físico-químicas dos substratos de cultivo (capítulo 2) e a seleção de isolados eficientes na fixação biológica de nitrogênio (Araújo *et al.*, 2017). Dentre os fatores físico-químicos, a correção de pH por meio da calagem ( $\text{CaCO}_3$  e  $\text{MgCO}_3$ ) pode ser facilmente avaliada.

Curiosamente, o vinhático pode responder negativamente à calagem (de Freitas *et al.*, 2017), isto pode estar relacionado não apenas a fisiologia da planta, mas a grupos de microrganismo associados que podem responder negativamente a variações no pH (capítulo 1 e 2). Em condições de acidez, comum nos solos onde o vinhático ocorre naturalmente (Pagano *et al.*, 2009; Carvalho, 2009), os íons fosfatos ficam fortemente ligados à fração argila e, conseqüentemente, permanecem pouco disponíveis para as plantas. Deste modo, para o melhor aproveitamento do P presente no solo e/ou substrato, torna-se importante avaliar a resposta da comunidade microbiana associada a vinhático, quando fertilizado com doses de P

e submetido à calagem, em doses mais baixas de calcário (SB < 20 %). Assim, pode-se encontrar um meio de melhorar a fertilidade dos solos e/ou substratos, sem comprometer o papel essencial de microrganismo simbiotes, tais como os FMA e rizóbio.

### **Conclusões**

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) favorecem o crescimento de vinhático em viveiro e possibilitam melhor aproveitamento de P, com dose ótima entre 160 a 280 mg dm<sup>-3</sup>.

### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à FAPEMIG e ao Bioagro (Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária).

### **Referências**

Almeida JPF, U. A. Hartwig, M. Frehner, J. Nosberger, and A. Lu'scher. 2000. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany*, 51:1289-1297.

Araújo KS, de Carvalho F, Moreira FMS. 2017. *Bukholderia* strains promote *Mimosa* spp. growth but not *Macropitium atropurpureum*. *Revista Ciência Agronômica*, 48(1): 41-48.

Braga, J.M.; Defelipo, B.V. 1974. Determinação espectofotométrica de fósforo em extratos de solos e planta. *Revista Ceres*, 21(113): 73-85.

Brandon K, Fonseca GAB, Rylands AB, Silva JMC. 2005. Brazilian Conservation: challenges and opportunities. *Biology*, 19: 595-200.

Brooks TM, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Rylands AB, Konstant WR, Flick P, Pilgrim J, Oldfield S, Magin G, Taylor CH. 2002. Habitat Loss and Extinction in the Hotspots of Biodiversity. *Conservation Biology*, 16(4): 909-923.

Carvalho PER. 2009. Vinhático *Plathymenia reticulata*. Comunicado Técnico.

Clark RB. 1975. Characterization of phosphatases of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 458-460.

Cruz CAF, de Paiva HN, Neves JCL, da Cunha APMC. 2010. Resposta de mudas de *Senna macranthera* (dc. Ex collad.) H.s. Irwin & barnaby (fedegoso) cultivadas em Latossolo VermelhoAmarelo distrófico a macronutrientes. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 13-24.

de Freitas ECS, Paiva HN, Leite HG, Oliveira Neto SN. 2017. Effect of phosphate fertilization and base saturation of substrate on the seedlings growth and quality of *Plathymenia foliolosa* Benth. *Revista Árvore*, 41 (1): 1-8.

de Oliveira MKT, Dombroski JLD, de Medeiros RCA, de Farias RM, Tomczak VE. 2017. Uso de substratos orgânico-minerais na produção de mudas de *Erythrina velutina*. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 37(91): 235-242.

Dias PC, Pereira MSF, Kasuya MCM, de Paiva HN, de Oliveira LS, Xavier A. 2012. Micorriza arbuscular e rizóbios no enraizamento e nutrição de mudas de angico-vermelho. *Revista Árvore*, v.36, n.6, p.1027-1037.

Duarte ML, Paiva HN, Alves MO, Freitas AF, Maia FF, Goulart LML. 2015. Crescimento e qualidade de mudas de vinhático (*Platymenia reticulata* Benth.) em resposta à adubação com potássio e enxofre. *Ciência Florestal*, 25: 221-229.

EMBRAPA. 1994. Atlas do meio ambiente do Brasil. Brasília. Ed. Terra Viva.

Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária – Embrapa. 1999. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Rio de Janeiro, 370p.

Farzaneh M, Vierheilig H, Lössll A, Kaul HP. 2011. Arbuscular mycorrhiza enhances nutrient uptake in chickpea. *Plant and Environment*, 57(10): 465-470.

Ferreira PA, Boscolo D, Carvalheiro LG, Biesmeijer JC, Rocha PLB, Viana BF. 2015. Responses of bees to habitat loss in fragmented landscapes of Brazilian Atlantic Rainforest. *Landscape Ecology* 30: 2067-2078.

Ferreira TC, Aguilar JV, Souza LA, Justino GC, Aguiar LF, Camargo LS. 2016. pH effects on nodulation and biological nitrogen fixation in *Calopogonium mucunoides*, 39(4): 1015-1020.

Goetten LC, Moretto G, Stürmer SL. 2016. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum produced on-farm and phosphorus on growth and nutrition of native woody plant species from Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 30 (1): 9-16.

Jesus EC, Schiavo JA, Faria SM. 2005. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. *Árvore* 29: 545-552.

Johnson NC, Graham JH, Smith FA. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*;135:575–585.

Johnson, CM, Ulrich A. 1959. Analytical methods for use in plants analyses. Los Angeles: University of California, Bulletin 766: 32-33.

Johnson NC, Wilson GWT, Bowker M, Wilson J, Miller RM, 2010. Resource limitation is a driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 2093-2098.

Köhl L, van der Heijden MGA. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal species differ in their effect on nutrient leaching. *Soil Biology & Biochemistry*, 94: 191-199.

Lacerda DR, Acedo MDP, Lemos Filho JP, Lovato MB. 2001. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymania reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Molecular Ecology*, 10: 1143-1152.

Lacerda DR, Lemos Filho JP, Macedo MDP, Lovato MB. 2002. Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymania foliolosa* and *P. reticulata* (Mimosoideae), inferred using RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution*, 235: 67-77.

Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, First Edition, John Wiley & Sons Inc, New York, pp. 115-175,

Liu A, Hamel C, Hamilton RI, Ma L, Smith DL. 2000. Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. *Mycorrhiza* 9 (6): 331-336.

Lorenzi H. 1992. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa-SP, Editora Plantarum. 352p.

Machado RB, Ramos Neto PE, Caldas DE, Gonçalves D, Santos N, Tabor K, Steininger M. 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. *Conservation International do Brasil*. Brasília, 22p.

Machineski O, Balotal EL, Colozzi Filho A, Andrade DS, de Souza JRP. 2009. Growth responses of peroba rosa seedlings due to arbuscular mycorrhizal fungi inoculation. *Ciência Rural*, 39(2):567-570.

Moreira BC, Mendes FC, Mendes IR, Paula TA, Prates Junior P, Salomão LCC, Stürmer SL, Otoni WC, Guarçoni M A, Kasuya MCM. 2015. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* improves the growth and nutrient uptake in micropropagation-derived pineapple plantlets. *Scientiae Horticulturae*, 197: 183-192.

Moreira SLS, Prates Júnior P, Fernandes RBA, da Cunha ACMM, Campo ANR. 2016. Growth and nutrients uptake in *Euterpe edulis* Martius inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46 (2):169-176.

- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Neeraj KS. 2011. Organic amendments to soil inoculated arbuscular mycorrhizal fungi and *Pseudomonas fluorescens* treatments reduce the development of root-rot disease and enhance the yield of *Phaseolus vulgaris* L. *European Journal of Soil Biology*, 47: 288-295.
- Pagano MC, Scotti MR, Cabello MN. 2009. Effect of the inoculation and distribution of mycorrhizae in *Plathyenia reticulata* Benth under monoculture and mixed plantation in Brazil. *New Forests* 38 (2): 197-214.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature*, 6:763-75,
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *T Brit Mycol Soc* 55:158-161
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil* 70: 199-209.
- Revillini D, Gehring CA, Johnson NC. 2016. The role of locally adapted mycorrhizas and rhizobacteria in plant-soil feedback systems. *Functional Ecology* 30: 1086-1098.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. 142: 1141-1153.
- Rockström J, Stefen W, Noone K, Persson A, Chapin FS, Lambin EF, Lenton TM Scheffer M, Folke C, Schellnhuber HJ et al. 2009. A safe operating space for humanity. *Nature*, 461: 472-475.
- Santos JZL, Resende AV, Furtini Neto AE, Corte EF. 2008. Growth, phosphorus accumulation and p fractions in seedlings of seven native tree species. *Revista Árvore*, 32 (5): 799-807.
- Schaad NW. 1998. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2. ed., St. Paul: American Phytopathological Society. 164p.
- Scheublin TR, Ridgway KP, Young JPW, van der Heijden MGA. 2004. Nonlegumes, legumes, and root nodules harbordifferent arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied Environment Microbiology*, 70, 6240–6246

Sikes BA, Cottenie K, Klironomos JN. 2009. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. *Journal of Ecology*, 97: 1274-1280.

Smith SE and Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Edition, Academic Press, London.

van der Putten WH, Bardgett, R. D., Bever, J. D., Bezemer, T. M., Casper, B. B., Fukami, T., Kardol, P., Klironomos, J. N., Kulmatiski, A., Schweiter, J. A., Suding, K. N et al. 2013. Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology*, 101: 265-276, 2013.

Vincent JM. 1970. *A practical manual for the study of root-nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publishers. Ltd. P. 164 International Biological Program Handbook 15.

Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM. 1997. Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277: 494-499.

Warwick MC, Lewis GP. 2003. Revision of *Plathymentia* (Leguminosae - Mimosoideae). *Edinb. J. Bot.* 60:111- 119

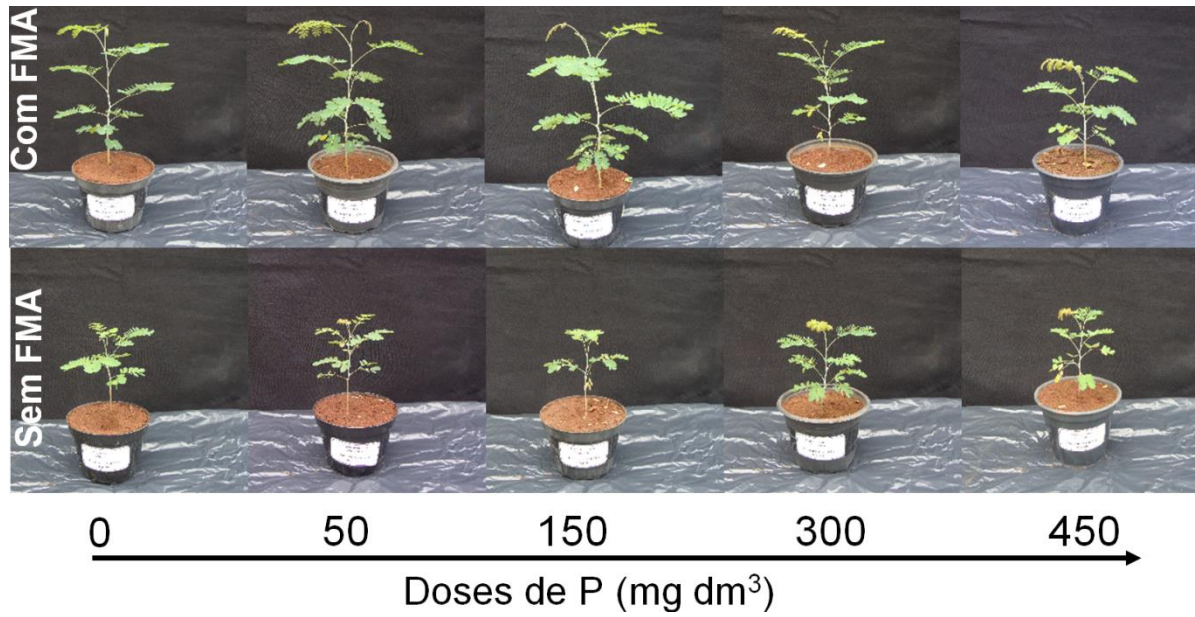
Wu Q-S, Xia R-X, Zou Y-N. 2008. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European J. Soil Biol.*, 44: 122–128.

Wubs JER, Bezemer M. T. 2016. Effects of spatial plant-soil feedback heterogeneity on plant performance in monoculture. *Journal of Ecology*, 104, 364-376.

Yang SS, Bellogín RA, Buendía A, Camacho M, Chen M, Cubo T, Daza A, Díaz CL, Espuny MR, Gutiérrez R, et al. 2001. Effect of pH and soybean cultivars on the quantitative analyses of soybean rhizobia populations. *Journal of Biotechnology*, 91(2): 243-255.

Yusif, S.A.; Muhammad, I.; Hayatu, N. G.; Sauwa, M. M.; Tafinta, I. Y.; Mohammed, M. A.; Lukman, M. A.; Abubabar, G. A.; Hussain, A. M. 2016. Effects of Biochar and Rhizobium Inoculation on Selected Soil Chemical Properties, Shoot Nitrogen and Phosphorus of Groundnut Plants (*Arachis hypogaea* L.) in Sokoto State, Nigeria. *Journal of Applied Life Sciences International*, 9(2): 1-9.

## Material Suplementar



**Figura suplementar 1:** Doses de P (0, 50, 150, 300 e 450  $\text{mg dm}^{-3}$  de solo) e inoculação com uma mistura de três espécies de FMA, no crescimento de vinhático após 90 dias de cultivo.

## **CAPÍTULO 4: *Plant-soil feedback* positivo no crescimento de mudas de braúna (*Melanoxylon brauna* Schott)**

### **Resumo**

Braúna (*Melanoxylon brauna* Schott, Fabaceae) é endêmica do bioma Mata Atlântica e está ameaçada de extinção, além de apresentar baixa sobrevivência em condições de viveiro. Esta planta pode ter sobrevivência e crescimento relacionado à dependência por microrganismo do solo, à luz do *plant-soil feedback* positivo e/ou associação com fungos micorrízicos. Este estudo objetivou avaliar a sobrevivência e crescimento de mudas de braúna cultivadas em três tipos de substratos, com ou sem a inoculação de fungos micorrízicos (FM): 1 - substrato comercial (Sub), 2 - solo de uma planta adulta de braúna esterilizado (Ste), 3 - solo de uma planta adulta de braúna (Nat). A inoculação foi com fungos micorrízicos (FM) e incluiu três espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA: *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Gigaspora albida*) além de *Piriformospora indica*. A sobrevivência foi maior no solo de uma planta adulta de braúna (76,7 %) que no solo esterilizado (36,7 %) e substrato comercial (56,7 %). As mudas cresceram mais em Nat que em Sub e a inoculação com FM não aumentou seu crescimento, durante os 180 dias. A análise de *amplicons* para fungos (ITS) e bactérias e archaeas (16S) demonstrou que os substratos de cultivo apresentam comunidades distintas e que a inoculação com FM altera a composição da comunidade microbiana. Braúna tem *plant-soil feedback* positivo e durante a fase de viveiro os FM inoculados não promovem seu crescimento.

**Palavras-chave:** Mata Atlântica, Fungos micorrízicos arbusculares, *Piriformospora indica*, rizóbio, substratos.

### **Introdução**

O desmatamento e a fragmentação florestal são grandes problemas para o bioma Mata Atlântica, o qual é considerado prioritário para conservação devido sua alta biodiversidade e endemismo (Myers *et al.*, 2000). Entretanto, este *hotspot* encontra-se com menos de 12% (Ribeiro *et al.*, 2009) da sua área original devido a ações antrópicas como a expansão agrícola e urbana e a exploração minerária e madeireira. A fragmentação contribui muito para a perda de indivíduos e diminuição do fluxo gênico (Ferreira *et al.*, 2015) e, conseqüentemente pode acarretar na extinção de espécies.

Dentre as espécies da flora brasileira ameaçada de extinção, merece destaque a braúna (*Melanoxylon brauna* Schott), pertencente à família Fabaceae (subfamília Caesalpinioideae

(IBAMA, 2014), outrora de ampla ocorrência natural no Bioma Mata Atlântica como espécie secundária inicial a tardia. A intensa exploração, devido suas características comerciais, associada ao desmatamento e ausência de replantios reduziu a população e a área de ocorrência da espécie. A madeira da braúna é de alta densidade, escura (quase negra), durável e de alto valor econômico (Borges *et al.*, 2014), usada em obras externas e hidráulicas e na confecção de instrumentos musicais (Borges *et al.*, 2012). É uma das mais duras e incorruptíveis madeiras brasileiras, sendo adequada em obras externas na construção civil (Lorenzi, 1992), devido a longa duração, e fabricação de móveis de luxo.

Indivíduos de braúna estão isolados em pequenos fragmentos florestais, principalmente naqueles em estágio avançado de regeneração (da Silva *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2007; Crepaldi & Peixoto, 2010; Versieux *et al.*, 2011), o que dificulta o fluxo gênico. Assim, torna-se necessário o repovoamento e o estabelecimento de processos de restauração florestal que permitam o aumento das populações, por meio de obtenção de mudas em quantidade e qualidade. Entretanto, a braúna tem crescimento muito lento e muitas vezes não sobrevive após a germinação em condições de viveiro (A. Xavier inf. pessoal). Essa limitação pode estar associada à ausência de microrganismo simbioses nos substratos de cultivo.

O longo processo evolutivo entre plantas e microrganismo possibilitou coadaptações e o desenvolvimento de interdependências (Siqueira & Saggini-Júnior, 2001; Zangaro *et al.*, 2003) que influenciam o *fitness* de plantas. O processo no qual plantas são hábeis em crescer em solos previamente ocupados por membros da sua espécie é reconhecido como *plant-soil feedback* positivo – PSF positivo (van Breemen & Finzi, 1998; van der Putten *et al.*, 2013; Cortois *et al.*, 2016), uma vez que o solo funciona como um repositório da microbiota rizosférica. Estes microrganismo envolvidos no PSF positivo, a exemplo de rizóbios, fungos promotores de crescimento e fungos micorrízicos arbusculares, influenciam a aquisição de nutrientes como nitrogênio e fósforo (Revillini *et al.*, 2016; García-Parisi *et al.*, 2017) e atuam no controle de fitopatógenos (Das *et al.*, 2017) e alívio do estresse abiótico (Lenoir *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Yanni *et al.*, 2016). O solo de uma planta adulta da mesma espécie funciona como “banco de sementes” da microbiota rizosférica, podendo modular a sobrevivência e crescimento de coespecíficos juvenis.

Em termos de produção de mudas de espécies com maior dependência de simbioses a inoculação é uma estratégia relevante. Os rizóbios são facilmente cultiváveis em meios de cultura e estabelecem interações com leguminosas e desempenham papel ecológico e econômico de grande importância (Graham & Vance, 2003; Olivares *et al.*, 2013),

possibilitando a sobrevivência e o crescimento de plantas de interesse agrícola ou florestal (Fonseca *et al.*, 2010; Yusif *et al.*, 2016). Os rizóbios podem ser inoculados juntamente com FMA, formando simbiose tripartite (Ossler *et al.*, 2015; Omirou *et al.*, 2016) e algumas espécies de Fabaceae como *Piptaderia gonocantha* e *P. paniculata* dependem de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) para a nodulação radicular por rizóbios e crescimento satisfatório (Jesus *et al.*, 2005). Entretanto, para algumas espécies de plantas a simbiose com FMA é facultativa (Molina *et al.*, 1992) ou mesmo parasitária quando os fungos drenam fotoassimilados e não conferem benefícios à hospedeira (Johnson *et al.*, 1997).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são endossimbiontes obrigatórios de raízes de plantas (Parniske, 2008) que ocorrem naturalmente nos solos e aumentam a absorção de água e nutrientes devido as hifas externas que funcionam como extensões do sistema radicular das plantas (Smith & Read, 2008). O aumento do volume de solo explorado implica em aumento do crescimento das plantas e espécies florestais e agrícolas em condições de viveiros associadas aos FMA, as quais mostram-se vigorosas, uniformes, apresentam maior crescimento, melhor estado nutricional e adaptação a condições de estresse hídrico ou salínico (Wu *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2016) e podem se estabelecer melhor quando transplantadas para o campo.

Os FMA podem ser inoculados com o fungo promotor de crescimento de plantas, *Piriformospora indica* (Basidiomycota, Sebaciales, Sebacinaceae), que apresenta muitas características semelhantes às encontradas nos FMA (Oelmüller *et al.*, 2009; Selosse *et al.*, 2009; Varma *et al.*, 2012), a exemplo da colonização do córtex radicular, com a vantagem de ser cultivável em meios de cultura. A inoculação com *P. indica* promove o crescimento de plantas (Kumar & Rao, 2012; Tripathi *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2015; Moreira *et al.* 2016) e aumento da tolerância as condições de estresse biótico e abiótico (Waller *et al.*, 2005; Oelmüller *et al.*, 2009; Varma *et al.*, 2012; Gill *et al.*, 2016).

Diante disto, nosso objetivo foi avaliar a presença de microrganismo simbiotes provenientes do solo de plantas adultas da mesma espécie e a inoculação com fungos micorrízicos (FM) para a sobrevivência e crescimento de braúna em condições de viveiro.

## **Material e métodos**

### **Obtenção de sementes e substratos**

As sementes de braúna foram obtidas com a SIF (Sociedade de Investigações Florestais) e desinfestadas superficialmente com etanol a 70 % por 30 s e hipoclorito de sódio

(2,5 %, v:v) por 10 min., com lavagens sucessivas em água esterilizada, em condições assépticas. As sementes foram transferidas para placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada e esterilizada, posteriormente incubadas por sete dias à temperatura ambiente e quando pré-geminadas foram selecionadas e transferidas para os vasos de cultivo.

O solo proveniente de uma planta adulta de braúna foi obtido no município de Leopoldina-MG (S 21° 33' 708", W 42° 36' 003", 273 m de altitude), área de pastagem com *Urochloa* sp., nas proximidades (raio de 2 m) de uma planta adulta, na camada de 0-20 cm de profundidade, em pontos distribuídos aleatoriamente para obtenção de uma amostra composta. As amostras de solos foram peneiradas em campo, homogeneizadas e armazenadas. A esterilização foi realizada em autoclave por uma hora a 121 °C por duas vezes em intervalo de dois dias e mantidos em repouso por 15 dias. O substrato comercial (Tropstrato Florestal, Vidaverde®) utilizado foi à base de casca de pinus e vermiculita expandida, acrescida de macro e micronutrientes.

As características químicas e granulométricas dos substratos de cultivo (Sub, Ste e Nat) são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Características químicas e granulométricas dos substratos de cultivo. Sub corresponde ao substrato comercial, Nat ao solo natural de uma planta adulta de braúna e Ste ao solo esterilizado de uma planta adulta de braúna.

Amostra	pH	P	K	SB	CTC (T)	CTC (t)	m	P-rem	Classe textural
	H <sub>2</sub> O	Mg dm <sup>-3</sup>			cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>		%	mg L <sup>-1</sup>	
Sub	5,64*	nd	nd	nd	58,1*	S/I	S/I	S/I	S/I
Est	4,40	3,1	130	4,44	11,94	5,13	13,5	36,8	Argila-arenosa
Nat	4,39	5,8	128	3,37	12,57	4,46	15,5	26,6	Argila

Extratores utilizados: P, K = Extrator Mehlich 1; pH em água, relação 1:2,5; SB= soma de bases trocáveis; CTC (T) = Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0; m = índice de saturação de alumínio. nd = não determinado. \*O pH e a CTC do substrato comercial foram determinados na relação 1:5 (v:v) em água a pH 7.

### Obtenção de inoculantes de FMA, *Piriformospora indica* e rizóbio

Os isolados de fungos micorrízicos arbusculares, *Claroideoglossum etunicatum* RJN101A (= *Glomus etunicatum*), *Rhizophagus clarus* RJN102A (= *Glomus clarum*) e *Gigaspora albida* PRN201A foram obtidos da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG, www.furb.br/cicg) da Universidade Regional de Blumenau (FURB), Santa Catarina, Brasil. Os isolados foram multiplicados em solo:areia (1:1, v:v) cultivados com braquiária (*Urochloa brizantha* Hochst Stapf). O isolado de *Piriformospora indica* foi proveniente da cultura *in vitro* da coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas da

Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais, mantido e multiplicado periodicamente em meio KM e armazenado no escuro a 30 °C (Kumar *et al.*, 2011).

O isolado de *Bradyrhizobium* sp. foi obtido a partir de nódulos de uma planta de braúna, crescendo em viveiro do IEF (Instituto Estadual de Florestas, Minas Gerais, Brasil). O nódulo foi desinfestado superficialmente em etanol a 70 % por 30 s, seguido por imersão em hipoclorito de sódio a 2 % por 10 min e lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada. O nódulo foi pressionado com uma pinça sobre a placa de Petri com meio de cultura YMA com vermelho Congo (Vincent, 1970), pH 6,9, incubadas a 25 °C, seguido por repicagem para obtenção de colônias isoladas. A colônia foi repicada após a confirmação da pureza e preservadas a -80 °C em meio NBY (Schaad, 1998). O isolado teve o DNA extraído com o kit Nucleo Spin<sup>®</sup> Soil (Macherey-Nagel), a partir de células cultivadas em três dias em meio de cultivo YMA. Para a amplificação parcial do gene 16S rRNA, foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991). O resultado do sequenciamento foi comparado a sequências depositadas no GenBank (NCBI) por meio da ferramenta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **Desenho experimental e inoculação**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições e arranjo fatorial (3x2), sendo três tipos de substrato de cultivo: 1) solo da área de influência de uma planta adulta = Nat, 2) solo da área de influência de uma planta adulta esterilizado = Ste, 3) substrato comercial = Sub, inoculadas (+) ou não (-) com uma mistura de FMA (*C. etunicatum*, *R. claru* e *G. albida*) e o fungo *P. indica*. A esterilização do solo foi realizada em autoclave por uma hora a 121 °C, por duas vezes, em intervalo de dois dias e, mantidos em repouso por 15 dias.

As plântulas previamente germinadas foram embebidas em meio YM com rizóbio por 10 min e, em seguida, foram transferidas para o substrato de cultivo, contido em vasos com capacidade de um litro, juntamente com os inóculos de fungos micorrízicos, solo contendo 200 esporos de FMA e quatro discos de meio KM, de 100 mm de diâmetro, contendo micélio e clamidósporos de *P. indica*.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 180 dias, com a umidade do solo mantida próximo à capacidade de campo.

### **Medidas de crescimento, dependência micorrízica e nodulação**

Foram avaliadas a sobrevivência, número de folhas (NF) diâmetro do caule (D) a 1,5 cm do solo, altura (H), matéria fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea e matéria fresca (MFRA) e seca (MSRA) da raiz. A MSPA e MSRA foram determinadas após secagem até peso constante a 70 °C em estufa com ventilação forçada. Também foram coletadas raízes finas aleatoriamente para avaliação da colonização micorrízica.

A dependência micorrízica (DM) foi determinada utilizando a equação:  $(DM) = \{(massa\ seca\ total\ de\ plantas\ inoculadas - massa\ seca\ total\ de\ plantas\ não\ micorrizadas) / (massa\ seca\ total\ de\ plantas\ inoculadas)\} \times 100$  (Plenchette *et al.*, 1983). Os dados referentes à dependência micorrízica foram considerados: >75 % = dependência excessiva, 50-75% = dependência alta, 25-50% = dependência moderada, <25% dependência baixa.

### **Colonização micorrízica**

As amostras de raízes, após lavagem em água corrente, foram cortadas em comprimentos de 1 a 2 cm e armazenadas e conservadas em solução de álcool, formol e ácido acético (90:5:5, v:v:v) foram lavadas, diafanizadas com KOH 10 % (p:v) por aquecimento em banho-maria a 90 °C por 1,5 h e tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (10 min). Logo após foram imersas em KOH 10% (p:v) por 12 h, com sucessivas lavagens em água e acidificação com HCl 1% (v:v) por 5 min, coradas com azul de tripano 0,05 % em lactoglicerol (v:v) por 12 h a temperatura ambiente (adaptado de Phillips & Hayman, 1970). Realizada a coloração, as raízes foram armazenadas em lactoglicerol (p:v) (Brundrett *et al.*, 1996). A percentagem de colonização micorrízica foi estimada pelo método de contagem em placa quadriculada, conforme a presença de estruturas fúngicas (arbúsculos, hifas, vesículas e esporos) observada sob microscópio estereoscópio (Giovannetti & Mosse, 1980).

### **Avaliação do perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de braúna**

O perfil da comunidade microbiana dos três substratos de cultivo inoculados ou não com fungos micorrízicos foi avaliado pela técnica de sequenciamento de *amplicon*, Illumina®. Uma amostra composta dos substratos foi obtida da camada de 0-5 cm dos vasos, após 90 dias de cultivo, com seis repetições para cada um dos seis tratamentos, totalizando 36 unidades amostrais. O DNA total das amostras foi extraído com o kit Nucleo Spin® Soil (Macherey-

Nagel) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram encaminhadas para o sequenciamento de amplicon das regiões 16S e ITS1 do rDNA de Bactérias/Archaeas e Fungos, respectivamente, por meio da plataforma Illumina® MiSeq (Illumina Inc.) (Bactéria e Archaea = MiSeq 151X151 Cycle Run e Fungos = MiSeq 250X250 Cycle Run) na empresa Argonne National Laboratory (ANL), Estados Unidos. As sequências obtidas foram analisadas pelo programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology Software (QIIME v.1.8.0), utilizando os parâmetros do protocolo desenvolvido pelo Brazilian Microbiome Project (BMP) para as regiões 16S e ITS1. As sequências com similaridade maior que 97 % foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e a taxonomia foi atribuída às OTU utilizando o UNITE como o banco de dados de referência.

Foi realizada uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada nas matrizes de dissimilaridade entre os tratamentos (Matriz de Bray-Curtis) para avaliar diferenças na composição entre os seis tratamentos (fatorial 3x2). Os *Heatmap* foram realizados para avaliar a abundância relativa dos gêneros em cada tratamento.

### **Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) com  $\alpha$  de 5 % de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando o software R. Os dados relacionados à colonização micorrízica foram previamente normalizados via  $\arcsen\sqrt{(x/100)}$  para realização da ANOVA. Os dados relacionados à colonização micorrízica foram previamente normalizados via  $\arcsen\sqrt{(x/100)}$  para realização da ANOVA. Para descrever os índices de diversidade (Riqueza, Chao1, Shannon e Equitabilidade) foi utilizado o pacote Biodiversity do R e a PCoA e *Heatmap* foram realizadas com o pacote Vegan (Oksanen *et al.*, 2015).

## **Resultados**

### **Sobrevivência das plantas e medidas de crescimento**

As plantas cultivadas em Nat, com FM (60 %) ou sem FM (93,33 %), apresentaram maior sobrevivência, seguidas das cultivadas em Sub, com FM (73,33 %) e sem FM (40 %), e em Ste, com FM (53,33 %) ou sem FM (20 %).

Não houve interação entre os fatores inoculação e substrato de cultivo. A inoculação com FM não afetou o crescimento de braúna. As plantas cultivadas em Nat apresentaram

maior NF (158 %), H (120 %), D (309 %), MFPA (287 %), MFRA (345 %), MSPA (287 %) e MSRA (289 %) que aquelas cultivadas em Sub (Tabela 2). As plantas cultivadas em Nat apresentaram maior MFRA (255 %) e MSRA (268 %) que o solo esterilizado (Ste) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Crescimento vegetativo de braúna entre os três tipos de substrato: 1) substrato comercial = **Sub**, 2) solo da área de influência de uma planta adulta esterilizado = **Ste**, 3) solo da área de influência de uma planta adulta = **Nat**, após 180 dias de cultivo em casa de vegetação.

Medidas de crescimento*			
	Sub	Ste	Nat
NF	5,167 B	9,229 A	8,163 A
H (cm)	11,179 B	11,063 AB	13,374 A
D (mm)	0,377 B	0,839 AB	1,164 A
MFPA (g)	0,164 B	0,326 AB	0,471 A
MFRA (g)	0,139 B	0,188 B	0,480 A
MSPA (g)	0,164 B	0,326 AB	0,471 A
MSRA (g)	0,064 B	0,069 B	0,185 A

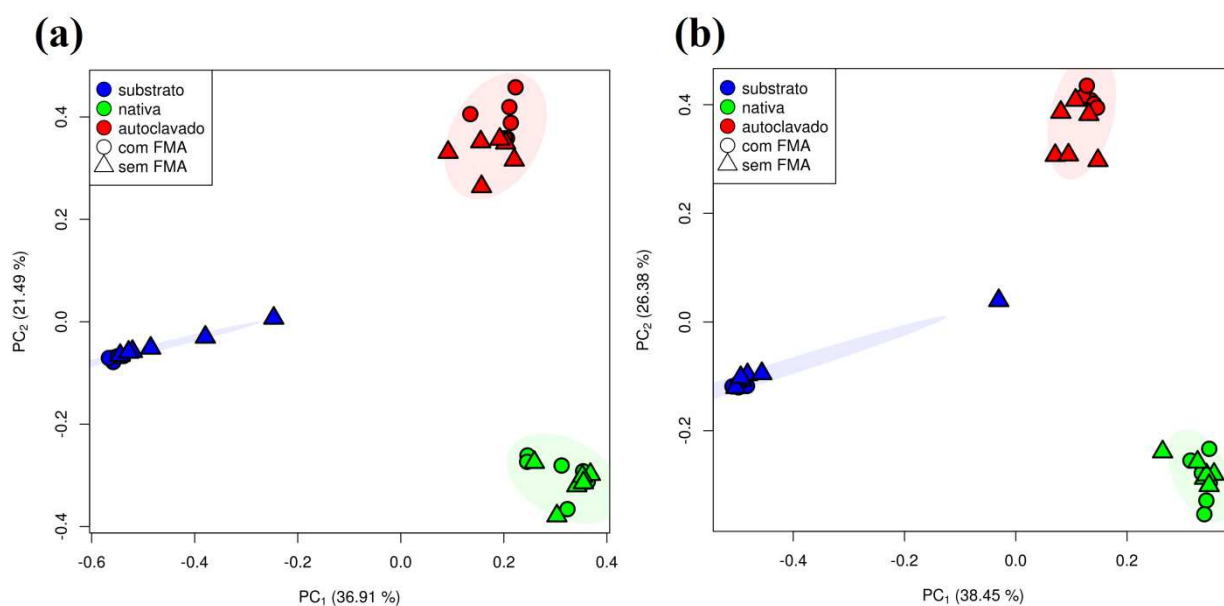
NF= número de folhas; D = diâmetro do caule; H = altura da planta; MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; MFRA =matéria fresca da raiz; MSRA = matéria seca da raiz. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Dependência micorrízica, colonização micorrízica e nodulação**

A dependência micorrízica foi negativa para todos os tratamentos: Sub (-41,7), Ste (-73,1) e Nat (-18,7). A porcentagem de colonização micorrízica foi pouco significativa e não houve diferença estatística, sendo maior em Nat (2,2) que em Sub (0,6) e inexistente em Ste (0,0). As plantas não apresentaram nodulação radicular por rizóbios em nenhum dos seis tratamentos.

### **Perfil da comunidade de Fungos, Bactérias e Archaeas nos substratos de cultivo de braúna**

A PCoA revelou que as amostras provenientes de cada um dos três substratos diferiram entre si, formando agrupamentos distintos tanto para fungos (ITS; Figura 01 a), quanto para bactérias e archaeas (16S; Figura 01 b) e as amostras inoculados ou não inoculados ficaram próximas entre si dentro de cada tratamento, com as amostras não inoculadas mais dispersas comparadas as inoculadas.



**Figura 1:** Diagrama de ordenação das OTU de braúna, produzido pela análise de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), representando a distribuição de cada amostra, baseada na matriz de dissimilaridade Bray-Curtis. Os pontos mais próximos entre si apresentam maior similaridade, sendo (a) região ITS para fungos e (b) região 16S para bactérias e archaeas. As amostras em azul correspondem ao substrato comercial (**Sub**), vermelho ao solo da área de influência de uma planta adulta esterilizado (**Ste**) e solo da área de influência de uma planta adulta (**Nat**), sendo os círculos as amostras inoculadas com FM e triângulo as amostras não inoculadas.

Os índices de diversidade mostraram que a comunidade fúngica (ITS) foi mais rica e diversa em Nat > Ste > Sub, não havendo diferença para o fator inoculação de FM (Tabela 2). Para bactéria e archaea (16S) a riqueza e a diversidade foram Sub > Nat > Ste, não havendo diferença para o fator inoculação (Tabela 2).

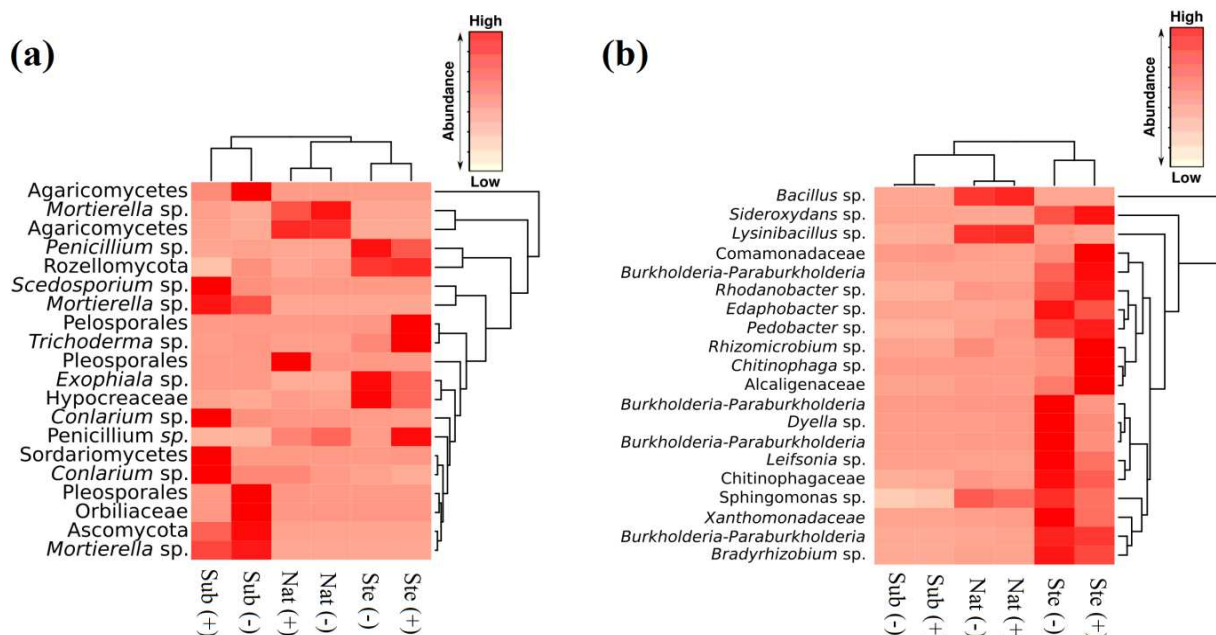
**Tabela 2:** Índices de diversidade para OTU dos substratos de cultivo de braúna para fungos (ITS) e bactérias/archaea (16S), sendo 1) substrato comercial = **Sub**, 2) solo da área de influência de uma planta adulta esterilizado = **Ste**, 3) solo da área de influência de uma planta adulta = **Nat**, com ou sem a inoculação de fungos micorrízicos (FM).

Substrato	ITS				
	Cobertura	Riqueza	Chao1	Shannon	Equitabilidade
Sub	0,95	42,33 C	4,08 C	2,72 C	0,50 A
Ste	0,98	66,25 B	4,71 B	3,35 B	0,55 A
Nat	0,99	149,33 A	5,57 A	3,92 A	0,54 A
Inoculação					
Com FM	0,98	84,06 A	4,71 A	3,37 A	0,54 A
Sem FM	0,98	87,89 A	4,86 A	2,28 A	0,52 A

<b>16S</b>					
<b>Substrato</b>	Cobertura	Riqueza	Chao1	Shannon	Equitabilidade
Sub	0,96	2139 <b>A</b>	2936 <b>A</b>	9,44 <b>A</b>	0,85 <b>A</b>
Ste	0,99	909 <b>C</b>	1219 <b>C</b>	7,28 <b>C</b>	0,74 <b>C</b>
Nat	0,97	1702 <b>B</b>	2421 <b>B</b>	8,41 <b>B</b>	0,78 <b>B</b>
<b>Inoculação</b>					
Com FM	0,97	7,29 <b>A</b>	4,71 <b>A</b>	8,36 <b>A</b>	
Sem FM	0,97	7,29 <b>A</b>	4,86 <b>A</b>	8,34 <b>A</b>	0,79 <b>A</b>

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O *Heatmap* demonstrou a abundância de grupos mais abundantes para fungos (ITS; Figura 2 a) e para bactérias e archaeas (16S; Figura 2 b) para cada um dos seis tratamentos. A inoculação conduziu a algumas alterações nos táxons mais abundantes da comunidade microbiana. O substrato comercial (Sub) apresentou abundância de grupos de fungos reconhecidos com saprofíticos, a exemplo de *Mortierella*, *Sardariomycetes* e *Orbilaceae*. O solo esterilizado (Ste) inoculado com FM apresentou a ocorrência de *Thichoderma*, *Exophiala* e *Conlarium* que são encontrados como endofíticos. Para bactérias Ste apresentou abundância de grupos de reconhecidas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) e outras com potencial patogênico. O solo natural (Nat) apresentou abundância de *Mortierella* que atua como saprofítico e *Pleosporales* que agrupa alguns endofíticos e parasitas. Para Nat os grupos de bactérias mais abundantes são reconhecidos como PGPR, *Lysinibacillus* e *Sphingomonas*.



**Figura 2:** Heatmap e agrupamento (Matriz de Bray-Curtis), representando os táxons mais abundantes dos substratos de cultivo de braúna, sendo (a) região ITS para fungos e (b) região 16S para bactérias e archaeas. Sendo o substrato comercial (Sub), o solo da área de influência de uma planta adulta esterilizado (Ste) e solo da área de influência de uma planta adulta (Nat). O sinal de (+) são as amostras inoculadas com fungos micorrízicos (FM) e o (-) as amostras não inoculadas.

## Discussão

O presente trabalho aumentou o entendimento sobre o papel da diversidade microbioma e funcionamento da simbiose de braúna com microrganismo, na perspectiva de *plant-soil feedback* (PSF) positivo (Cortois *et al.*, 2016), demonstrando que a sobrevivência e o crescimento de braúna é maior quando cultivada em associação com microrganismo que coexistiram previamente no solo de uma planta adulta da mesma espécie. A inoculação com fungos micorrízicos (FM), não aumentou o crescimento de braúna, mas favoreceu a sobrevivência em substrato comercial (Sub) e solo esterilizado (Ste), condições nas quais os simbiontes benéficos são escassos ou inexistentes, indicando que para esses tratamentos a inoculação aumenta a sobrevivência de braúna. De início é preciso reconhecer que microrganismo simbiontes como FM, desempenham papéis chave para o sucesso ecológico, possibilitando a proteção e o crescimento de plantas (Selosse *et al.*, 2004; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015), sobretudo em condições de estresse abiótico como pH desfavorável ou ausência de outros simbiontes.

A inoculação de FM em Nat implicou em menor sobrevivência das plantas, evidenciando que a inoculação com FM pode alterar a microbiota nativa e desfavorecer a sobrevivência de braúna, pelo menos com as espécies inoculadas. A competição entre FM e

outros microrganismo pode modular o crescimento de plantas (Facelli *et al.*, 2010), assim, a inoculação pode afetar negativamente o crescimento das mesmas. Além disso, o indicativo é que braúna não seja uma planta micorrízica, devido à baixa percentagem de colonização, tanto nos tratamentos inoculados quanto não inoculados. A família Fabaceae apresenta algumas espécies não micorrízicas, a exemplo de *Daviesia* spp. e *Kennedia* spp (Brundrett & Abbott 1991) e espécies não micorrízicas podem ser afetadas negativamente pela presença de FMA por mecanismos como parasitismo e alelopatia (Hoeksema *et al.*, 2010; Veiga *et al.*, 2012). Nem mesmo os inóculos nativos da área de influência de uma planta adulta da mesma espécie, estimado em 789 por 100 mL de solo, possibilitou o aumento da colonização.

A dependência micorrízica negativa reforça o argumento que braúna não é micorrízica, assim pode ter maior dependência por outros microrganismo simbiotes, a exemplo de fungos dark septate (de Marins & Carrenho, 2017) ou microrganismo endofíticos. De qualquer modo, o maior crescimento vegetativo ocorreu em solo natural (Nat) quando comparado ao substrato comercial (Sub), possivelmente, pela existência de outros microrganismo benéficos que atuam como promotores de crescimento de plantas (Cortois *et al.*, 2016; Revillini *et al.*, 2016), evidenciando que os FM são apenas a ponta do iceberg da associação entre plantas e microrganismo. Dentre os microrganismo que podem estar envolvidos em relações simbióticas com braúna, merece destaque as bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR), com grupos potenciais abundantes tanto em solo natural (Nat) quanto em solo esterilizado (Ste).

Embora o isolado de *Bradyrhizobium* sp. tenha sido isolado a partir de nódulo de plantas de braúna em condições de viveiro, a inoculação não promoveu a nodulação em nenhum dos seis tratamentos, indicando que a condição de cultivo pode não ter sido ideal para o desenvolvimento da simbiose (Yang *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2016). É reconhecido que a nodulação é modulada pela disponibilidade de nutrientes e por outras características físico-químicas dos substratos (Yusif *et al.*, 2016), a exemplo de pH e heterogeneidade do substrato.

As diferenças entre os substratos de cultivo foram evidenciadas pela PCoA, índices de diversidade e *Heatmap* e contribuiu para explicar as diferenças de sobrevivência e crescimento de braúna. A diferença nos índices de diversidade pode ter relação com as características físico-químicas dos substratos de cultivo, uma vez que as comunidades bacterianas são mais sensíveis a variações de pH quando comparada as comunidades fúngicas (Rousk *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2017), sendo este mais alcalino no substrato comercial (Sub), promovendo menor dominância e maior diversidade. O substrato comercial não apresentou

abundância de fungos com potencial fitopatogênico o que é vantajoso (Fernandes *et al.*, 2006; Xavier *et al.*, 2009), entretanto, apresentou apenas *Conlarium* como potencial endofítico capaz de promover o crescimento de plantas (Obase & Matsuda, 2014), o que pode não garantir o aumento da sobrevivência e crescimento de braúna na perspectiva do *plant-soil feedback* positivo.

O Ste foi recolonizado por microrganismo diversos, uma vez que estes são ubíquos, de fácil disseminação por vento e animais, sendo que suas características físico-químicas eram favoráveis para a instalação de microrganismo benéficos provenientes de Nat. O tratamento Ste favoreceu a abundância de endofíticos, como *Exophiala*, *Conlarium*, *Thichoderma* (Zhang *et al.*, 2008; Obase & Matsuda, 2014; de Souza *et al.*, 2016), sobretudo quando inoculado com FM. O fungo *Piriformospora indica* tem capacidades similares aos FMA, uma vez que são capazes de promover o crescimento de plantas (Kumar & Rao, 2012; Moreira *et al.*, 2015; Gill *et al.*, 2016) e aumentar a tolerância a estresse biótico e abiótico (Oelmüller *et al.*, 2009; Varma *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2016), mas não são biotróficos obrigatórios (Varma *et al.*, 1999), sinalizando que este fungo pode ter permanecido como saprofítico e recrutado microrganismo benéficos. Nesse substrato (Ste) se observou uma abundância de bactérias com potencial para a promoção do crescimento de plantas, *Paraburkholderia* (Timmermann *et al.*, 2017) e *Edaphobacter* (de Castro *et al.*, 2013), embora tenha apresentado a menor diversidade. Estes resultados evidenciam que o solo de uma planta da mesma espécie funciona como seu fenótipo estendido (van Breemen & Finzi, 1998), possibilitando a recolonização, mesmo após um distúrbio drástico como a esterilização, com espécies potenciais para interagir e beneficiar a planta hospedeira.

O Nat não apresentou abundância de grupos específicos de fungos com potencial para a promoção do crescimento de plantas, mas, as bactérias mais abundantes, *Lysinibacillus* e *Sphingomonas* (Naureen *et al.*, 2017), são grupos com representantes capazes de promover o crescimento de plantas. Neste caso, é necessário associar as informações obtidas com o sequenciamento de *amplicons* com o isolamento de grupos funcionais tais como PGPR e endofíticos da rizosfera e dos tecidos internos de braúna, com potencial como promotores do crescimento de plantas, de modo a aumentar o sucesso do cultivo por meio da inoculação. Além disso, é necessário investigar o papel de fatores abióticos na estrutura da comunidade microbiana rizosférica por meio de alterações nas características físico-químicas do substrato de cultivo e como isso reflete na sobrevivência e crescimento de plantas de braúna e também outras espécies, a exemplo de vinhático, em condições de viveiro.

Os resultados obtidos com o presente trabalho ampliam o entendimento sobre a relação de braúna, planta do bioma Mata Atlântica e ameaçada de extinção, com atributos abióticos e bióticos dos substratos de cultivo, enfatizando a necessidade de reconhecer a resposta de plantas ao modelo *plant-soil feedback*, possibilitando a produção de mudas de braúna em condições de viveiro.

### **Conclusões**

A braúna apresenta *plant-soil feedback* positivo e a inoculação com fungos micorrízicos favorece sua sobrevivência em substrato comercial (Sub) e no solo esterilizado (Ste), mas não garante o crescimento das plantas.

### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). À FAPEMIG e ao Bioagro (Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária).

### **Referências**

- Borges DB, Amorim MB, Waldschmidt AM, Mariano-Neto E, Vivas CV, Pereira DG. 2012. Optimization of DNA extraction from fresh leaf tissues of *Melanoxylon brauna* (Fabaceae). *Genetics and Molecular Research*, 11 (2), 1586-1591.
- Borges DB, Mariano-Neto E, Gaiotto FA. 2014. Development of microsatellite primers for *Melanoxylon brauna* (Fabaceae): na endangered and endemic tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Conservation Genetic Resources*, 7:65-68.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *ACIAR Monograph*, pp 374
- Brundrett MC & Abbott LK. 1991. Roots of jarrah forest plants. I. Mycorrhizal associations of shrubs and herbaceous plants. *Australian Journal of Botany* 39, 445–457.
- Carvalho FA, Nascimento MT, Braga JMA. 2007. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo de um remanescente de Mata Atlântica submontana no município de Rio Bonito, RJ, Brasil (Mata Rio Vermelho). *Revista Árvore*, 31(4): 717-730.
- Cortois R, Schröder-Georgi T, Weigelt A, van de Putten WH, de Deyn GB. 2016. Plant-soil feedbacks: role of plant functional group and plant traits. *Journal of Ecology*, 104, 1608-1617.

Crepaldi MOS, Peixoto AL. 2010. Use and knowledge of plants by “Quilombolas” as subsidies for conservation efforts in an area of Atlantic Forest in Espírito Santo State, Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 19(1): 37-60.

da Silva AF, de Oliveira RV, Santos NRL, de Paula A. 2003. Composição florística e grupos ecológicos das espécies de um trecho de Floresta Semidecídua Submontana da Fazenda São Geraldo, Viçosa-MG. *Revista Árvore*, v. 27, n. 3, p. 311-319.

Das K, Prasanna R, Saxena AK. 2017. Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiol*, 62:425–435.

de Castro VH, Schroeder LF, Quirino BF, Kruger RH, Barreto CC. 2013. Acidobacteria from oligotrophic soil from the Cerrado can grow in a wide range of carbon source concentrations. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(11): 746-753.

de Marins JF, Carrenho R. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate fungi in plants associated with aquatic environments. *Acta Botanica Brasilica*, 31(2):295-308.

de Souza JT, Trocoli RO, Monteiro FP. 2016. Plants from the Caatinga biome harbor endophytic *Trichoderma* species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. *Biological Control*, 94:25-32.

Dias PC, Pereira MSF, Kasuya MC.M, Paiva HN, Oliveira LS, Xavier A. 2012. Micorriza arbuscular e rizóbios no enraizamento e nutrição de mudas de angico-vermelho. *Revista Árvore*, 36 (6), 1027-1037.

Facelli E, Smith SE, Facelli JM, Christophersen HM, Smith FA. 2010. Underground friends or enemies: model plants help to unravel direct and indirect effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plant competition. *New Phytologist* 185, 1050–1061.

Fernandes C, Corá JE, Braz LT. 2006. Desempenho de substratos no cultivo do tomateiro do grupo cereja. *Horticultura Brasileira*, 24: 42-46.

Ferreira PA, Boscolo D, Carvalheiro LG, Biesmeijer JC, Rocha PLB, Viana BF. 2015. Responses of bees to habitat loss in fragmented landscapes of Brazilian Atlantic Rainforest. *Landscape Ecology* 30: 2067-2078.

Ferreira TC, Aguiar JV, Souza LA, Justino GC, Aguiar LF, Camargo LS. 2016. pH effects on nodulation and biological nitrogen fixation in *Calopogonium mucunoides*, 39(4): 1015-1020.

Fonseca MB, França MGC, Zonta EGV. 2010. Crescimento inicial de *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae – Caesalpinioideae) em diferentes condições de fertilidade em solo de cerrado. *Acta bot. Brás* 24: 322-327.

García-Parisi PA, Lattanzi FA, Grimoldi AA, Druille M, Omacini M. 2017. Three symbionts involved in interspecific plant-soil feedback: epichloid endophytes and mycorrhizal fungi affect the performance of rhizobia-legume symbiosis. *Plant and soil*, 412: 151.

Gill SS, Gill R, Trivedi DK, Anjum NA, Sharma KK, Ansari MW, Ansari AA, Johri AK, Prasad R, Pererira E, Varma A, Tuteja N. 2016. *Piriformospora indica*: potential and significance in plant stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 7:332.

Giovannetti M, Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84:489-500

Graham PH, Vance CP, 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131, 872-877.

Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, Johnson NC, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC et al. 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* 13: 394-407.

Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Dos Recursos Renováveis (Ibama). Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção. IBAMA, 2014. Brasil. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/static/pdf/portaria\\_mma\\_443\\_2014.pdf](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/static/pdf/portaria_mma_443_2014.pdf)>. Acesso em 01 de fevereiro de 2018.

Jesus EC, Schiavo JA, Faria SM. 2005. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. *Árvore* 29: 545-552.

Johnson NC, Graham JH, Smith FA. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist.*, 135: 575-585.

Kumar K, Rao IU. 2012. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in - Ex Vitro Conditions- A Review. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*. 2(4): 271-283.

Kumar V, Sahai V, Bisaria VS. 2011. High-density spore production of *Piriformospora indica*, a plant growth-promoting endophyte, by optimization of nutritional and cultural parameters. *Bioresource Technology* 102: 3169-3175.

Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, First Edition, John Wiley & Sons Inc, New York, pp. 115-175.

Lenoir I, Fontaine J, Sahraoui AL. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry*, 123, 4–15.

- Lorenzi H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa-SP, Editora Plantarum, 352p.
- Molina R, Massicotte, H, Trappe JM. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. mycorrhizal functioning: an integrative plant fungal process: 357-423.
- Moreira BC, Mendes FC, Mendes IR, Paula TA, Prates Junior P, Salomão LCC, Stürmer SL, Otoni WC, Guarçoni M A, Kasuya MCM. 2015. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* improves the growth and nutrient uptake in micropropagation-derived pineapple plantlets. Scientiae Horticulturae, 197: 183-192.
- Moreira BC, Prates Júnior P, Jordão TC, da Silva M C S, Stürmer SL, Salomão L C C, Otoni W C, Kasuya MCM. 2016. Effect of inoculation of symbiotic fungi on the growth and antioxidant enzymes' activities in the presence of *Fusarium subglutinans* f. sp. ananás in pineapple plantlets. Acta Physiol Plant, 38:235.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403: 853-858.
- Naureen Z, Rehman NU, Hussain H, Hussain H, Hussain J, Gilani SA, Al Housni SK, Fazal M. 2017. Exploring the Potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for Plant Growth Promotion and Biocontrol Activities against Phytopathogenic Fungi. Frontiers in Microbiology, 8: 1477.
- Obase K, Matsuda Y. 2014. Culturable fungal endophytes in roots of *Enkianthus campanulatus* (Ericaceae), 24(8): 635-644.
- Oelmüller R, Sharameti I, Tripathi S, Varma A. 2009. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. Symbiosis 49: 1-17.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H. 2015. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3-1.
- Olivares J, Bedmar EJ, Sanjuán J. 2013. Biological nitrogen fixation in the context of global change. Molecular Plant-Microbe Interactions, 26 (5), p. 486-494.
- Omirou M, Fasoula DA, Ioannide IM. 2016. *Bradyrhizobium* inoculation alters indigenous AMF community assemblages and interacts positively with AMF inoculum to improve cowpea performance, 108:381-389.
- Ossler J, Zielinski CA, Heath D. 2015. Tripartite mutualism: Facilitation or trade-off s between rhizobial and mycorrhizal symbionts of legume hosts, 102: 1332-1341.

- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature* 6: 763-75.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *T Brit Mycol Soc* 55:158-161
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil* 70: 199-209.
- Revillini D, Gehring CA, Johnson NC. 2016. The role of locally adapted mycorrhizas and rhizobacteria in plant-soil feedback systems. *Functional Ecology* 30: 1086-1098.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *142*: 1141-1153.
- Rousk J, Baath E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R, Fierer N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* 4(10):1340–1351.
- Schaad NW. 1998. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2. ed., St. Paul: American Phytopathological Society. 164p.
- Selosse MA, Dubois MP, Alvarez N. 2009. Do Sebaciales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycol. Res.* 113: 1062-1069.
- Selosse MA, Baudoin E, Vandenkoornhuyse P. 2004. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Plant biology and pathology*, 327, 639-648.
- Sikes BA, Cottenie K, Klironomos JN. 2009. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. *Journal of Ecology*, 97: 1274-1280.
- Siqueira JO, Saggin-Júnior OJ. 2001. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of Brazilian native woody species. *Mycorrhiza*, 5:245-255.
- Smith SE. and Read D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Edition, Academic Press, London.
- Timmermann T, Armijo G, Donoso R, Seguel A, Holuigue L, González B. 2017. *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN Protects *Arabidopsis thaliana* Against a Virulent Strain of *Pseudomonas syringae* Through the Activation of Induced Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(3):215-230.

Tripathi S, Das A, Chandra A, Varma A. 2015. Development of carrier-based formulation of root endophyte *Piriformospora indica* and its evaluation on *Phaseolus vulgaris* L. *World J Microbiol Biotechnol.* 31: 337-344.

van Breemen N, Finzi IAC. 1998. Plant-soil interactions: ecological aspects and evolutionary implications. *Biogeochemistry* 42:1-19.

van der Putten WH, Bardgett, R. D., Bever, J. D., Bezemer, T. M., Casper, B. B., Fukami, T., Kardol, P., Klironomos, J. N., Kulmatiski, A., Schweiter, J. A., Suding, K. N et al. 2013. Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology*, 101: 265-276.

Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* 206, 1196–1206.

Varma A, Bakshi M, Lou B, Hartmann A, Oelmueller R. 2012. *Piriformospora indica*: A novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. *Agr. Res.* 1(2): 117-131.

Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Bütehorn B, Franken P. 1999. *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. *Applied Environment Microbiology*, 65(6): 2741-2744.

Veiga RSL, Howard K, van der Heijden MG. A. 2012. No evidence for allelopathic effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the non-host-plant *Stellaria media*. *Plant and Soil*, 360 (1-2), p. 319-331.

Versieux LM, Medeiros MCMP, Spósito TCS, Stehmann JR. 2011. Characterization of the tree component in a semideciduous forest in the Espinhaço Range: a subsidy to conservation. *Revista Caatinga*, 24(2):85-94.

Vincent JM. 1970. A practical manual for the study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publishers. Ltd. P. 164 International Biological Program Handbook 15.

Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Huckelhoven R, Neumann C, Wettstein DV, Franken P, Kogel K. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38): 13386-13391.

Wang Y, Zhang Z, Zhang P, Cao Y, Hu T, Yang P. 2016. Rhizobium symbiosis contribution to short-term salt stress tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Soil* 402:247–261.

Wu Y, Zeng J, Zhu Q, Zhang Z, Lin X. 2017. pH is the primary determinant of the

bacterial community structure in agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Scientific Reports*, 7: 40093.

Wu Q-S, Xia R-X, Zou Y-N. 2008. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European J. Soil Biol.*, 44: 122–128.

Xavier A, Wendling I, Silva RL. 2009. *Silvicultura clonal - princípios e técnicas*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 272p.

Yang SS, Bellogín RA, Buendía A, Camacho M, Chen M, Cubo T, Daza A, Díaz CL, Espuny MR, Gutiérrez R, et al. 2001. Effect of pH and soybean cultivars on the quantitative analyses of soybean rhizobia populations. *Journal of Biotechnology*, 91(2): 243-255.

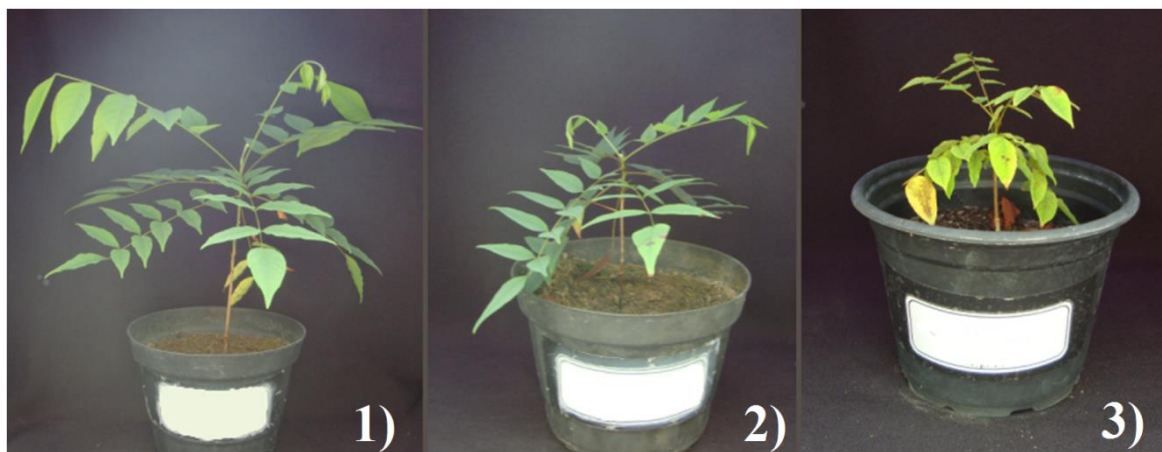
Yanni, Y.; Zidanb, M.; Dazzoc, F.; Rizka, R.; Mehesena, A.; Abdelfattaha, F.; Elsadanya, A. 2016. Enhanced symbiotic performance and productivity of drought stressed common bean after inoculation with tolerant native rhizobia in extensive fields. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 232 119–128,

Yusif, S.A.; Muhammad, I.; Hayatu, N. G.; Sauwa, M. M.; Tafinta, I. Y.; Mohammed, M. A.; Lukman, M. A.; Abubabar, G. A.; Hussain, A. M. 2016. Effects of Biochar and Rhizobium Inoculation on Selected Soil Chemical Properties, Shoot Nitrogen and Phosphorus of Groundnut Plants (*Arachis hypogaea* L.) in Sokoto State, Nigeria. *Journal of Applied Life Sciences International*, 9(2): 1-9,

Zangaro, W.; Nisizaki, S. M. A; Domingos, J. C. B.; Nakano, E. M. 2003. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 19: 315-324,

Zhang Y, Zhang Y, Liu M, Shi X, Zhao Z. 2008. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals in vitro. *Journal of Microbiology*, 46(6):624-32.

## Material Suplementar



**Figura Suplementar 1:** Mudras de braúna aos 180 dias de cultivo em três substratos: 1) solo da área de influência de uma planta adulta de braúna = Nat, 2) solo da área de influência de uma planta adulta de braúna esterilizado = Ste, 3) substrato comercial = Sub.

## **CAPÍTULO 5: Adição de solo de uma planta adulta da mesma espécie ao substrato comercial e a inoculação com FMA promovem o crescimento e nodulação de braúna**

### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento de mudas de braúna (*Melanoxylon brauna* Schott) inoculadas com FMA e rizóbio em diferentes proporções de substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO), na perspectiva do *plant-soil feedback*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições e os seguintes tratamentos: (T1) 100% de SUB, (T2) SUB acrescido de extrato de SOLO, (T3) 2/3 de SUB e 1/3 de SOLO, (T4) 1/2 SUB e 1/2 de SOLO, (T5) 1/3 SUB e 2/3 de SOLO, e (T6) 100% SOLO. Todos os tratamentos foram inoculados com uma mistura de FMA (*Rhizophagus clarus*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Gigaspora albida*) e *Bradyrhizobium* sp. Após 180 dias, foram avaliados o diâmetro do caule (D), altura (H), número de nódulos (NN), matéria fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFRA), matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSRA). Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Plantas cultivadas em T1, T2, T3 e T6 mostraram 0, 20, 53,3 e 66,7 % de sobrevivência, respectivamente, enquanto em T4 e T5 apresentaram 80 % de sobrevivência. O substrato contendo SOLO ou extrato de SOLO favoreceu a sobrevivência e/ou o crescimento da braúna, o que pode estar relacionado com a presença de microrganismo benéficos no solo da planta adulta de braúna. Conclui-se que braúna tem *plant-soil feedback* positivo, e que no solo de plantas adultas de braúna existem microrganismo benéficos, que são essenciais para a sua sobrevivência e seu crescimento.

**Palavras-chave:** FMA, *Bradyrhizobium*, *Melanoxylon brauna*, *plant-soil-feedback* positivo, simbiose tripartite.

### **Introdução**

A braúna (*Melanoxylon brauna* Schott) pertencente à família Fabaceae (subfamília Caesalpinioideae) era de ampla ocorrência natural no Bioma Mata Atlântica, mas devido ao desmatamento e características comerciais, foi intensamente explorada e atualmente se encontra na Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção (IBAMA, 2014). A planta atinge 40 m de altura e ocorre do estado da Bahia a São Paulo em florestas sazonais e úmidas, apresentando madeira de alta densidade, escura (quase negra), durável e de alto valor

econômico (Lorenzi, 1992; Borges *et al.*, 2014). É usada em obras externas e hidráulicas e na confecção de instrumentos musicais (Borges *et al.*, 2012) e pode ser utilizada como espécie ornamental. Os estudos visando melhorias na produção de mudas dessa espécie são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias para sua reintrodução em áreas nativas e sua conservação.

A baixa sobrevivência de braúna em viveiro pode estar relacionada à ausência de microrganismo simbioses nos substratos de cultivo (capítulo 4). As plantas têm um longo processo de elovução com microrganismo do solo, o que conduziu ao desenvolvimento de interdependência, abarcando as considerações do *plant-soil feedback* (PSF) com efeitos que podem ser positivos, neutros ou negativos (van Breemen & Finzi, 1998; van der Putten *et al.*, 2013; Revillini *et al.*, 2016). O aproveitamento da simbiose pode ocorrer pela utilização de solo de uma planta adulta da mesma espécie, melhorando a capacidade de crescimento de coespecíficos juvenis, desde que a planta apresente PSF positivo. Em clima temperado muitas Fabaceae apresentam PSF neutro (Cortois *et al.*, 2016), entretanto, existem indicações que em condições tropicais espécies dessa família têm PSF positivo (capítulo 1, 2 e 4).

Além disso, mais de 90 % das plantas terrestres se associam com fungos do solo para formar micorrizas (Selosse & Tacon, 1998; Smith & Read, 2008), sinalizando a necessidade de contornar o viés dos substratos de cultivo, que busca minimizar a ocorrência de microrganismo patogênicos e, conseqüentemente dificulta a incidência de microrganismo benéficos. São reconhecidos que fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e rizóbios são capazes de promover o crescimento de plantas (Moreira *et al.*, 2016; Tavares *et al.*, 2016; Araújo *et al.*, 2017; Freire *et al.*, 2017), embora para os FMA exista um *continuum* que vai desde o mutualismo até o parasitismo (Johnson *et al.*, 1997). A inoculação de mudas de espécies florestais com FMA pode ser favorável ao sucesso de programas de reflorestamento, visto a possibilidade de redução do uso de fertilizantes, menor tempo de formação de mudas em viveiro e maior sobrevivência em campo (Carneiro *et al.*, 2004; Machineski *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2012; Goetten *et al.*, 2016).

Além disso, plantas podem responder à heterogeneidade espacial (Wubs & Bezemer, 2016; 2018) e favorecer ou desfavorecer determinados grupos de simbioses. As alterações nas características físico-químicas dos substratos de cultivo podem alterar a aeração e, conseqüentemente a comunicação e o recrutamento de microrganismo benéficos pelas plantas (Schulz-Bohm *et al.*, 2017). Assim, fatores como a escolha do substrato de cultivo, fertilização, irrigação (Dutra *et al.*, 2017; Freire *et al.*, 2017) e o nível de dependência à

microrganismo simbioses resultam em maior ou menor sucesso na produção de mudas. As combinações entre esses fatores devem ser continuamente investigadas para atender a demanda das espécies florestais. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de mudas de braúna inoculadas com FMA e rizóbio em concentrações de substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO) em diferentes proporções.

## **Material e métodos**

### **Sementes e substratos**

As sementes de braúna foram obtidas com a SIF (Sociedade de Investigações Florestais) e desinfestadas superficialmente com etanol a 70 % por 30 s e hipoclorito de sódio (2,5 %, v:v) por 10 min, com lavagens sucessivas em água esterilizada, em condições assépticas. As sementes foram transferidas para placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada e esterilizada, posteriormente incubadas por sete dias a temperatura ambiente e quando pré-geminadas foram selecionadas e dispostas nos vasos de cultivo.

O solo proveniente de uma planta adulta de braúna foi obtido no município de Leopoldina-MG (S 21° 33' 708", W 42° 36' 003", 273 m de altitude), área de pastagem com *Urochloa* sp, nas proximidades (raio de 2 m) de uma planta adulta, na camada de 0-20 cm de profundidade, em pontos distribuídos aleatoriamente para obtenção de uma amostra composta. As amostras de solos foram peneiradas em campo, homogeneizadas e armazenadas. O substrato comercial (Tropstrato Florestal, Vidaverde®) utilizado foi à base de casca de pinus e vermiculita expandida, acrescida de macro e micronutrientes.

### **Inoculantes de FMA e rizóbio**

Os isolados de fungos micorrízicos arbusculares, *Claroideoglossum etunicatum* RJN101A (= *Glomus etunicatum*), *Rhizophagus clarus* RJN102A (= *Glomus clarum*) e *Gigaspora albida* PRN201A foram obtidos da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG, [www.furb.br/cicg](http://www.furb.br/cicg)) da Universidade Regional de Blumenau (FURB), Santa Catarina, Brasil. Os isolados foram multiplicados em solo:areia (1:1, v:v) cultivados com braquiária (*Urochloa brizantha* Hochst Stapf).

O isolamento de *Bradyrhizobium* sp. foi obtido a partir de nódulos de plantas de braúna, crescendo em viveiro do IEF (Instituto Estadual de Florestas, Minas Gerais, Brasil). Os nódulos foram desinfestados superficialmente em etanol a 70% por 30 s, seguido por

imersão em hipoclorito de sódio a 2 % por 10 min e lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada. Os nódulos foram pressionados com uma pinça sobre a placa de Petri com meio de cultura YMA com vermelho Congo (Vincent, 1970), pH 6,9, incubadas a 25 °C, seguido por repicagem para obtenção de colônias isoladas. As colônias foram repicadas após a confirmação da pureza e preservadas a -80 °C em meio NBY (Schaad, 1998). O isolado teve o DNA extraído com o kit Nucleo Spin<sup>®</sup> Soil (Macherey-Nagel), a partir de células cultivadas em três dias em meio de cultivo YMA. Para a amplificação parcial do gene 16S rRNA, foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991). O resultado do sequenciamento foi comparado a sequências depositadas no GenBank (NCBI) por meio da ferramenta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **Desenho experimental e inoculação**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado com 15 repetições e seis tratamentos que consistiram em diferentes proporções de substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO): (T1) SUB 100 % (T2) SUB mais extrato de SOLO, (T3) 2/3 de SUB e 1/3 de SOLO, (T4) 1/2 de SUB e 1/2 de SOLO, (T5) 1/3 de SUB e 2/3 de SOLO, e (T6) 100 % de SOLO (T1) 100 % de substrato comercial, (T2) substrato comercial acrescido de extrato de solo de uma planta adulta da mesma espécie, (T3) 2/3 substrato comercial e 1/3 do solo de uma planta adulta da mesma espécie, (T4) 1/2 substrato comercial e 1/2 do solo de uma planta adulta da mesma espécie, (T5) 1/3 substrato comercial e 2/3 do solo de uma planta adulta da mesma espécie, e (T6) 100 % do solo de uma planta adulta da mesma espécie. Todos os tratamentos foram inoculados com uma mistura de FMA (*C. etunicatum*, *R. claru* e *G. albida*). As sementes previamente germinadas foram embebidas em meio YM com rizóbio por 10 min, em seguida transplantadas para vasos plásticos de capacidade de um litro. As plantas foram transferidas para o substrato de cultivo juntamente com os inóculos de FMA.

O extrato de solo utilizado em T2 foi obtido pela mistura de solo e água na proporção 1:2,5 (v:v), seguido por agitação em Shaker a 180 rpm por 30 min e filtragem rápida em papel filtro faixa preta 0,20 mm). Em cada repetição do referido tratamento foi adicionado 90 mL da solução para recompor parte da microbiota indígena.

As mudas foram irrigadas, conforme a necessidade, tentando manter a umidade próxima à capacidade de campo e 50 mL de solução com macro e micronutrientes foi aplicada a cada 15 dias (Clark, 1975).

### **Medidas de crescimento e nodulação**

Após o período de 180 dias de crescimento em viveiro foi avaliada a sobrevivência, diâmetro do caule (D) a um centímetro do solo, altura (H), matéria fresca (FMS) e seca (MSPA) da parte aérea e matéria fresca (FMR) e seca (MSRA) da raiz, número de nódulos e a dependência micorrízica. A MSPA e MSRA foram determinadas após secagem até peso constante a 70 °C em estufa com ventilação forçada.

### **Caracterização físico-química dos substratos**

Os substratos de cultivo foram caracterizados, conforme a Instrução Normativa nº 17 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), brasileiro (Brasil, 2008). As amostras em sua totalidade passaram pela peneira de malha de 19 x 19 mm (ASTM ¾”). Foi determinada a densidade volumétrica, a capacidade de retenção de água, o pH, a condutividade elétrica e a capacidade de troca catiônica.

A densidade foi determinada pelo método de autocompactação em proveta plástica de 500 mL, fazendo-se a determinação da umidade atual, previamente, com uma alíquota de 100 g da amostra levada à estufa (65 °C) até massa constante. O cálculo da compactação da massa do substrato foi efetuado conforme a fórmula:

$$D \text{ seca} = D \text{ úmida} * \frac{(100 - U \text{ atual})}{100}$$

Sendo, D seca = densidade volumétrica da amostra seca (kg m<sup>-3</sup>), D úmida = densidade volumétrica da amostra úmida (kg m<sup>-3</sup>) e U atual = umidade atual da amostra (%).

A capacidade de retenção de água (CRA) foi realizada após preenchimento dos anéis, com 100 mm de diâmetro e 50 mm de altura, conforme a densidade seca de cada amostra, seguido por saturação dos cilindros por 24 h e colocação dos anéis em mesa de tensão a 0,01 kPa por 48 h. A massa das amostras foi avaliada após a retirada da mesa e secas em estufa a 65 °C por 48 h, utilizando-se a seguinte equação:

$$CRA \ 10 \left( \% \frac{v}{v} \right) = \frac{[(\text{massa } 1 \text{ (g)} - \text{massa } 2 \text{ (g)}) * 100]}{\text{volume do anel (cm}^3\text{)}}$$

O pH e a condutividade elétrica foram determinados em água a 25 °C na razão 1:5, v:v, após agitação a 40 rpm durante 1 h. O pH foi medido em pHmetro e a condutividade elétrica foi realizada após filtragem em papel filtro faixa branca, utilizando-se condutivímetro.

A determinação da capacidade de troca catiônica (CTC) foi baseada na ocupação dos sítios de troca dos substratos pelos íons hidrogênio provenientes da solução de ácido clorídrico HCl (0,5 mol/L), que foram deslocados com a solução de acetato de cálcio a pH 7. Para evitar as perdas dos materiais orgânicos solúveis durante a lavagem foi utilizado carvão ativado. A titulação foi realizada com NaOH (0,1 mol/L) e fenolftaleína 1 %. Sendo a CTC calculada pela fórmula:

$$CTC \left( \frac{\text{mmol}}{\text{kg}} \right) = \left\{ \left[ (V_a - V_b) \times C_{NaOH} \left( \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) \right] * 1000 \right\} m (g)$$

V<sub>a</sub> = volumes, em mL, de solução de NaOH 0,1 mol/L gastos nas titulações das soluções das amostras; V<sub>b</sub> = volumes, em mL, de solução de NaOH 0,1 mol/L gastos nas titulações das soluções das amostras das provas em branco; m = massa em gramas da amostra de substrato.

### **Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) com significância de 5 % de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste Tukey (p < 0,05) utilizando o software R.

## **Resultados**

### **Sobrevivência e crescimento das plantas**

As plantas cultivadas em substrato comercial puro (T1) não sobreviveram até 180 dias de cultivo, enquanto a sobrevivência no substrato acrescido de extrato (T2) foi de 20 %, seguido de T3 (53,33 %), T6 (66,67 %), T4 (80 %) e T5 (80 %). De modo geral T2 apresentou crescimento menor que os demais tratamentos e T3 teve crescimento maior que T4 em termos de D, MFPA e MSPA (Tabela 1). A altura foi menor em T6 quando comparado a T3. O T2 não apresentou nódulos e não houve diferença na quantidade de nódulos para os demais tratamentos, sendo que T3, T4, T5 e T6 apresentaram, respectivamente, média de 25, 30, 53, 46 nódulos.

**Tabela 1:** Medidas de crescimento de braúna após 180 dias de cultivo em casa de vegetação, em substratos com diferentes composições: (T3) 2/3 do substrato comercial (SUB) e 1/3 do solo de uma planta adulta da mesma espécie (SOLO), (T4) 1/2 (SUB) e 1/2 do SOLO, (T5) 1/3 SUB e 2/3 do SOLO, e (T6) 100% SOLO.

Medidas de crescimento	T2	T3	T4	T5	T6
NF	3,67 b	12,63 a	12,67 a	13,17 a	13,30 a
H (cm)	8,66 c	18,66 a	15,78 ab	16,32 ab	15,29 b
D (mm)	1,59 b	4,64 a	2,75 b	3,40 ab	3,71 ab
MFPA (g)	0,37 c	4,32 a	3,05 b	4,24 a	5,00 a
MFRA (g)	0,16 b	2,00 a	1,67 a	2,19 a	2,22 a
MSPA (g)	0,16 c	1,77 a	1,16 b	1,88 a	2,12 a
MSRA (g)	0,04 c	0,49 ab	0,33 bc	0,58 a	0,67 a
NN	0,00 b	25,38 a	29,67 a	53,00 a	46,11 a
MSN (g)	0,00 b	0,06 a	0,09 a	0,10 a	0,08 a

\*NF= número de folhas; D = diâmetro do caule; H = altura da planta; MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; MFRA =matéria fresca da raiz; MSRA = matéria seca da raiz; NN= número de nódulos e MSN = matéria seca dos nódulos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas mesmas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

### Caracterização físico-química dos substratos

O T1 (100 % de SUB) e o T2 (SUB acrescido de extrato de SOLO) não apresentaram diferença para nenhuma das características avaliadas (Tabela 2). A densidade volumétrica diferiu entre os tratamentos em ordem decrescente: T6 > T5 > T4 > T3 > T2=T1) e a CRA foi igual para todos os tratamentos. O pH foi menor em 100 % de SOLO (T6 = 4,96), sendo que T5 não diferiu de T4 e este não diferiu de T3. A condutividade elétrica e a CTC foi menor em T6 (179,633; 175,292, respectivamente) e maior para T3, T4 e T5, que correspondem às proporções de solo e substrato comercial (Tabela 2).

**Tabela 2:** Caracterização físico-química dos substratos de cultivo de braúna, sendo substrato comercial (SUB) e solo de uma planta adulta da mesma (SOLO) e (T1) 100 % de SUB, (T2) SUB acrescido de extrato de SOLO, (T3) 2/3 de SUB e 1/3 de SOLO, (T4) 1/2 de SUB e 1/2 de SOLO, (T5) 1/3 de SUB e 2/3 de SOLO, e (T6) 100% SOLO.

Caracterização físico-química	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Densidade Volumétrica (g/cm <sup>3</sup> )	0,30 e	0,32 e	0,57 d	0,67 c	0,78 b	0,95 a
Capacidade de retenção de água (CRA) % (m/m)	55,32 a	56,66 a	54,36 a	56,47 a	56,15 a	58,24 a
pH	5,64 a	5,60 a	5,42 b	5,33 bc	5,19 c	4,96 d
Condutividade elétrica MS* cm <sup>-1</sup>	455,25 a	420,00 ab	380,25 abc	332,50 bcd	309,25 cd	248,25 d
CTC mmol dm <sup>3</sup>	589,86 a	581,10 a	366,60 b	267,15 c	259,35 c	226,69 c

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas mesmas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

## Discussão

A sobrevivência de 20 % em T2 comparado a T1 que apresentou 100 % de mortalidade indica que braúna apresenta *plant-soil feedback* positivo. O extrato pode ser uma estratégia importante como fonte de microrganismo benéficos, entretanto, as condições físico-químicas e biológicas do próprio substrato precisam ser readequadas para permitir condições à simbiose. Os substratos organominerais (areia:solo:esterco, 1:1:1, v:v:v) quando comparados com areia e vermiculita (1:1, v:v) podem favorecer o crescimento e nodulação de Fabaceae, tais como em *Mimosa bimucronata* inoculada com estirpes de rizóbio (Freire *et al.*, 2017) ou em braúna, uma vez que apenas T2 não apresentou nódulos. Para favorecer a microbiota associada à braúna, na impossibilidade de uso de solo proveniente de uma planta adulta em grandes quantidades, é possível empregar subsolo, amplamente utilizada por viveiristas (de Freitas *et al.*, 2017), em proporções com substrato comercial, acrescido do extrato de SOLO como fonte de inóculo.

A formação de nódulos em todos os tratamentos contendo SOLO, indica que além das interações com outros microrganismo (Zahir *et al.*, 2011; Lahrouni *et al.*, 2012) e características físico-químicas como aeração, pH (Yang *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2016; Yusif *et al.*, 2016), fatores temporais regulam a nodulação (Barker & Bronstein, 2016), uma vez que em outro experimento o tratamento correspondente a T6 não apresentou nódulos (capítulo 4). Ao reconhecer braúna como uma espécie secundária inicial a climax, que ocupa o sub-bosque na fase juvenil, é necessário investigar como fatores abióticos, a exemplo de luminosidade, temperatura e umidade do ar afetam a comunidade microbiana, sobretudo FMA e rizóbios, e como isso reflete na sobrevivência e crescimento de braúna. De modo complementar, é preciso considerar a seleção de estirpes eficientes, capazes de aumentar a fixação biológica de nitrogênio (Angus *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2017) e promover o seu crescimento.

Embora a sobrevivência de T3 tenha sido menor que T4, T5 e T6, seu crescimento foi maior que T4, indicando que a dinâmica dos microrganismo na rizosfera de braúna é complexa, assim, as características físico-químicas dos substratos não são os únicos fatores envolvidos na sobrevivência e promoção do crescimento desta planta (capítulo 4). As características físico-químicas dos substratos tais como densidade volumétrica, pH, CTC e condutividade elétrica que tiveram aumento ou decréscimo linear, assim, não corresponderam aos resultados de sobrevivência e crescimento. Isto tem implicações importantes em termos de estratégias para controlar a simbiose, porque as condições físico-químicas e biológicas

resultantes das proporções SUB e SOLO podem interagir e resultar em aumento e decréscimo de crescimento em faixas mais estreitas do que o esperado. Este padrão pode estar associado à dinâmica da comunidade microbiana e faixa estreita de sobrevivência e crescimento de alguns grupos funcionais de microrganismo.

A inoculação com as três espécies de FMA (*Claroideoglossum etunicatum*, *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora albida*) pode ter atuado como um dreno de fotoassimilados (Johnson *et al.*, 1997) e influenciado a resposta de braúna e, talvez, esta planta tenha relação mutualista mais específica com outras espécies de FMA. Entretanto, as evidências indicam que braúna é uma espécie não micorrízica, pois mesmo na presença de inóculos provenientes de uma planta adulta, a percentagem de colonização radicular foi extremamente reduzida (capítulo 4). Experimentos futuros devem testar a resposta de braúna à inoculação com outras espécies de FMA e complementar as informações utilizando marcadores isotópicos (Courty *et al.*, 2011), de modo a saber se na fase juvenil, por intermédio de espécies de FMA, braúna não explora a capacidade fotossintética de plantas próximas.

Para melhor entendimento da qualidade das mudas e inferências sobre as características físico-químicas dos substratos, bem como a presença de grupos funcionais tais como acidófilos, fixadores de N, solubilizadores de fosfato, é importante avaliar o teor de nutrientes nos tecidos da planta. Essas informações devem ser correlacionadas com a composição da comunidade fúngica e bacteriana por meio de sequenciamento de *amplicons* (capítulo 1, 2 e 4), de modo a reconhecer grupos mais abundantes e como estes respondem ao gradiente físico-químico formado pelas proporções de SUB e SOLO.

A complexidade dos resultados envolvendo experimentações com braúna pode não ter relação somente com microrganismo simbioses, *plant-soil feedback* e/ou características físico-químicas dos substratos, mas também com a fisiologia, genética e condição ecológica da própria espécie. A baixa variabilidade genética, devido ao isolamento de indivíduos (da Silva *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2007; Crepaldi & Peixoto, 2010; Versieux *et al.*, 2011) pode implicar em aumento da carga genética por aumento de endogamia (Helenurm & Schaal, 1996) e, conseqüentemente, somar genes deletérios, resultando em menor resistência a pragas e patógenos, bem como dependência de condições físico-químicas e biológicas muito específicas para sobrevivência e crescimento. Isto pode explicar a alta incidência de patógenos em seus frutos (Freire *et al.*, 2013) e o intenso ataque por insetos (Silva *et al.*, 2013). Assim, existe a possibilidade de que as diferenças na sobrevivência dos juvenis, em

condições de viveiro, estejam relacionadas a eventos estocásticos, decorrentes da carga genética da planta.

De qualquer modo, é preciso reconhecer que braúna apresenta *plant-soil feedback* positivo e que os resultados obtidos com o presente trabalho ampliam o entendimento sobre a resposta dessa planta à fatores abióticos e bióticos, contribuindo para aumentar o sucesso na produção de mudas de uma espécie ameaçada de extinção.

## **Conclusão**

A braúna apresenta *plant-soil feedback* positivo e no solo de plantas adultas desta espécie existem microrganismo benéficos, que são essenciais para a sua sobrevivência e o seu crescimento. Assim, a utilização de solo de plantas adultas ou de seu extrato, associado à características físico-químicas adequadas dos substratos são essenciais para garantir a produção de mudas braúna de qualidade.

## **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). À FAPEMIG e ao Bioagro (Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária).

## **Referências**

Angus A, Lee A, Lum M, Shehayeb M, Hessabi R, Fujishine N, Yerrapragada S, Kano S, Song N, Yang P, Estrada de los Santos P, Faria S, Dakora F, Weinstock G, Hirsch A. 2013. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macropodium atropurpureum* (siratiro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. *Plant and Soil*, 369(1): 543-562.

Araújo KS, de Carvalho F, Moreira FMS. 2017. *Burkholderia* strains promote *Mimosa* spp. growth but not *Macropodium atropurpureum*. *Revista Ciência Agronômica*, 48(1): 41-48.

Barker JL, Bronstein JL. 2016. Temporal Structure in Cooperative Interactions: What Does the Timing of Exploitation Tell Us about Its Cost? *PLoS Biology*, 14(2): 1-12.

Borges DB, Amorim MB, Waldschmidt AM, Mariano-Neto E, Vivas CV, Pereira DG, 2012. Optimization of DNA extraction from fresh leaf tissues of *Melanoxylon brauna* (Fabaceae). *Genetics and Molecular Research*, 11 (2), 1586-1591.

Borges, D. B.; Mariano-Neto, E.; Gaiotto, F. A. 2014. Development of microsatellite primers for *Melanoxylon brauna* (Fabaceae): an endangered and endemic tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Conservation Genetics Resources*, 7 (1): 65-68.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N.º 31, de 23 de outubro de 2008. Altera os subitens 3.1.2, 4.1 e 4.1.2, do Anexo à Instrução Normativa SDA n.º 17, de 21 de maio de 2007. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 out. 2008. Seção 1, p.20.

Carneiro MAC, Siqueira JO, Davide AC. 2004. Fósforo e inoculação com fungos micorrízicos arbusculares no estabelecimento de mudas de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec). *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 34 (3): 119-126.

Carvalho FA, Nascimento MT, Braga JMA. 2007. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo de um remanescente de Mata Atlântica submontana no município de Rio Bonito, RJ, Brasil (Mata Rio Vermelho). *Revista Árvore*, 31(4): 717-730.

Clark RB. 1975. Characterization of phosphatases of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 458-460.

Cortois R, Schröder-Georgi T, Weigelt A, van de Putten WH, de Deyn GB. 2016. Plant-soil feedbacks: role of plant functional group and plant traits. *Journal of Ecology*, 104, 1608-1617.

Courty PE, Walder F, Boller T, Ineichen K, Wiemken A, Rousteau A, Selosse MA. 2011. Carbon and nitrogen metabolism in mycorrhizal networks and mycoheterotrophic plants of tropical forests: a stable isotope analysis. *Plant Physiol* 156: 952–961

Crepaldi MOS, Peixoto AL. 2010. Use and knowledge of plants by “Quilombolas” as subsidies for conservation efforts in an area of Atlantic Forest in Espírito Santo State, Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 19(1): 37-60.

da Silva AF, de Oliveira RV, Santos NRL, de Paula A. 2003. Composição florística e grupos ecológicos das espécies de um trecho de Floresta Semidecídua Submontana da Fazenda São Geraldo, Viçosa-MG. *Revista Árvore*, 27(3):311-319.

de Freitas, E. C. S.; de Paiva, H. N.; Leite, H. G.; de Oliveira Neto, S. N. 2017. Crescimento e qualidade de mudas de *Cassia grandis* Linnaeus f. em resposta à adubação fosfatada e calagem. *Ciência Florestal*, 27 (2), 509-519.

Duarte ML, Paiva HN, Alves MO, Freitas AF, Maia FF, Goulart LML. 2015. Crescimento e qualidade de mudas de vinhático (*Platymenia reticulata* Benth.) em resposta à adubação com potássio e enxofre. *Ciência Florestal*, 25: 221-229.

Dutra F, Araújo MM, Zimmermann APL, Rorato DG, Aimi SC. 2017. Qualidade morfológica de mudas de *Prunus sellowii* submetidas a diferentes substratos. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 37(92): 619-624.

Ferreira PA, Boscolo D, Carvalheiro LG, Biesmeijer JC, Rocha PLB, Viana BF. 2015. Responses of bees to habitat loss in fragmented landscapes of Brazilian Atlantic Rainforest. *Landscape Ecology* 30: 2067-2078.

Freire JL, Jesus EC, Rouws JRC, da Faria SM, Zill JE. 2017. Efeito do substrato sobre o crescimento de mudas de *Mimosa bimucronata* inoculadas com estirpes de rizóbio. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 37(90): 131-138.

Freire JM, de Azevedo MC, Cunha CF, da Silva TF, Resende AS. 2013. Fenologia reprodutiva de espécies arbóreas em área fragmentada de Mata Atlântica em Itaboraí, RJ. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 33(75): 243-252.

Goetten LC, Moretto G, Stürmer SL. 2016. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum produced on-farm and phosphorus on growth and nutrition of native woody plant species from Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 30 (1): 9-16.

Helenurm K, Schaal BA. 1996. Genetic load, nutrient limitation, and seed production in *Lupinus texensis* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 83 (12): 1585-1595.

Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Dos Recursos Renováveis (Ibama). Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção. IBAMA, 2014. Brasil. Disponível em: <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/static/pdf/portaria\\_mma\\_443\\_2014.pdf](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/static/pdf/portaria_mma_443_2014.pdf)>. Acesso em 01 de fevereiro de 2018.

Johnson NC, Graham JH, Smith FA. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist.*, 135: 575-585.

Lane D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, First Edition, John Wiley & Sons Inc, New York, pp. 115-175.

Lahrouni M, Oufdou K, Faghire M, Peix A, El Khalloufi F, Vasconcelos V, Oudra B. 2012. Cyanobacterial extracts containing microcystins affect the growth, nodulation process and nitrogen uptake of faba bean (*Vicia faba* L., Fabaceae). *Ecotoxicology* 21: 681.

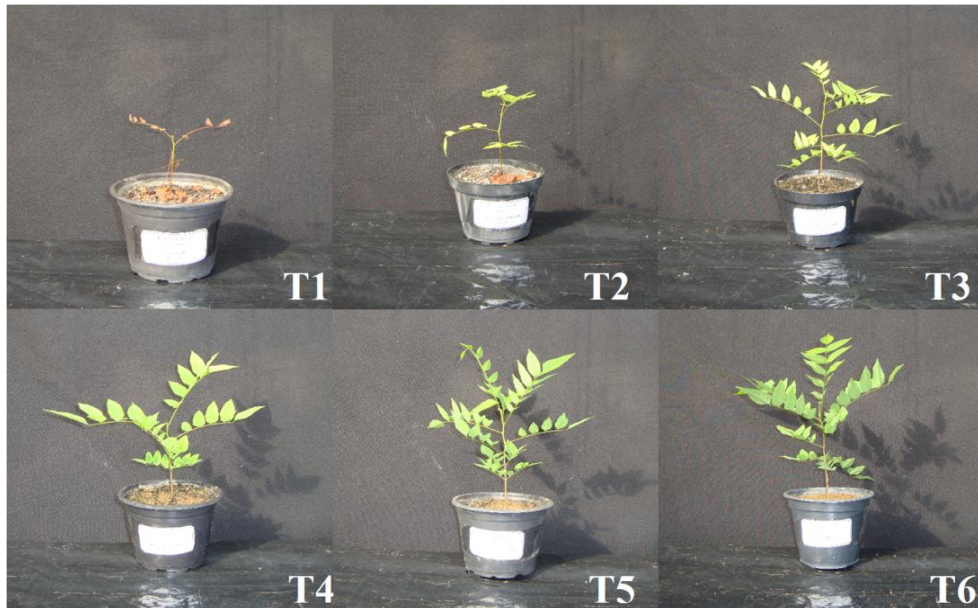
- Lorenzi H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa-SP, Editora Plantarum, 352p.
- Machineskil O, Balotal EL, Colozzi Filho A, Andrade DS, de Souza JRP. 2009. Growth responses of peroba rosa seedlings due to arbuscular mycorrhizal fungi inoculation. *Ciência Rural*, 39 (2):567-570.
- Moreira SLS, Prates Júnior P, Fernandes RBA, da Cunha ACMM, Campo ANR. 2016. Growth and nutrients uptake in *Euterpe edulis* Martius inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46 (2): 169-176.
- Revillini D, Gehring CA, Johnson NC. 2016. The role of locally adapted mycorrhizas and rhizobacteria in plant-soil feedback systems. *Functional Ecology* 30: 1086-1098.
- Schaad NW. 1998. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2. ed., St. Paul: American Phytopathological Society. 164p.
- Schulz-Bohm K, Martín-Sánchez L, Garbeva P. 2017. Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra and inter kingdom interactions. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1-10.
- Selosse M-A, Tacon FL. 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership?, *Trends Ecol. Evol.* 13, 15-20.
- Silva MS, Borges EEL, Leite HG, Corte VB. 2013. Biometria de frutos e sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Cerne*, 19(3): 517-524.
- Smith SE and Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Edition, Academic Press, London.
- Tavares SRL, Franco AA, da Silva EMR. 2016. Produção de mudas de *Acacia mangium* Willd noduladas e micorrizadas em diferentes substratos. *HÓLOS*, 4: 56-66.
- van Breemen N, Finzi AC. 1998. Plant-soil interactions: ecological aspects and evolutionary implications. *Biogeochemistry*, 42:1-19.
- van der Putten WH, Bardgett, R. D., Bever, J. D., Bezemer, T. M., Casper, B. B., Fukami, T., Kardol, P., Klironomos, J. N., Kulmatiski, A., Schweitzer, J. A., Suding, K. N et al. 2013. Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology*, 101: 265-276.
- Versieux LM, Medeiros MCMP, Spósito TCS, Stehmann JR. 2011. Characterization of the tree component in a semideciduous forest in the Espinhaço Range: a subsidy to conservation. *Revista Caatinga*, 24(2):85-94.

Vincent JM. 1970. A practical manual for the study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific *Publishers*. Ltd. P. 164 International Biological Program Handbook 15.

Wubs JER, Bezemer TM. 2018. Plant community evenness responds to spatial plant-soil feedback heterogeneity primarily through the diversity of soil conditioning. *Functional Ecology*, 32:509–521.

Wubs JER, Bezemer MT. 2016. Effects of spatial plant-soil feedback heterogeneity on plant performance in monoculture. *Journal of Ecology*, 104, 364-376.

## Material Suplementar



**Figura 1:** Padrão de crescimento de braúna após 180 dias de cultivo, em (A) 100% substrato comercial = T1; (B) substrato comercial mais extrato = T2; (C) 1/3 de solo de uma planta adulta da mesma espécie = T3; (D) 1/2 de solo de uma planta adulta da mesma espécie = T4; (E) 2/3 de solo de uma planta adulta da mesma espécie = T5; (F) 100 % Solo natural de uma planta adulta da mesma espécie = T6.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As duas espécies de planta vinhático (*Plathymentia reticulata* Bentham, Mimosoideae) e braúna (*Melanoxylon brauna* Schott, Caesalpinoideae), respondem positivamente ao *plant-soil feedback*. Entretanto, o comportamento é bastante distinto uma da outra, enquanto vinhático é caracteristicamente micorrízica, tem seu crescimento aumentando com a adubação fosfatada ( $\leq 300 \text{ mg dm}^{-3}$  quando inoculada com FMA) e tem melhor crescimento em proporções de SOLO e SUB; a braúna é aparentemente uma planta não micorrízica que têm padrão complexo de aproveitamento da adubação fosfatada e de sobrevivência e crescimento em proporções de SOLO e SUB.

É preciso reconhecer que o tipo de substrato de cultivo implica em alterações na microbiota associada a essas plantas, com respostas em termos de composição e índices de diversidade diferenciados. De modo geral, o sequenciamento de *amplicons* revelou que o solo natural (Nat) apresenta maior riqueza e diversidade de fungos (ITS), enquanto o substrato comercial (Sub) apresenta maior riqueza e diversidade de bactérias e archaea (16S), sendo o pH um dos fatores que mais explicam esse padrão. O isolamento de BFN foi importante para certificar que vinhático e braúna estabelecem simbiose com rizóbio, entretanto é essencial avaliar a eficiência simbiótica dos isolados. Além disso, para vinhático ficou evidente que as proporções de SOLO e SUB favorecem a maior riqueza de fungos, bactérias e archaea, possivelmente pelo aumento da heterogeneidade e criação de novos nichos. Os *heatmaps* permitiram reconhecer os grupos mais abundantes, incluindo bactérias e fungos com potencial benéfico, a exemplo de endofíticos, fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), bem como potenciais patógenos.

As informações sobre simbioses benéficas devem, futuramente, ser associadas com o isolamento, caracterização e seleção de bactérias e fungos promotores de crescimento de plantas, capazes de produzir fitormônios, solubilizar fosfato e fixar o nitrogênio atmosférico. Deste modo, as possibilidades de produção de inoculantes para a produção de mudas serão ampliadas. Torna-se importante, também, avaliar o potencial de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pelo método *on fam*, devido à facilidade de obtenção de inoculante.

No contexto da produção de inoculantes de microrganismo benéficos, é preciso reconhecer o potencial dos microrganismo eficientes (EM - *Effective Microorganisms*), embora não existam informações robustas sobre os efeitos da inoculação com EM no crescimento de plantas e a composição da comunidade microbiana na solução de EM seja altamente variável, estes podem atuar como um “pró-bióticos” para algumas ou muitas espécies vegetais. Os EM

podem interagir com uma microbiota nativa competitiva e se desdobrar em diversas possibilidades, a exemplo do sistema *plant-soil feedback* (PSF).

O PSF representa um avanço conceitual importante para uma abordagem mais holística de plantas, microrganismo e solo. Além disso, a validade do PSF torna-se relevante para entender a dinâmica de plantas em sistemas naturais e abre espaço para outros estudos experimentais em casa de vegetação, a exemplo dos testes realizados com vinhático e braúna por nosso grupo de pesquisa, os quais podem ser expandidos para outras espécies vegetais, dificilmente propagadas em condições de viveiro. De qualquer modo, o PSF amplia as contribuições dos diferentes componentes abióticos e bióticos do solo que pode levar a uma melhor compreensão e, conseqüentemente, manejo dos sistemas naturais, florestais e agrícolas.

Muito pouco é conhecido sobre a biologia e ecologia de vinhático e braúna, bem como sobre microrganismo associados e as condições físico-químicas do solo favoráveis à simbiose. Assim, cabe a realização de avaliações em campo, relacionadas à ecologia das espécies e informações complementares sobre a variabilidade genética e exigências para outros macro e micronutrientes. É perceptível que existem muitas perguntas em aberto, mas passos importantes foram dados. Espero ser bem sucedido em fazer com que outras pessoas se surpreendam o tanto quanto me surpreendi e me entusiasmei durante esta jornada.