

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Inóculo FMA *on farm*: desvendando o potencial funcional e diversidade microbiana associados ao cultivo de *Caesalpinia peltophoroides* Benth

Nicolly Alves Vieira
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

NICOLLY ALVES VIEIRA

Inóculo FMA *on farm*: desvendando o potencial funcional e diversidade microbiana associados ao cultivo de *Caesalpinia peltophoroides* Benth

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*.

Orientadora: Cynthia Canedo da Silva

Coorientadora: Marliane de C. S. da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

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

T

V658i
2025
Vieira, Nicolly Alves, 1995-
Inóculo FMA on farm: desvendando o potencial funcional e diversidade microbiana associados ao cultivo de *Caesalpinia peltophoroides* Benth / Nicolly Alves Vieira. – Viçosa, MG, 2025.

1 tese eletrônica (129 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.653>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Caesalpinia peltophoroides* - Inoculação.
2. Micro-organismos do solo. 3. Física do solo. 4. Química do solo. 5. Plantas e solo. 6. Genômica. 7. Vegetação - Classificação. I. Silva, Cynthia Canêdo da, 1978-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 583.74

NICOLLY ALVES VIEIRA

Inóculo FMA *on farm*: desvendando o potencial funcional e diversidade microbiana associados ao cultivo de *Caesalpinia peltophoroides* Benth

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: 18 de julho de 2025.

Assentimento:

Nicolly Alves Vieira
Autora

Cynthia Canedo da Silva
Orientadora

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 09/10/2025 às 18:10:31 e pela orientadora em 10/10/2025 às 05:17:09. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **KD3V.V4GS.5XC1** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todas as forças da natureza que nutrem minha força espiritual e me guiaram para a conclusão deste ciclo.

Aos meus amados pais, Nina e Francisco, por serem minha base sólida, doce e acolhedora, as raízes às quais sempre retorno e que me sustentam.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG por impulsionarem e viabilizarem o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade Federal de Viçosa, pela valiosa oportunidade de aprofundar meus estudos na pós-graduação.

Ao professor Vicente Casali, pela amizade e por tanto cuidado, além de ter sido a porta de entrada para o Departamento de Microbiologia Agrícola da UFV.

À minha orientadora, Cynthia Canedo da Silva, por todo o conhecimento transmitido, apoio incondicional e confiança depositada, por ter me recebido e acreditado no meu potencial.

Ao LAMAP, que se tornou mais que um laboratório, uma verdadeira segunda casa, onde me sinto tão bem acolhida e onde aprendo constantemente e troco saberes com meus amigos.

Um agradecimento especial ao Alex, Letícia, Lutécia, Naiara, Isabelle e Rodrigo, por todo o auxílio nas análises e por serem um apoio emocional fundamental neste momento tão especial da minha vida.

A todos os amigos que, literalmente, "puseram as mãos na terra" nesta jornada da minha pesquisa: Alex, Laura, Lutécia, Letícia, Isabelle, Beatriz, Bianca e todos que contribuíram diretamente nessa pesquisa.

Ao LAMIC, laboratório que marcou o início da minha jornada na microbiologia, não apenas pelos estudos com cogumelos comestíveis, mas por me deixar o valioso legado micorrízico, que agora, continuo a explorar em toda a sua riqueza.

Um agradecimento especial à minha primeira orientadora na Microbiologia – Maria Catarina Megumi Kasuya; à minha coorientadora Marliane de Cássia S. da Silva e aos amigos que foram cruciais na minha qualificação e na construção da minha tese, oferecendo apoio incondicional: Tomás, Paulo e Emiliane.

Ao Laboratório de Análise de Solo, Tecido Vegetal e Fertilizante e ao Prof. Igor Rodrigues de Assis, pela fundamental colaboração nas análises físico-químicas do solo e nutricionais das plantas, essenciais para esta pesquisa.

Aos meus amigos do vôlei, Gis, Nati, Mel, Talde, Luis, Gab, Thales, Tomás, Heitor e companhia ilimitada, que são essenciais para a manutenção da minha saúde mental.

Aos meus amigos d'O Bloco Viçosa, pelo forte sentimento de

pertencimento a Viçosa, que tanto me fortalece e revigora.

Ao meu companheiro Junio Ramos, que esteve comigo na montagem desse experimento em pleno natal de 2023 e esse foi só um exemplo do tamanho companheirismo.

À cidade de Viçosa e ao Paraíso, por terem sido meu porto seguro e lar durante todo o desenvolvimento desta pesquisa.

À comunidade Sagrado Corações, por todo o acolhimento, amizade e por abrigar aquela que considero minha segunda família: vó Isabel, Meira e as crianças.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

VIEIRA, Nicolly Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025. **Inóculo FMA on farm: desvendando o potencial funcional e diversidade microbiana associados ao cultivo de *Caesalpinia peltophoroides* Benth.** Orientadora: Cynthia Canedo da Silva. Coorientadora: Marliane de Cassia Soares da Silva.

A aplicação de bioinoculantes é uma estratégia promissora para a produção de mudas florestais a serem implementadas em programas de reabilitação de áreas degradadas. Dentre os bioinoculantes, destaca-se o inóculo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), obtido pelo método on farm, dado seu baixo custo de produção, sua viabilidade técnica e seu potencial de adaptação local. Este trabalho teve como objetivos desvendar os efeitos do inóculo de FMA on farm no crescimento de *Caesalpinia peltophoroides*, nas propriedades físico-químicas do solo rizosférico e nutricionais vegetais, elucidar o impacto do inóculo na modulação da comunidade microbiana rizosférica e investigar o seu potencial funcional. Com esse intuito, a pesquisa se moldou em uma abordagem multifacetada e complementar, partindo da avaliação de parâmetros biométricos e edáficos do sistema planta-solo, análise de diversidade microbiana por sequenciamento de amplicon (RNAr 16S e ITS), bem como a análise do potencial funcional por metagenômica shotgun aliada à reconstrução de genomas microbianos. Os resultados obtidos demonstraram benefícios significativos no crescimento de *C. peltophoroides*, com incrementos de até 299% na massa seca de raízes (de 2,15 g no controle para 8,30 g no tratamento inoculado), 137% na massa seca aérea (de 2,68 g para 6,34 g), e aumentos de 55% na altura total das plantas (de 44,7 cm para 69,0 cm). A colonização micorrízica atingiu 60% nas plantas inoculadas apenas com FMA on farm e 32% quando combinada com fertilização. Melhorias significativas foram observadas nas propriedades do solo, incluindo aumento da matéria orgânica, capacidade de troca catiônica e água disponível. A metataxonomia destacou nos tratamentos inoculados a presença de microrganismos como *Pirellula*, *Nitrosomonadaceae*, *Coniochaeta* e *Septoglomus*, associados à ciclagem de nutrientes, degradação de matéria orgânica e lignocelulose e à formação de micorriza arbuscular. Gêneros biomarcadores para o inóculo de FMA on farm em *C. peltophoroides* foram encontrados, gerando subsídios para monitoramento de sua eficácia e persistência. A metagenômica evidenciou uma especialização funcional da comunidade rizosférica, com menor número de genomas montados a partir de metagenomas desempenhando uma mesma função de forma eficiente. Com esses resultados, foi possível contribuir para a validação do FMA on farm, oferecendo insights para o

entendimento de como esse inoculante atua na promoção de crescimento de plantas e gerando dados acerca de sua diversidade microbiana associada. Assim, este trabalho corrobora com o potencial do FMA on farm enquanto bioinoculante sustentável e eficiente. Os dados fornecem uma base científica para a aplicação deste bioinoculante em *C. peltophoroides*, bem como implementá-lo em programas de reabilitação de áreas impactadas, abrindo caminhos também para o desenvolvimento de metodologias de rastreamento com base em biomarcadores microbianos.

Palavras-chave: fungos micorrízicos arbusculares; promoção de crescimento vegetal; metataxonomia; metagenômica

ABSTRACT

VIEIRA, Nicolly Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2025. **FMA inoculum on farm: uncovering the functional potential and microbial diversity associated with the cultivation of *Caesalpinia peltophoroides* Benth.** Adviser: Cynthia Canedo da Silva. Co-adviser: Marliane de Cassia Soares da Silva.

The application of bioinoculants is a promising strategy for the production of forest seedlings intended for use in degraded area rehabilitation programs. Among bioinoculants, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculum produced via the on farm method stands out due to its low production cost, technical feasibility, and potential for local adaptation. This study aimed to investigate the effects of on-farm AMF inoculum on the growth of *Caesalpinia peltophoroides*, the physicochemical properties of rhizospheric soil, and plant nutritional status; to elucidate the inoculum's impact on the modulation of the rhizospheric microbial community; and to explore its functional potential. To achieve these goals, the research adopted a multifaceted and complementary approach, encompassing the evaluation of biometric and edaphic parameters of the plant–soil system, microbial diversity analysis through amplicon sequencing (16S rRNA and ITS), and functional potential assessment via shotgun metagenomics combined with microbial genome reconstruction. The results demonstrated significant benefits to *C. peltophoroides* growth, with increases of up to 299% in root dry mass (from 2.15 g in the control to 8.30 g in the inoculated treatment), 137% in shoot dry mass (from 2.68 g to 6.34 g), and 55% in total plant height (from 44.7 cm to 69.0 cm). Mycorrhizal colonization reached 60% in plants inoculated solely with on-farm AMF and 32% when combined with fertilization. Significant improvements were observed in soil properties, including increases in organic matter, cation exchange capacity, and available water. Metataxonomic analysis revealed the presence of microorganisms such as *Pirellula*, *Nitrosomonadaceae*, *Coniochaeta*, and *Septoglomus* in inoculated treatments, associated with nutrient cycling, organic matter and lignocellulose degradation, and arbuscular mycorrhiza formation. Biomarker genera for the on-farm AMF inoculum in *C. peltophoroides* were identified, providing a foundation for monitoring its efficacy and persistence. Meta-genomic analysis highlighted functional specialization within the rhizospheric community, with fewer genomes assembled from metagenomes performing the same function efficiently. These findings contribute to the validation of the on-farm AMF inoculum, offering insights into how this bioinoculant promotes plant growth and generating data on its associated microbial diversity. Thus, this study supports the potential of

on-farm AMF as a sustainable and effective bioinoculant. The data provide a scientific basis for its application in *C. peltophoroides* and its implementation in rehabilitation programs for impacted areas, while also paving the way for the development of microbial biomarker-based tracking methodologies.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi; plant growth promotion; metataxonomy; metagenomics

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
Referências bibliográficas.....	16
CAPÍTULO 1	20
Inóculo <i>on farm</i> de fungos micorrízicos arbusculares promovem o crescimento de <i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth.....	20
1. Introdução	20
2. Material e Métodos	22
2.1. Local de estudo e condições experimentais.....	22
2.2. Obtenção do inóculo e preparo das mudas	22
2.2.1. Inóculo de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) por método <i>on farm</i>	22
2.2.2. Germinação das sementes e transplântio	23
2.3. Delineamento experimental e tratamentos.....	23
2.4. Avaliação do crescimento e nutrição das plantas	24
2.5. Análises físico-químicas do solo rizosférico	24
2.6. Avaliação da colonização micorrízica	25
2.7. Análises estatísticas	25
3. Resultados e Discussão	26
3.1. Parâmetros de crescimento das plantas.....	26
3.2. Parâmetros físicos e químicos do solo rizosférico.....	28
3.3. Parâmetros nutricionais (parte aérea e raiz).....	30
3.4. Colonização micorrízica	32
3.5. Análises multivariadas.....	34
4. Conclusões	42
5. Referências bibliográficas.....	43
6. Material Suplementar	51
CAPÍTULO 2	53
Dinâmica da comunidade microbiana e interações ecológicas na rizosfera de <i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth. frente à inoculação com FMA <i>on farm</i>	53
1. Introdução	53
2. Material e Métodos	55
2.1. Experimento em Casa de Vegetação	55
2.2. Análises de Crescimento, Colonização Micorrízica, Nutricionais e Físico-Químicas do solo rizosférico de estudo e condições experimentais	55
2.3. Delineamento experimental	56

2.4. Extração de DNA e envio para sequenciamento	57
2.5. Análise de dados de sequenciamento de amplicon.....	57
2.6. Análises estatísticas	58
2.7. Teste metodológico de <i>Fluorescent in Situ Hybridization</i> (FISH) em solo rizosférico	59
3. Resultados e Discussão	60
3.1. Análise de Correspondência Canônica (CCA) dos Perfis Microbianos e sua Relação com Fatores Ambientais e Biológicos	60
3.2. Diversidade e Composição Taxonômica das Comunidades Bacterianas e Fúngicas	62
3.3. Integração da Diversidade Beta e Análise de Biomarcadores: Efeitos Complementares das Condições Experimentais na Estrutura e Função da Comunidade Microbiana.....	65
3.4. Interação de ASVs Indicadoras.....	68
3.5. Teste Metodológico de <i>Fluorescent hybridization in situ</i> (FISH).....	71
4. Conclusões	76
5. Referências bibliográficas.....	77
CAPÍTULO 3	84
Especialização funcional da rizosfera de <i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth. inoculada com FMA <i>on farm</i> : otimização da comunidade microbiana para a promoção de crescimento... 84	
1. Introdução	84
2. Material e Métodos	85
2.1. Experimento em Casa de Vegetação	85
2.2. Delineamento Experimental	86
2.3. Extração de DNA e envio para sequenciamento	86
2.4. Análise de dados de sequenciamento de shotgun.....	87
3. Resultados e Discussão	89
3.1. Análise de Composição Taxonômica de <i>Reads</i>	89
3.2. Perfis Funcionais Metagenômicos.....	91
3.3. Análise de Composição Taxonômica de <i>MAGs</i>	95
3.4. Métricas de Diversidade Baseadas em <i>MAGs</i> (<i>Metagenome-Assembled Genomes</i>)	97
4. Conclusões	104
5. Referências bibliográficas.....	105
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111
REFERÊNCIAS.....	112

INTRODUÇÃO GERAL

Os microrganismos desempenham diversas funções importantes para o funcionamento dos ecossistemas e para a manutenção dos ciclos biogeoquímicos, auxiliando na decomposição, mineralização da matéria orgânica e disponibilização de nutrientes presentes no solo (Hannula *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2019; Doran & Parkin, 1994). Os bioinoculantes são produtos à base de células microbianas vivas ou em latência, que se multiplicam em condições favoráveis e atuam promovendo o crescimento das plantas, seja pela disponibilização de nutrientes ou pela melhoria do sistema de resistência vegetal (Baez-Rogelio *et al.*, 2017). Os principais benefícios de sua aplicação são a diminuição ou a eliminação total da utilização de adubos minerais ou sintéticos, trazendo uma redução dos custos da produção de mudas e o incremento da produtividade com um menor impacto ambiental (Pena Junior *et al.*, 2023). Além disso, em 2020 foi estabelecida a Minuta 02/2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que traz instruções normativas para registro de produtos microbiológicos, estimulando este mercado mais sustentável (MAPA, 2020). Recentemente, foi sancionada a Lei nº 15.070, de 23 de dezembro de 2024, que estabelece o marco regulatório para bioinsumos, incluindo produtos de origem microbiana e biotecnológica L15070, além de criar incentivos para sua produção e comercialização (BRASIL, 2024). Esta nova legislação estabelece um marco regulatório específico para bioinsumos, incluindo produtos, processos ou tecnologias de origem vegetal, animal ou microbiana, incluído o oriundo de processo biotecnológico, fortalecendo ainda mais o setor. Atualmente, há um aumento de 74% na produção de bioinsumos, contra apenas 3,7% no cenário dos defensivos agrícolas, e isso indica que até 2026, o mercado de produtos microbiológicos deverá atingir um faturamento de 18,5 bilhões de dólares (Goulet, 2021).

Dentre os bioinoculantes, a produção “*on farm*” de inoculantes à base de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) consiste em multiplicar esporos e hifas em culturas armadilha, dispensando infraestrutura de laboratório e reduzindo custos de comercialização. Esse tipo de inóculo é produzido por meio de uma coleta de amostra de solo contendo microrganismos indígenas de áreas de vegetação de mata nativa. Como parte da metodologia, eles são propagados em uma mistura de substrato contendo vermiculita e bagaço de cana, ou resíduos vegetais disponíveis, a fim de obter os microrganismos por sua multiplicação amparada pelos exsudatos liberados por uma planta hospedeira (Prates Júnior *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2008; Douds Jr *et al.*, 2006).

Os FMA atuam por meio de quatro principais mecanismos, que se complementam para promover crescimento vegetal e saúde do solo. Primeiro, a extensa rede de hifas extrarradiculares amplia a área de exploração das raízes, facilitando a obtenção de nutrientes pouco móveis, como fósforo e micronutrientes (Smith & Read, 2010; Chen *et al.*, 2018). Além disso, os FMA secretam enzimas, a exemplo de fosfatases, que mineralizam formas orgânicas de fósforo, tornando este nutriente disponível para a planta (Smith & Read, 2010). O terceiro mecanismo está relacionado à agregação do solo, pela produção de glomalina e exopolissacarídeos, melhorando a estabilidade estrutural e a capacidade de retenção de água da matriz do solo, o que se traduz em maior tolerância ao estresse hídrico e à erosão (Martins *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2014). E por fim, o estabelecimento da simbiose é ditado por interação química, em que, exsudatos (ex: estrigolactonas) atraem esporos e induzem o crescimento de hifas, enquanto sinais fúngicos (como fatores Myc) preparam as plantas hospedeiras para receber o fungo simbiote, coordenando a interação bidirecionada de carbono e nutrientes (Bonfante & Requena, 2011; Besserer *et al.*, 2006).

Os benefícios do inóculo de FMA incluem incremento de biomassa de mudas, maior absorção de fósforo e micronutrientes, além da tolerância ao estresse abiótico. Estudos em mudas florestais de *Caesalpinia peltophoroides*, *Schizolobium parahyba* e *Albizia niopoides* destacaram ganhos superiores a 50% em altura e diâmetro de planta, atribuídos à extensão da rede micelial que facilita o acesso a nichos e frações de nutrientes pouco móveis (Vieira, 2021).

Algumas das pesquisas com FMA *on farm* se relacionam à (a) padronização e controle de qualidade dos inoculantes, por contagem de esporos, viabilidade e pureza microbiológica, (b) otimização de substratos alternativos e resíduos agroindustriais para maximizar sua produção e aproveitar esses resíduos e (c) integração da aplicação com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR - *Plant Growth Promoting Rhizobacterias*) (Czerniak *et al.*, 2014). Há também crescente interesse na aplicação de FMA *on farm* em estratégias de fitorremediação, dada a sua capacidade de imobilizar metais pesados na rizosfera (Fayuan *et al.*, 2022). A definição de protocolos robustos, somada a regulamentações emergentes, são pontos importantes para a adoção desta tecnologia como bioinsumo sustentável.

O método de produção de FMA *on farm* apresenta como vantagem um menor investimento nas etapas de processamento, sejam elas relacionadas ao isolamento dos microrganismos e à mistura com o substrato de transporte, bem como seu manuseio, tendo em vista que os microrganismos já tendem a estarem adaptados em sua comunidade *on farm* (Moreira *et al.*, 2019; Schlemper & Sturmer, 2014). Além disso, existe o fato de que os produtos

microbiológicos são mais sustentáveis, alternativos ao uso de agroquímicos e fertilizantes prejudiciais ao ambiente (Maitra *et al.*, 2021). Este cenário é promissor para a aplicação dos microrganismos como bioinoculantes na promoção de crescimento de mudas florestais a serem destinadas aos processos de recuperação ambiental.

O plantio de mudas de espécies nativas é extremamente importante por reduzir o impacto ambiental causado pela devastação da vegetação e por auxiliar na recuperação das áreas degradadas e na recuperação de sua biodiversidade (Giannini *et al.*, 2017). Espécies florestais como *Caesalpinia peltophoroides* Benth., são nativas da Mata Atlântica e são bastante visadas nos processos de reflorestamento, por serem uma das primeiras espécies a surgirem em áreas degradadas (Cunha *et al.*, 2013). *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Fabaceae, Caesalpinioideae) é relatada como pioneira, secundária inicial, ou secundária tardia e ocorre com ampla distribuição na maioria dos estados brasileiros, no interior de florestas primárias densas e em formações abertas, podendo atingir de 8 a 20 m de altura (Lorenzi, 2009).

No contexto da recuperação de áreas impactadas, a revegetação encontra grandes desafios em relação à seleção, propagação e ao estabelecimento das mudas florestais que irão induzir o reestabelecimento e a resiliência do ecossistema, que culmina na sucessão natural (Carvalho *et al.*, 2018; Guimarães *et al.*, 2018).

Dada a codependência entre plantas e microrganismos, a sucessão microbiana durante o processo de revegetação é capaz de promover a restauração de solos impactados, mediante o fato de que os microrganismos do solo contribuem para a manutenção da diversidade e de seus serviços ecossistêmicos (Prado *et al.*, 2019; Jordão *et al.*, 2021). Sendo assim, os microrganismos, na forma de produtos microbiológicos podem ser utilizados na otimização da germinação de sementes, ou serem aplicados no transplante de plântulas, proporcionando melhoria do crescimento de espécies nativas (Moura *et al.*, 2016). Com esse manejo, é possível alcançar melhorias na qualidade das mudas, aliado à redução dos custos de produção e da utilização de produtos agroquímicos ofensivos ao ecossistema, garantindo maior sustentabilidade ao processo (Cunha *et al.*, 2013).

Ao se tratar da aplicação de bioinoculantes no solo para a promoção do crescimento de plantas, algumas questões surgem sobre a sua detecção, persistência, destino e o impacto do bioinoculante nas comunidades nativas do solo (Cornell *et al.*, 2021; Mawarda *et al.*, 2020). Para solucionar isso, os estudos de diversidade microbiana e ao rastreamento dos bioinoculantes aplicados representam uma ferramenta para compreender estas questões (Manfredini *et al.*, 2021).

Métodos baseados em DNA e RNA podem ser aplicados para monitorar o estabelecimento das interações que ocorrem na comunidade microbiana do solo (Cerqueira *et al.*, 2008). Os métodos independentes de cultura permitem a rastreabilidade de uma maior quantidade de grupos microbianos, sem que seja necessário cultivá-los isoladamente, facilitando o monitoramento do bioinoculante após sua aplicação (Hirsch *et al.*, 2010). Dentre as possíveis metodologias de monitoramento e detecção, o *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) é baseado na utilização de sondas oligonucleotídicas marcadas com fluorescência, que se ligam a sequências de ácidos nucleicos alvo de determinados microrganismos, possibilitando a detecção e até mesmo a identificação destes microrganismos em amostras ambientais (Schimak *et al.*, 2016).

Em paralelo aos estudos envolvendo o rastreamento dos bioinoculantes, a diversidade da comunidade microbiana pode ser abordada por sequenciamento de amplicon, avaliando estrutura da comunidade, suas funções e as redes ecológicas envolvidas no processo de promoção de crescimento das plantas (Pradhan *et al.*, 2020; Taberlet *et al.*, 2018; Simon *et al.*, 2011). A natureza não-estéril dos inóculos FMA *on farm*, que trazem consigo tanto fungos micorrízicos quanto uma ampla diversidade de microrganismos associados, exige métodos que capturem sua complexidade funcional, além da composição taxonômica. Para tanto, a metagenômica *shotgun* surge como ferramenta aliada. Ao sequenciar todo o DNA microbiano presente no inóculo e, principalmente, no solo rizosférico de plantas inoculadas com FMA *on farm*, é possível montar *contigs* e recuperar *metagenome-assembled genomes* (MAGs), permitindo a anotação de genes cruciais para promoção de crescimento vegetal – como aqueles relacionados à fixação de nitrogênio (*nif*), vias de biossíntese de exopolissacarídeos (*eps*), vias de produção de sideróforos e genes de síntese de auxinas, bem como determinantes de resistência a estresses abióticos (Quince *et al.*, 2017; Levy *et al.*, 2018; Albertsen *et al.*, 2013). Estudos iniciais que aplicaram a abordagem de metagenômica *shotgun* a consórcios bioinoculantes demonstraram a coexistência de múltiplas funções promotoras de crescimento mesmo em comunidades de alta diversidade, revelando sinergias entre FMA e bactérias como as PGPR (Freches *et al.*, 2024; Manfredini *et al.*, 2021; Goulart *et al.*, 2013). Integrando essas diversas análises, torna-se cada vez mais possível elucidar como ocorrem as interações no contexto do FMA *on farm*, os mecanismos envolvidos e, concomitante, validar este tipo de bioinóculo (Lasa *et al.*, 2019).

Apesar dos resultados promissores da promoção de crescimento vegetal a partir da inoculação com FMA *on farm*, lacunas persistem em relação aos seus efeitos sobre a microbiota

do solo, a dinâmica de colonização radicular e os mecanismos e interações funcionais que sustentam esses ganhos. Para auxiliar a preencher essas lacunas, esta tese foi estruturada em três capítulos correlacionados, em que, cada um deles aborda uma faceta da inoculação com FMA *on farm* em *C. peltophoroides*.

O Capítulo 1 teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação com FMA *on farm* nos parâmetros de crescimento vegetal, na nutrição das plantas e nas propriedades físico-químicas do solo rizosférico. Por meio de medições de altura, diâmetro, biomassa e volume radicular, além de análises de colonização micorrízica e teores de nutrientes, buscou-se quantificar os benefícios diretos da inoculação. Além disso, a caracterização do solo rizosférico, incluindo parâmetros físico-químicos do solo e nutricionais das plantas, permitiu entender como os FMA modificam o ambiente em torno das raízes.

No Capítulo 2, o foco se concentrou na diversidade microbiana associada à rizosfera de *C. peltophoroides* inoculada com FMA *on farm*. Utilizando sequenciamento de *amplicons* (16S rRNA e ITS), este capítulo explorou como a inoculação altera a composição taxonômica das comunidades bacterianas e fúngicas, identificando táxons indicadores e biomarcadores associados ao inóculo, além de correlacionar essa comunidade e seu impacto nos aspectos físico-químicos nas diversas condições experimentais. A análise de redes ecológicas e a detecção de ASVs (*amplicon sequence variants*) específicas proporcionou a interpretação de padrões de co-ocorrência e interações microbianas favorecidas pela simbiose com FMA *on farm*.

O Capítulo 3 avançou para uma perspectiva funcional, empregando metagenômica *shotgun* para investigar o potencial metabólico das comunidades microbianas no Substrato, no solo enriquecido com inóculo, no solo rizosférico controle e no de plantas inoculadas. A reconstrução de genomas microbianos a partir de metagenoma (*MAGs - Metagenome-Assembled Genomes*) permitiu identificar genes envolvidos em processos básicos e em processos-chave, como fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo, produção de hormônios vegetais e resistência a estresses abióticos.

Ao integrar essa abordagem multifacetada, esta tese buscou demonstrar a eficiência do uso de FMA *on farm* na produção de mudas florestais e elucidar os mecanismos e interações microbianas relacionadas a seus benefícios. Os resultados contribuirão para o reconhecimento do FMA *on farm* como bioinoculante promissor e para a otimização de estratégias de

reabilitação de áreas impactadas, reforçando o papel da microbiologia do solo na produção de mudas florestais mais robustas.

Referências bibliográficas

- ALBERTSEN, M. *et al.* Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 533–538, 2013.
- BAEZ-ROGELIO, A. *et al.* Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 19–21, 2017.
- BESSERER, A. *et al.* Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. **PLoS Biology**, v. 4, n. 7, p. e226, 2006.
- BONFANTE, P.; REQUENA, N. Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 451–457, 2011.
- BRASIL. **Lei nº 15.070**, de 23 de dezembro de 2024. Institui o marco legal dos bioinsumos. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/marcoregulatorio-1/marco-regulatorio-lei-no-15-070-de-23-de-dezembro-de-2024>.
- CARVALHO, F. A. *et al.* Restauração ecológica e recuperação de áreas degradadas. In: FERNANDES, L. A. (org.). **Restauração florestal: fundamentos e estudos de caso**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2018. p. 27–49.
- CERQUEIRA, L. *et al.* DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1944–1960, 2008.
- CHEN, M. *et al.* Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi—from ecology to application. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1270, 2018.
- CUNHA, T. S. *et al.* Propagação de mudas de espécies nativas no contexto de restauração florestal. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 36, n. 3, p. 123–130, 2013.
- CZERNIAK, M. J. & STÜRMER, S. L. Produção de inoculante micorrízico *on farm* utilizando resíduos da indústria florestal. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 1712–1721, 2014.
- DOUDS JR, D. D. *et al.* On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 809–818, 2006.

- DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W. *et al.* (ed.). **Defining Soil Quality for a Sustainable Environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 3–21.
- FAYUAN, W. *et al.* Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and soil amendments to remediation of a heavy metal-contaminated soil using sweet sorghum. **Pedosphere**, v. 32, n. 6, p. 844–855, 2022.
- FRECHES, A. *et al.* The biotechnological potential of the Chloroflexota phylum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 90, n. 1, p. e01756–23, 2024.
- GAUR, A. C.; SACHIN, S.; SUNITA, S. On-farm production of inoculum of plant growth promoting rhizobacteria. **Indian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 8–12, 2000.
- GIANNINI, T. C. *et al.* Selecting plant species for practical restoration of degraded lands using a multiple-trait approach. **Austral Ecology**, v. 42, n. 5, p. 510–521, 2017.
- GOULART, K. C. S. *et al.* Metagenômica aplicada à biotecnologia. **Ciência & Tecnologia**, v. 5, p. 1–12, 2013.
- GOULET, F. Characterizing alignments in socio-technical transitions: lessons from agricultural bio-inputs in Brazil. **Technology in Society**, v. 65, p. 101580, 2021.
- GUIMARÃES, A. P. *et al.* Sucessão florestal e práticas de restauração no bioma Cerrado. In: FERNANDES, L. A. (org.). **Restauração florestal: fundamentos e estudos de caso**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2018. p. 123–145.
- HIRSCH, P. R. *et al.* Moving beyond molecular markers to quantify microbial contributions to ecosystem processes. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 207–218, 2010.
- JORDÃO, T. C. *et al.* Shifts in arbuscular mycorrhizal fungal properties due to vegetative remediation of mine spoil contamination from a dam rupture in Mariana, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 162, p. 103885, 2021.
- LASA, A. V. *et al.* Metabarcoding reveals that rhizospheric microbiota of *Quercus pyrenaica* is composed by a relatively small number of bacterial taxa highly abundant. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1695, 2019.
- LEE, S. *et al.* Effects of organic farming on communities of arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycobiology**, v. 36, n. 1, p. 19–23, 2008.
- LEVY, A. *et al.* Elucidating bacterial gene functions in the plant microbiome. **Cell Host & Microbe**, v. 24, p. 475–485, 2018.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. v. 1.

- MAITRA, S. *et al.* Bioinoculants—Natural biological resources for sustainable plant production. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 51, 2021.
- MANFREDINI, A. *et al.* Current methods, common practices, and perspectives in tracking and monitoring bioinoculants in soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 698491, 2021.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta n.º 02, de 29 de janeiro de 2020. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 jan. 2020, Seção 1, p. 102.
- MARTINS, A. P. B. *et al.* Inoculação de Microrganismos Eficientes (EM) e Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) em alface: um trabalho de campo conduzido na horta comunitária Vapabuçu, Sete Lagoas—MG. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, 2018.
- MAWARDA, A. A. *et al.* Soil microbiome manipulation by pesticides and its effects on plant health. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 6, p. 482–491, 2020.
- MOREIRA, B. C. *et al.* Effect of inoculation of pineapple plantlets with arbuscular mycorrhizal fungi obtained from different inoculum sources multiplied by the on-farm method. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 43, 2019.
- MOURA, F. H. *et al.* Otimização da germinação de sementes de espécies nativas através de bioinoculantes. **Floresta**, v. 46, n. 2, p. 123–132, 2016.
- PENA JUNIOR, M. A. G. *et al.* O futuro da agricultura brasileira: 10 visões. Brasília: **Embrapa**, 2023.
- PRADHAN, S. K. *et al.* Illumina MiSeq based assessment of bacterial community structure and diversity along the heavy metal concentration gradient in Sukinda chromite mine area soils, India. **Ecological Genetics and Genomics**, v. 15, p. 100054, 2020.
- PRATES JÚNIOR, P. *et al.* Micorrizas arbusculares: conceitos, metodologias e aplicações. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Núcleo Regional Leste, MG, 2021.
- QUINCE, C. *et al.* Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, v. 35, p. 833–844, 2017.
- RIBEIRO, L. F.; OLIVEIRA, D. E.; FARIA, L. C. Produção de inoculante micorrízico *on farm* utilizando resíduos da indústria florestal. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 6, p. 1894–1904, 2014.
- SCHLEMPER, T. R.; STÜRMER, S. L. On-farm production of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum using lignocellulosic agrowastes. **Mycorrhiza**, v. 24, p. 571–580, 2014.

SCHIMAK, M. P. *et al.* MiL-FISH: multilabeled oligonucleotides for fluorescence in situ hybridization improve visualization of bacterial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 62–70, 2016.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153–1161, 2011.

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

TABERLET, P. *et al.* Environmental DNA: for biodiversity research and monitoring. Oxford: Oxford University Press, 2018.

TEIXEIRA, A. F. S. *et al.* Microbiological indicators of soil quality under native forests are influenced by topographic factors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, e20180543, 2019.

VIEIRA, N. A. Promoção de crescimento de espécies florestais a partir da triagem e inoculação de consórcios microbianos. 2021. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CAPÍTULO 1

Inóculo *on farm* de fungos micorrízicos arbusculares promovem o crescimento de *Caesalpinia peltophoroides* Benth.

1. Introdução

A degradação ambiental é um dos maiores desafios nos tempos atuais, exigindo soluções inovadoras e eficientes para a recuperação de ecossistemas (IPCC, 2023). Nesse contexto, a aplicação de microrganismos promotores de crescimento de plantas para o melhor desempenho de mudas de espécies florestais nativas, representa uma alternativa ecológica e sustentável.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR - plant growth promoting rhizobacterias), entre outros microrganismos, se destacam por serem capazes de se associarem às plantas e as beneficiarem com a disponibilização de nutrientes (Smith & Read, 2010; Chen *et al.*, 2018), aumento da resistência ao estresse abiótico (Bahadur *et al.*, 2019) e no controle biológico de pragas e doenças (Basu *et al.*, 2021). Contribui ainda, para melhoria da estrutura do solo através da agregação (Rillig *et al.*, 2017) e remediação de solos pobres ou degradados, contribuindo para a sua recuperação e saúde (Son *et al.*, 2024; Matos *et al.*, 2022; Pan *et al.*, 2020).

Durante o processo de recuperação do solo, a sucessão microbiana sustentada pela revegetação é uma das ferramentas mais importantes para a restauração da qualidade do solo (Prado *et al.*, 2019; Jordão *et al.*, 2021). O plantio de mudas é o método de recuperação mais utilizado, potencializando o uso de espécies de diferentes grupos sucessionais e melhor adaptados às condições locais (Qin *et al.*, 2023; Martins *et al.*, 2020). No entanto, ainda existem desafios em relação à seleção, propagação e ao estabelecimento de mudas florestais. Portanto, a produção de bioinoculantes envolvendo FMA e PGPR tem sido apontado como principal biotecnologia para a produção de mudas mais desenvolvidas e com maior potencial de sobrevivência nas condições de campo (Shuab *et al.*, 2017).

Dentre as plantas estudadas, destacamos avisadas, *Caesalpinia peltophoroides* Benth., que se trata de uma espécie florestal nativa da Mata Atlântica, pertencente à família Caesalpinioideae (Pusztahelyi *et al.*, 2015; Lorenzi, 2009). Esta espécie foi selecionada devido ao seu crescimento rápido e caráter pioneiro, sendo uma das primeiras a se estabelecer em áreas impactadas, características que a tornam interessante nos processos de revegetação, somado à

disponibilidade de sementes para a execução do experimento (Giannini *et al.*, 2017). Quanto à dependência micorrízica, *C. peltophoroides* apresenta plasticidade simbiótica, podendo estabelecer diferentes tipos de associações micorrízicas. Siqueira e Saggin-Junior (2001) relataram baixa colonização por *Glomus etunicatum* em determinadas condições, sugerindo dependência variável de FMAs. Por outro lado, Steffen *et al.* (2012) demonstraram que a espécie pode formar associações ectomicorrízicas com *Pisolithus microcarpus*, indicando capacidade de estabelecer múltiplos tipos de simbiose micorrízica dependendo das condições ambientais e dos microrganismos disponíveis.

Considerando essa capacidade simbiótica variável de *C. peltophoroides*, torna-se relevante avaliar o uso de bioinoculantes à base de FMA como estratégia para potencializar o desenvolvimento das mudas dessa espécie em ambientes de revegetação. Os bioinoculantes à base de FMA, produzidos pelo método *on farm*, apresentam potencialidade na aplicação em mudas florestais, com menor custo de produção e uma alta diversidade de microrganismos, podendo, portanto, ampliar o leque de mecanismos de promoção de crescimento e estimular a planta de maneira mais eficaz (Moreira *et al.*, 2019). Além disso, do ponto de vista ecológico, estes bioinoculantes são mais sustentáveis por serem alternativos ao uso de sintéticos e minerais (Maitra *et al.*, 2021).

Nesse contexto, estudos experimentais têm buscado validar a eficácia desses bioinoculantes em diferentes espécies florestais, incluindo *C. peltophoroides*, a fim de compreender seu impacto no crescimento vegetal e na dinâmica simbiótica com o solo. Em uma pesquisa realizada por Vieira, (2021) no Laboratório de Microbiologia Aplicada Ambiental (LAMAP), com sede na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, foram evidenciados resultados relevantes acerca da promoção de crescimento das espécies florestais *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake, *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth.) Burkart e *Caesalpinia peltophoroides* Benth. devido à aplicação de bioinoculante de FMA *on farm*. Foi observado um aumento de, mais de 50 % na altura, diâmetro e massa seca da parte aérea das plantas avaliadas. No entanto, é necessário elucidar os aspectos relacionados ao funcionamento deste inóculo no sistema de interação entre solo-planta. Além do estudo conduzido por Vieira (2021), outras pesquisas também evidenciam o potencial da inoculação com FMA no crescimento da sibipiruna. Vergara *et al.* (2018) analisaram a resposta de *C. peltophoroides* à inoculação com diferentes fungos promotores de crescimento, incluindo FMA, e observaram melhorias significativas na absorção de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio, associadas à

atividade de H⁺-ATPases e transportadores específicos envolvidos na simbiose. Esses resultados reforçam a importância da interação simbiótica na eficiência nutricional da planta, contribuindo para seu desenvolvimento em ambientes de baixa fertilidade.

Nesse sentido, a hipótese desse trabalho é que a inoculação com FMA *on farm* promove alterações físico-químicas benéficas no solo rizosférico, aumenta a disponibilidade de nutrientes para a planta e favorece o crescimento de *C. peltophoroides* Benth.

Portanto, o objetivo deste capítulo foi investigar como o inóculo de FMA *on farm* promove o maior crescimento de plantas da espécie florestal *C. peltophoroides* Benth., avaliando os aspectos físico-químicos do solo rizosférico, o estado nutricional das plantas e de colonização micorrízica.

2. Material e Métodos

2.1. Local de estudo e condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Microbiologia Agrícola da UFV, localizada em Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°45'28.8"S 42°52'13.7"W). Nesta região o clima é do tipo “Cwa”, segundo a classificação de Köppen (1948), caracterizado por verões chuvosos e invernos secos.

2.2. Obtenção do inóculo e preparo das mudas

2.2.1. Inóculo de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) por método *on farm*

O inóculo de FMA foi obtido junto ao Laboratório de Associações Micorrízicas da Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais, Brasil), por meio da microempresa Cogumê Biotecnologia, produzido pelo método *on farm* conforme metodologia descrita por Prates Júnior *et al.* (2021). Neste método, os esporos de FMA presentes no solo de uma região nativa são multiplicados em vasos utilizando plantas de *Sorghum bicolor* como hospedeiras multiplicadoras.

O método *on farm* foi selecionado por apresentar vantagens como maior diversidade de espécies de FMA e menor custo de produção em comparação aos inóculos monoespecíficos. Esta diversidade funcional pode proporcionar múltiplos mecanismos de promoção de crescimento vegetal. As espécies de FMA identificadas no inóculo *on farm* incluem *Paraglomus albidum*, *Paraglomus brasilianum* e *Claroideoglomus etunicatum*, confirmadas desde a primeira obtenção do inóculo.

2.2.2. Germinação das sementes e transplântio

As sementes de arbóreas nativas da espécie *C. peltophoroides* Benth., foram obtidas em parceria com a Sociedade de Investigações Florestais (SIF) da UFV. As sementes foram submetidas ao processo de desinfecção superficial (álcool 70 % e hipoclorito de sódio 2 %) e posteriormente germinadas em areia autoclavada.

Após aproximadamente 14 dias de germinação, as plântulas foram transplantadas para tubetes contendo um substrato preparado a partir de uma mistura de solo horizonte B textural em mistura com areia (proporção), escolhido por ser um substrato básico, que permitiu avaliar o crescimento vegetal impulsionado pela inoculação. Este substrato foi utilizado puro (para os tratamentos C1 e T1), ou com a adição de 30 % de inóculo de FMA (para os tratamentos T2 e T3; Tabela 1). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, durante 6 meses, visando um tempo de manutenção provável para verificar a formação da simbiose micorrízica. As plantas foram irrigadas diariamente a fim de se manter o teor de umidade do substrato a cerca de 60 % da capacidade de campo. A cada sete dias, foram realizadas fertilizações com solução nutritiva de Clarck (1975), utilizando 1/2 da força, para os tratamentos específicos (T1 e T3).

2.3. Delineamento experimental e tratamentos

Para avaliar os efeitos da fertilização e da inoculação com o inóculo *on farm* no crescimento e estado nutricional de *C. peltophoroides*, foi estabelecido um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições por tratamento, nas análises *in vivo*. Nas análises moleculares foram utilizadas três repetições por tratamento.

O tratamento C1 constituiu o controle, composto por substrato e planta, representando as condições basais de crescimento vegetal. O tratamento T1 foi definido pela adição de fertilização ao sistema substrato e planta, visando avaliar o impacto da suplementação nutricional. O tratamento T2 consistiu na combinação de substrato, planta e inoculação, com o objetivo de investigar a influência isolada do inóculo. Por fim, o tratamento T3 integrou substrato, planta, inoculação e fertilização, com o propósito de examinar a interação entre esses dois fatores. Esses tratamentos foram estruturados para permitir a análise comparativa do efeito da fertilização, do inóculo e da combinação de ambos sobre os parâmetros avaliados

2.4. Avaliação do crescimento e nutrição das plantas

Ao final do experimento em casa de vegetação (seis meses de cultivo, foram mensurados os seguintes parâmetros de crescimentos das plantas: volume das raízes (mL), diâmetro do caule (mm), altura da base do caule até a gema apical (cm) e altura radicular (cm). O material vegetal (parte aérea e raízes) foi lavado, seco em estufa com circulação de ar forçada a 65 °C até peso constante para obtenção da massa seca. Amostras do material vegetal seco foram enviadas para o Laboratório de Análise Rotina de Solo e Planta do Departamento de Solos da UFV, onde foram submetidas a análises nutricionais para determinação dos teores de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Cu e B). O teor de N foi determinado, após digestão sulfúrica pelo Método Kjeldahl (Bremner & Mulvaney, 1982) e K, Ca, Mg, P, S, Zn e Cu, após digestão nitroperclórica na proporção de 3:1 (Johnson & Ulrich, 1959).

2.5. Análises físico-químicas do solo rizosférico

Amostras do solo rizosférico foram coletadas ao final do experimento e submetidas às análises físico-químicas no Laboratório de Rotina de Análise de Solo e Planta do Departamento de Solos da UFV. As análises seguiram a metodologia de rotina do laboratório para determinação de pH em água. P e K, foram extraídos utilizando o extrator Mehlich-1. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , o extrator KCl 1 mol/L e H+Al, utilizando extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L a pH 7,0. Foi quantificado ainda a soma de bases trocáveis (SB), a capacidade de troca de catiônica efetiva (t) e a pH 7,0 (T), Índices de saturação por bases (V) alumínio (m), P-rem (Fósforo remanescente), matéria orgânica (g/kg) e granulometria (areia, silte, argila em %) e

argila dispersa em água (AD), determinada conforme metodologia descrita por Teixeira *et al* (2017), que consiste na agitação do solo em água destilada seguida de quantificação da argila dispersa por turbidimetria.

2.6. Avaliação da colonização micorrízica

As raízes das plantas foram coletadas, lavadas em água corrente e armazenadas à temperatura ambiente em tubos Falcon de 50 mL, contendo 20 mL de solução de formaldeído, ácido acético, álcool etílico (FAA) na proporção 10:5:50 (v:v:v). Essas amostras foram submetidas ao processo de descoloração e posteriormente à coloração com azul de tripano em lactoglicerol, como descrito por Phillips & Hayman (1970).

A colonização micorrízica foi averiguada utilizando o Microscópio EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) aumento final de 200X. Estruturas fúngicas como arbúsculos, hifas, vesículas e esporos foram consideradas como positivas na análise de colonização micorrízica.

2.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no *software* R (versão 4.4.2), utilizando a interface *RStudio* (versão 2024.12.1) (R Core Team 2024). Para verificar a normalidade dos dados de cada parâmetro avaliado, foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Para os dados que apresentaram distribuição normal, a Análise de Variância (ANOVA) foi realizada, e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey. Na ausência de normalidade, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparação post hoc ($p < 0,05$). O pacote "*agricolae*" foi utilizado nessas avaliações.

Para as análises estatísticas multivariadas, utilizou-se o pacote "*vegan*" (Oksanen *et al.*, 2022) no ambiente R. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi conduzida integrando dados físicos e químicos do solo com parâmetros de crescimento das plantas. A PCA foi realizada utilizando matriz de correlação para redução dimensional e identificação dos principais fatores que explicam a variabilidade dos dados. As diferenças estatísticas entre os tratamentos foram verificadas mediante Análise de Variância Multivariada Permutacional

(PERMANOVA - *Permutational Multivariate Analysis of Variance*) utilizando a função Adonis, seguida de correção múltipla pelo teste de Bonferroni. Complementarmente, empregou-se o Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) para visualização da ordenação dos dados baseada na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis. O Fator de Inflação de Variância (VIF - *Variance Inflation Factor*) foi aplicado para detecção de multicolinearidade entre as variáveis e garantia da adequabilidade do modelo estatístico (Akinwande *et al.*, 2015). Todas as análises foram executadas no software R utilizando o pacote “*vegan*” (Oksanen *et al.*, 2022).

3. Resultados e Discussão

3.1. Parâmetros de crescimento das plantas

A análise dos parâmetros de crescimento vegetal em *C. peltophoroides* revelou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos avaliados (Figura 1; Tabela 1 Suplementar).

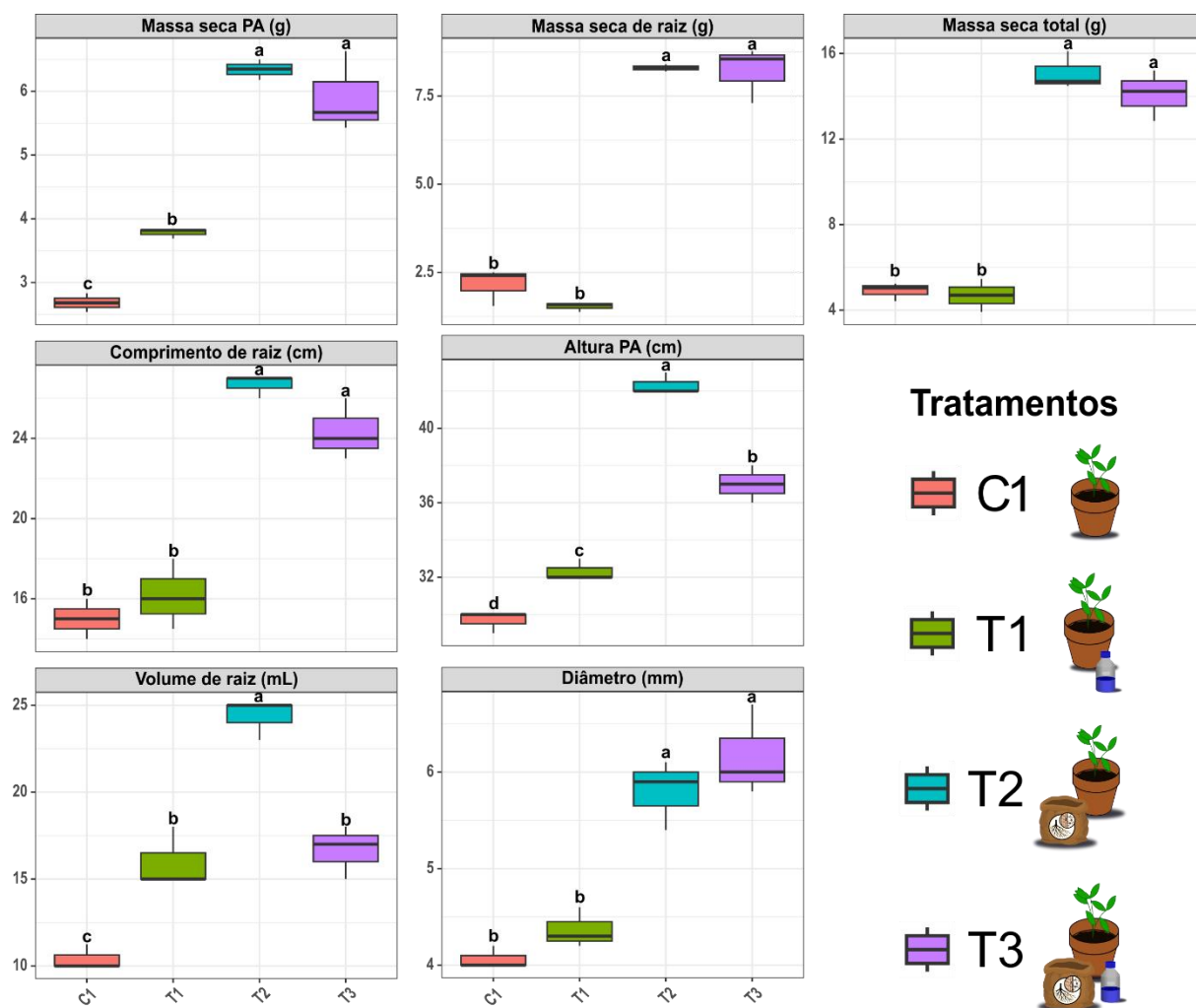


Figura 1: Parâmetros de crescimento de *C. peltophoroides* Benth. submetida a diferentes tratamentos: C1 (controle), T1 (fertilização Clark), T2 (inoculação com FMA *on farm*) e T3 (FMA *on farm* + fertilização Clark). Valores representam médias \pm erro padrão (n=5). Letras

distintas (a, b, c) indicam diferenças significativas entre tratamentos pelos testes de comparação de médias ($p < 0,05$).

Com base na Figura 1 e na Tabela 1-MS, foi notável que os incrementos mais expressivos ocorreram na biomassa radicular e na massa fresca aérea. No tratamento T2, a massa fresca de raízes atingiu 20,42 g (versus 5,12 g em C1 e 4,35 g em T1), e a massa seca de raízes alcançou 8,30 g (contra 2,15 g e 1,53 g, respectivamente). Ainda em T2, a massa fresca da parte aérea foi de 14,99 g (5,27 g em C1; 7,18 g em T1) e a altura total das plantas chegou a 69,0 cm (44,7 cm em C1; 48,5 cm em T1). No tratamento T3, esses valores também se mantiveram elevados: massa fresca de raízes de 20,50 g, massa seca de raízes de 8,21 g, massa fresca aérea de 13,57 g e altura total de 61,3 cm. Esses resultados destacam que a inoculação com FMA *on farm*, isolada ou combinada à fertilização, promoveu com sucesso o desenvolvimento da planta.

3.2. Parâmetros físicos e químicos do solo rizosférico

A análise estatística dos parâmetros físico-químicos do solo evidenciou efeitos distintos entre os tratamentos aplicados (C1 – controle; T1 – fertilização; T2 – inóculo FMA *on farm*; T3 – inóculo + fertilização) (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros físicos e químicos do solo das amostras coletadas sob diferentes tratamentos experimentais. Incluem-se pH, fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), matéria orgânica (MO), fósforo remanescente (P-rem), soma de bases (SB), acidez potencial (H+Al), capacidade de troca catiônica (T) e saturação por bases (V%) e argila dispersa em água (AD). Análise estatística dos parâmetros físico-químicos do solo sob diferentes tratamentos experimentais (C1, T1, T2, T3). A significância foi avaliada por ANOVA ($p < 0,05$) e, quando aplicável, o teste de comparação múltipla de Tukey foi utilizado para agrupar os tratamentos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos para cada variável.

Propriedades	C1	T1	T2	T3
--------------	----	----	----	----

pH em H₂O	7,06 ns	7,1 ns	7,06 ns	7,13 ns
P (mg/dm³)	17,13 ab	18,2 a	17,73 ab	16,06 b
K (mg/dm³)	54,33 b	45,16 b	71 ab	91,66 a
Ca²⁺ (cmol_c/dm³)	1,95 ns	1,86 ns	1,96 ns	2,19 ns
Mg²⁺ (cmol_c/dm³)	0,61 c	0,61 c	1,73 b	2,73 a
MO (%)	0,65 b	0,50 b	0,99 a	1,00 a
H+Al (cmol_c/dm³)	0,6 b	1,17 b	1,37 a	1,4 a
SB (cmol_c/dm³)	2,71 c	2,68 c	8,73 a	5,16 b
T (cmol_c/dm³)	3,31 c	3,85 c	10,09 a	6,90 b
V (%)	81,87 a	70,47 b	86,47 a	74,10 b
P-rem (mg/L)	40,47 ns	38,00 ns	39,70 ns	40,93 ns
Areia grossa (kg/kg)	0,67 ns	0,68 ns	0,67 ns	0,63 ns
Areia fina (kg/kg)	0,10 a	0,10 a	0,09 ab	0,06 b
Silte (kg/kg)	0,04 b	0,03 b	0,04 b	0,07 a
Argila (kg/kg)	0,19 b	0,18 b	0,20 b	0,24 a
Argila Dispersa em Água (AD, mm/cm)	0,72 b	0,68 b	0,76 b	0,89 a

O pH do solo não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando estabilidade nos níveis de acidez independentemente do manejo. Em contrapartida, as concentrações de potássio (K) foram significativamente mais elevadas no tratamento T3, seguidas por T2, enquanto C1 e T1 apresentaram os menores valores. O magnésio (Mg²⁺) e a matéria orgânica (MO) também apresentaram maiores teores nos tratamentos T2 e T3, destacando-se em relação ao controle.

A variável fósforo disponível (P) mostrou diferença significativa entre os tratamentos, com valores superiores em T1. Por outro lado, o fósforo remanescente (P-rem) não apresentou diferença significativa. A soma de bases (SB), a capacidade de troca catiônica (T) e a saturação

por bases (V%) foram maiores em T2, seguidas por T3, sendo C1 e T1 os tratamentos com os menores valores. A acidez potencial (H+Al) foi mais elevada nos tratamentos com inóculo (T2 e T3), embora as diferenças também tenham sido significativas em relação ao controle.

Nos aspectos físicos do solo, foi observado que o tratamento T3 apresentou maiores teores de argila e silte, diferenciando-se texturalmente dos demais. No entanto, T2 e T3 foram classificados como solos argilo-arenosos. O tratamento T3 também apresentou a maior quantidade de argila dispersa em água (AD), estatisticamente superior aos demais tratamentos. O conteúdo de areia fina foi significativamente menor em T3, acompanhando o aumento das frações mais retentoras de água.

3.3. Parâmetros nutricionais (parte aérea e raiz)

Foram avaliados os parâmetros nutricionais de parte aérea (pa) e raiz (ra) das plantas de *C. peltophoroides* sob os diferentes tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3: Análise estatística dos parâmetros nutricionais em plantas de *C. peltophoroides*, em Parte aérea (pa) e raiz (ra), sob diferentes tratamentos (C1, T1, T2, T3). Foram aplicados ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância. Tratamentos que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente entre si para cada parâmetro.

Parâmetros nutricionais	C1	T1	T2	T3
N _{pa} (dag/kg)	0,68 ab	0,90 a	0,68 b	0,76 ab
N _{ra} (dag/kg)	0,65 a	0,57 ab	0,47 b	0,54 b
P _{pa} (dag/kg)	0,10 b	0,12 ab	0,14 a	0,12 ab
P _{ra} (dag/kg)	0,05 ns	0,06 ns	0,06 ns	0,06 ns
K _{pa} (dag/kg)	0,61 ns	0,62 ns	0,60 ns	0,63 ns
K _{ra} (dag/kg)	0,48 a	0,41 ab	0,39 b	0,39 b
Ca _{pa} (dag/kg)	1,50 b	430,29 a	0,97 c	0,83 c

Ca_pa (dag/kg)	0,76 a	0,69 a	0,47 b	0,51 b
Mg_pa (dag/kg)	0,13 b	0,12 b	0,15 ab	0,16 a
Mg_ra (dag/kg)	0,11 b	0,10 b	0,22 ab	0,12 a
Fe_pa (mg/kg)	121,37 b	136,40	268,91	128,66
Fe_ra (mg/kg)	4366,66 a	4435,43 a	3912,66 a	2961,33 b
Zn_pa (mg/kg)	6,70 b	2153,64 a	10,20 a	9,54 a
Zn_ra (mg/kg)	16,90 ab	19,41 a	13,70 b	13,59 b
Mn_pa (mg/kg)	66,02 b	73,66 b	18823,95 a	37,80 b
Mn_ra (mg/kg)	65,76 a	54,44	52,34	33,91
Cu_pa (mg/kg)	2,51 b	1431,27 a	420,13 a	2,66 b
Cu_ra (mg/kg)	9,02 a	9,58 a	7,77 ab	6,38 b
Ni_pa (mg/kg)	0,00 b	0,00 b	0,61 a	0,49 a
Ni_ra (mg/kg)	3,35 b	3,23 b	13,15 a	5,18 ab
Cr_pa (mg/kg)	0,31 b	0,40 b	1,03 a	0,77 a
Cr_ra (mg/kg)	3,15 b	3,91 b	24,20 a	7,41 ab
Pb_ra (mg/kg)	1,04 ab	1,36 a	1,34 a	0,57 b

O teor de nitrogênio na parte aérea (N_pa) foi significativamente superior no tratamento T1, indicando maior resposta ao fornecimento direto de fertilizante. No entanto, a menor concentração foi observada em T2, enquanto T3 e C1 apresentaram valores intermediários. Para o nitrogênio na raiz (N_ra), o maior acúmulo ocorreu em C1, seguido por T1, com redução expressiva nos tratamentos inoculados.

Em relação ao fósforo (P_pa), o tratamento T2 apresentou os maiores teores na parte aérea, com diferença significativa em relação ao controle. Já para o potássio na raiz (K_ra), C1 foi estatisticamente superior aos demais, que apresentaram reduções gradativas.

O tratamento T1 destacou-se com o maior valor de cálcio na parte aérea (Ca_pa), enquanto T2 e T3 apresentaram os menores teores. Para o magnésio, houve incremento na parte aérea em T3 e nas raízes em T2, com diferenças significativas entre os tratamentos.

Para os micronutrientes, observou-se maior concentração de ferro (Fe_{pa}) e zinco (Zn_{pa}) na parte aérea dos tratamentos T1 e T2. O tratamento 3 apresentou menor acúmulo de ferro na raiz (Fe_{ra}). A absorção de manganês (Mn_{pa}) foi mais expressiva em T2, enquanto sua concentração na raiz (Mn_{ra}) foi significativamente reduzida em T3. Além disso, T2 e T3 apresentaram as maiores concentrações de níquel (Ni) e cromo (Cr), tanto na parte aérea quanto na raiz, sugerindo possível mobilização desses elementos por mecanismos mediados pelo FMA. Para o cobre (Cu_{pa}), T1 e T2 foram superiores a C1 e T3.

Esses dados evidenciam o papel da fertilização e da inoculação FMA *on farm* na dinâmica de absorção de macro e micronutrientes, com destaque para os efeitos sinérgicos em T3 e os possíveis mecanismos de redistribuição de nutrientes entre parte aérea e raiz no sistema planta-solo, bem como a possível utilização destes nutrientes pela microbiota rizosférica.

3.4. Colonização micorrízica

A análise da colonização micorrízica em *C. peltophoroides* revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos avaliados (Figura 2). O tratamento T2, inoculado com FMA *on farm*, apresentou a maior colonização micorrízica (média 60,00 %). O tratamento T3, que combinou a inoculação com FMA *on farm* e a fertilização de Clark, apresentou colonização micorrízica intermediária (média 32,22%). Os tratamentos T1, com fertilização de Clark isolada e C1, controle (solo + planta), apresentaram a menor colonização micorrízica (médias de 13,33% e 3,33%, respectivamente). A microscopia das raízes revelou estruturas de colonização micorrízica como hifas (setas vermelhas) e vesículas (setas amarelas), que foram encontradas mais predominantemente nas raízes das plantas referentes aos tratamentos inoculados T2 e T3.

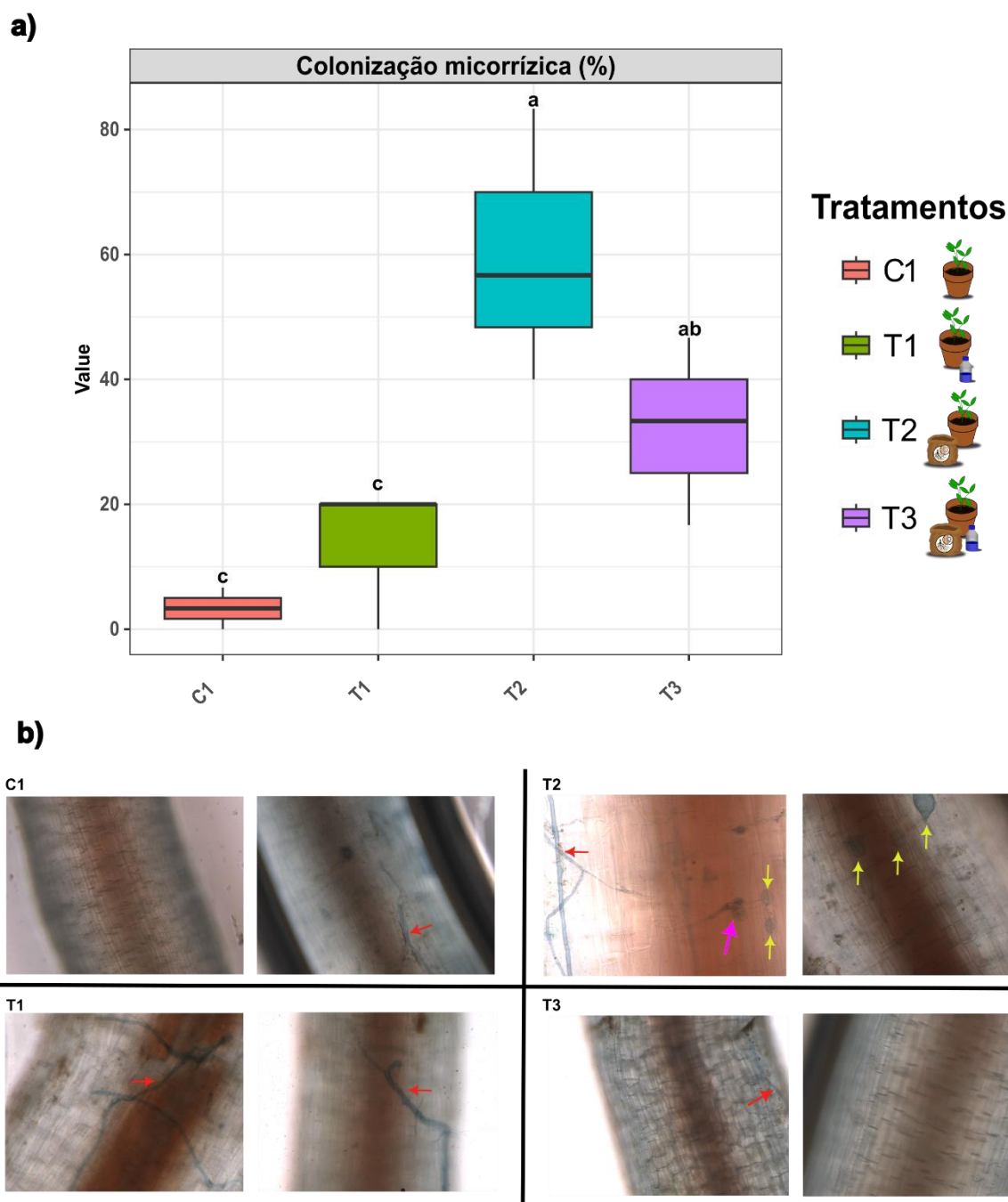


Figura 2: Colonização micorrízica em *C. peltophoroides* submetida a diferentes tratamentos. (A) Porcentagem de colonização radicular por FMA nos tratamentos: C1 (controle), T1 (fertilização *Clark*), T2 (FMA *on farm*) e T3 (FMA *on farm* + fertilização *Clark*). Barras representam médias \pm erro padrão ($n=4$). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$, teste de Tukey). (B) Micrografias de raízes coradas com azul de tripan, evidenciando estruturas micorrízicas: hifas (setas vermelhas) e vesículas (setas amarelas) sob ampliação final de 200X.

3.5. Análises multivariadas

Um total de 49 variáveis respostas foram utilizadas para as análises multivariadas, sendo elas relacionadas aos parâmetros físico-químicos do solo rizosférico, bem como aspectos nutricionais e de crescimento vegetal (Figura 3). As análises multivariadas de NMDS e PCA foram aplicadas para fornecer uma compreensão mais robusta dos dados, em que a NMDS destacou padrões de similaridade entre os tratamentos de forma não paramétrica, enquanto a PCA identificou as variáveis que mais contribuem para esses padrões.

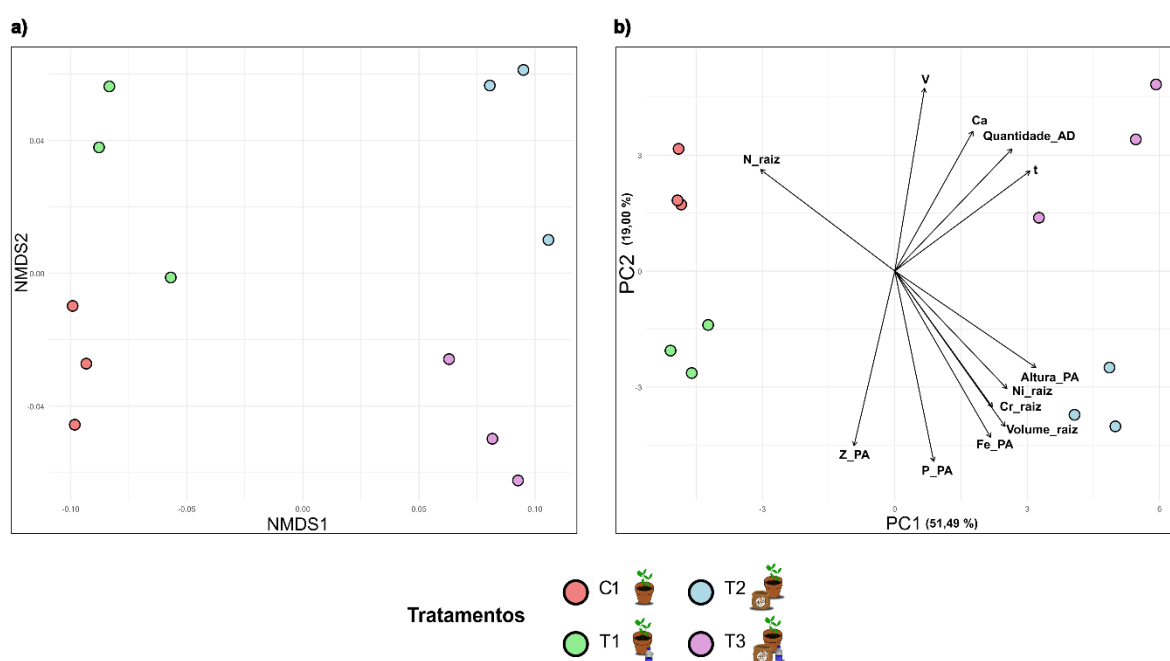


Figura 3: Análise multivariada relacionada aos parâmetros físico-químicos do solo, nutricionais e de crescimento vegetal: (a) ordenação NMDS (*Non-metric Multidimensional Scaling*) e (b) análise de componentes principais (PCA), demonstrando a dissimilaridade entre os grupos C1 (controle – círculo vermelho), T1 (fertilização *Clark* - círculo verde), T2 (inoculação com FMA *on farm* – círculo azul) e T3 (FMA *on farm* + fertilização *Clark* – círculo lilás). Os eixos representam as dimensões 1 e 2, com porcentagem de PC1 = 51.49 % e PC2 = 19.00 %. A distância entre os pontos reflete a similaridade na resposta dos tratamentos quanto às variáveis físico-químicas do solo, e de crescimento e nutricionais das plantas.

A análise de NMDS demonstrou que os tratamentos inoculados com FMA *on farm* (T2 e T3) exibiram maior similaridade entre si, indicando uma influência significativa da inoculação

on farm nos parâmetros avaliados. Em contraste, os tratamentos não inoculados (C1 e T1) mostraram maior dissimilaridade em relação a T2 e T3. O tratamento T3 apresentou a maior variabilidade geral nos parâmetros.

A PCA corroborou esses resultados, evidenciando uma separação nítida entre os tratamentos inoculados e não inoculados. Foi possível compreender que a similaridade entre T2 e T3 está associada principalmente a parâmetros de crescimento vegetal e ao acúmulo de metais nas raízes. A dissimilaridade entre os tratamentos inoculados e não inoculados foi mais influenciada pelas concentrações de Zn na parte aérea e N na raiz.

De forma geral, a PCA destacou que a inoculação com FMA *on farm* e a fertilização influenciaram significativamente os parâmetros avaliados. O controle C1 foi diferenciado principalmente pelo N associado à raiz, enquanto T2 se distinguiu por parâmetros relacionados ao crescimento (altura, volume de raiz) e acúmulo de Ni, Cr, Fe e P. O tratamento T3, que combinou inoculação e fertilização, foi influenciado principalmente pelos parâmetros V, Ca, AD e t.

Discussão

Os resultados obtidos evidenciam que a inoculação com FMA *on farm* promoveu alterações significativas nas características físico-químicas do substrato, refletindo diretamente na melhoria da nutrição e no crescimento das mudas de *Caesalpinia peltophoroides*. Essa influência positiva reforça o papel dos bioinoculantes na modulação da fertilidade do solo e na promoção da simbiose micorrízica, contribuindo para o desempenho fisiológico da espécie em ambientes de revegetação.

Nos parâmetros químicos, o aumento no teor de K em T3 pode ser atribuído a múltiplos mecanismos associados à simbiose micorrízica combinada à fertilização. Embora o potássio seja um nutriente móvel no solo, sua disponibilidade pode ser limitada pela fixação em argilominerais e pela competição com outros cátions (Zörb *et al.*, 2014). Os FMA podem influenciar a dinâmica do K através de: (i) alteração do pH rizosférico pela liberação de ácidos orgânicos, promovendo a dessorção de K⁺ dos sítios de troca (Sun *et al.*, 2022); (ii) extensão da área de exploração radicular pelas hifas extrarradiculares, acessando microsítios ricos em K não disponíveis às raízes (Ahmed *et al.*, 2025; Smith & Read, 2008); (iii) produção de exsudatos

que podem mobilizar formas menos disponíveis de K do solo (Ahmed *et al.*, 2025; Garcia & Zimmermann, 2014); e (iv) modulação da comunidade microbiana rizosférica, favorecendo bactérias solubilizadoras de minerais potássicos (Jini *et al.*, 2024; Meena *et al.*, 2015). A combinação desses processos com a fertilização em T3 pode ter criado condições sinérgicas que otimizaram tanto a liberação quanto a absorção de K, resultando nos maiores teores observados neste tratamento. De modo semelhante, o aumento do nível de Mg^{2+} e, especialmente, de matéria orgânica (MO) nos tratamentos T2 e T3 demonstram os efeitos positivos da inoculação na dinâmica de nutrientes e na atividade microbiana. Segundo Moreira *et al.* (2019), os FMA contribuem para o acúmulo de glomalina e a estabilização de agregados do solo, favorecendo a retenção de carbono e a melhoria da estrutura física. Além disso, Souza *et al.* (2020) destacam que o aumento da MO está diretamente associado à maior biomassa e atividade microbiana, refletindo em solos mais funcionais e saudáveis.

Os altos valores de SB (soma de bases), T (capacidade de troca de cátions a pH 7,0) e V% (saturação por bases) observados em T2 refletem a melhoria geral na fertilidade do solo promovida pela presença de argila, MO, bem como pelo inóculo, mesmo sem o uso de fertilização de Clark. Esses parâmetros indicam maior disponibilidade de cátions básicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+), maior capacidade do solo em reter e trocar nutrientes, e maior proporção de cargas negativas ocupadas por bases trocáveis em relação à acidez potencial. Em conjunto, esses indicadores apontam para um solo mais fértil, com menor acidez e maior capacidade de sustentar o crescimento vegetal. Isso reforça o potencial dos FMA como bioinsumos sustentáveis, especialmente em solos com baixa fertilidade inicial (Da Silva *et al.*, 2025; Schulze *et al.*, 2025).

A ausência de diferenças significativas nos valores de fósforo remanescente (P-rem), mesmo diante do aumento no P disponível, pode ser atribuída à estabilidade da fração lábil do fósforo no solo. Como o P-rem é uma medida da capacidade de retenção de fósforo, fortemente influenciada pela textura e mineralogia do solo, não se esperam variações expressivas em ambientes com características estruturais semelhantes. Esse padrão também foi observado por Chen *et al.* (2021), que relataram que a aplicação de inoculantes microbianos em solos argilosos cultivados com soja não alterou significativamente o P-rem, apesar do incremento na disponibilidade de fósforo. Esses resultados reforçam que, em solos com elevada capacidade de adsorção ou já supridos em fósforo, a dinâmica do P-rem tende a permanecer estável,

evidenciando a complexidade das interações entre microrganismos, nutrientes e atributos físico-químicos do solo.

A acidez potencial mais elevada nos tratamentos com inóculo pode estar ligada à maior atividade microbiana e à liberação de íons H^+ durante a decomposição da matéria orgânica (Alexander, 1980). Ainda assim, os efeitos positivos observados nas demais variáveis evidenciam o potencial do inóculo como tecnologia sustentável para a melhoria da qualidade do solo, com impacto positivo na fertilidade, especialmente quando aliado à fertilização orgânica ou mineral.

O tratamento T3 (inóculo FMA *on farm* + fertilização) promoveu alterações expressivas nos teores de argila e silte, com redução da areia fina. Embora a textura do solo, definida pela proporção de areia, silte e argila, seja uma propriedade física estável, determinada principalmente pelo material de origem e pouco influenciada por manejos de curto prazo, é importante diferenciar essa característica da estrutura do solo, que envolve a organização dos agregados e pode ser modificada por práticas de manejo. A adição do inóculo, composto por rizossolo granulado rico em partículas finas e matéria orgânica, pode ter influenciado a estrutura do substrato, alterando a distribuição aparente das frações granulométricas, especialmente em T3. A ausência de alterações semelhantes em T2, que também recebeu o inóculo, sugere que a fertilização complementar pode ter potencializado a incorporação e estabilização dessas partículas finas, promovendo maior agregação e retenção hídrica. Essa hipótese é reforçada pelo curto intervalo entre a aplicação e a análise, período em que efeitos físicos sobre a estrutura do solo podem se manifestar rapidamente. Alterações semelhantes foram discutidas por Jesus (2008), ao demonstrar que atributos como densidade, porosidade e estabilidade de agregados influenciam diretamente a estrutura da microbiota do solo e respondem à adição de matéria orgânica. No presente estudo, essas modificações podem ter contribuído não apenas para o aumento da capacidade de retenção hídrica, refletido no maior valor de argila dispersa em água (AD) observado em T3, mas também para a melhoria da absorção de nutrientes pelas plantas, uma vez que solos com estrutura mais estável favorecem o crescimento radicular e a difusão de nutrientes na matriz do solo (Clark, 2024; Santos *et al.*, 2019; Chamizo *et al.*, 2018; Alori *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a aplicação do inóculo FMA *on farm*, especialmente quando combinado à fertilização (T3), pode ter favorecido a agregação do solo por meio da produção de exopolissacarídeos e glomalina, substâncias produzidas por fungos micorrízicos que atuam

como agentes cimentantes das partículas do solo (Dhiman *et al.*, 2024). Essa ação contribui para a melhoria da estrutura do solo, aumentando a estabilidade dos agregados e a capacidade de retenção de água, como também relatado por Chamizo *et al.* (2018) em solos de diferentes texturas.

Esses resultados sugerem que a combinação entre inóculo FMA *on farm* e fertilização (T3) contribuiu para modificações significativas na fração granulométrica e na melhoria da retenção hídrica do solo, representando um importante avanço para estratégias de manejo sustentável, especialmente em ambientes com solos arenosos e baixa capacidade de retenção de água.

Na avaliação nutricional das mudas de *Caesalpinia peltophoroides*, observou-se que a inoculação com FMA *on farm*, especialmente quando associada à fertilização (T3), promoveu alterações na absorção e redistribuição de macro e micronutrientes. No entanto, as diferenças na concentração de fósforo na parte aérea entre os tratamentos T1, T2 e T3 não foram estatisticamente significativas, e os valores numéricos se mantiveram próximos. Esse resultado sugere que, embora os FMA possam atuar na solubilização e translocação de fósforo por meio de mecanismos como liberação de ácidos orgânicos, fosfatases e exploração de microporos (Etesami *et al.*, 2021), o efeito pode ser limitado em substratos já supridos ou em espécies com menor responsividade micorrízica.

A redistribuição de micronutrientes também foi observada, com maior concentração de ferro (Fe) na parte aérea e redução de cobre (Cu) e manganês (Mn) nas raízes, possivelmente associada à produção de sideróforos e à competição por sítios de absorção (Pang *et al.*, 2024; Kermeur *et al.*, 2023; Mishra *et al.*, 2016). Para aprofundar a compreensão da resposta da sibipiruna à inoculação micorrízica, é relevante realizar comparações com outras espécies florestais nativas da Mata Atlântica e do Cerrado, preferencialmente da mesma família Fabaceae. Prates Júnior *et al.* (2021) demonstraram que a inoculação micorrízica e a fertilização fosfatada geram respostas contrastantes entre espécies nativas, evidenciando que a eficiência da simbiose depende fortemente da identidade vegetal e das condições edáficas. Assim, os dados reforçam que os FMA atuam como extensões do sistema radicular, promovendo maior eficiência na absorção de nutrientes em contextos específicos e contribuindo para a sustentabilidade do sistema produtivo (Hnini *et al.*, 2024; Islam *et al.*, 2024; Smith & Read, 2010).

Os resultados nutricionais também devem ser interpretados considerando o possível efeito de diluição observado. Notavelmente, as maiores concentrações de nutrientes foram encontradas nos tratamentos C1 e T1, que apresentaram menor crescimento vegetal, enquanto os tratamentos inoculados (T2 e T3), apesar do maior desenvolvimento, exibiram concentrações relativamente menores de alguns nutrientes na matéria seca. Este padrão sugere a ocorrência do efeito de diluição, fenômeno no qual o crescimento da biomassa vegetal supera a taxa de absorção de nutrientes, resultando em menor concentração por unidade de massa seca (Jarrell & Beverly, 1981; Loneragan *et al.*, 1982). O efeito de diluição é comum em plantas que experimentam crescimento acelerado devido a condições favoráveis, como a simbiose micorrízica, onde o rápido incremento de biomassa pode diluir as concentrações de nutrientes mesmo quando a absorção total aumenta (Banthana *et al.*, 2021; Marschner, 2012). Isso não indica deficiência nutricional, mas sim um crescimento vigoroso que supera a capacidade de concentração de nutrientes nos tecidos. Portanto, a análise conjunta dos parâmetros de crescimento e concentração de nutrientes reforça a eficácia da inoculação com FMA *on farm* na promoção do desenvolvimento vegetal, sendo as menores concentrações uma consequência positiva do maior crescimento das plantas.

A análise multivariada (PCA) revelou padrões distintos entre os tratamentos, com agrupamento evidente dos inoculados (T2 e T3). Esse resultado indica que a simbiose micorrízica alterou significativamente a interação solo-planta, promovendo respostas diferenciadas em relação aos demais manejos. Tal proximidade entre T2 e T3 está associada não apenas ao maior crescimento vegetal, mas também a modificações na dinâmica de absorção de nutrientes e metais, reforçando o papel dos FMA como extensões do sistema radicular que ampliam a capacidade exploratória das plantas (Hnini *et al.*, 2024; Islam *et al.*, 2024; Smith & Read, 2010).

A superioridade dos tratamentos inoculados (T2 e T3) torna-se ainda mais evidente quando comparada à resposta limitada observada no tratamento apenas fertilizado (T1) e no controle (C1) (Figura 1). Enquanto a fertilização isolada (T1) apresentou menor eficiência na promoção do crescimento vegetal e na melhoria das características do solo, sua combinação com o inóculo de FMA (T3) resultou em efeitos sinérgicos. Esses efeitos podem estar associados tanto à modulação da disponibilidade dos nutrientes do fertilizante pelo inóculo — aumentando sua eficiência de uso — quanto à ação de microrganismos benéficos presentes no consórcio FMA

on farm, como as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) (Verma *et al.*, 2024; Chen *et al.*, 2021; Luqman *et al.*, 2025).

O crescimento vegetal superior observado no tratamento T3 (FMA + fertilização; Figura 1b) evidencia o efeito sinérgico entre a simbiose micorrízica e a suplementação nutricional. Enquanto os fertilizantes fornecem nutrientes em formas prontamente disponíveis, o inóculo de FMA *on farm* atua ampliando a eficiência de absorção e melhorando a estrutura do solo (Genre *et al.*, 2020). Por outro lado, o crescimento intermediário em T2 (apenas FMA *on farm*) demonstra que esses microrganismos são capazes de promover o desenvolvimento vegetal mesmo na ausência de fertilizantes, destacando seu potencial para sistemas de baixo *input* (Kuila *et al.*, 2022). Esse efeito pode ser atribuído a múltiplos mecanismos, incluindo a maior absorção de nutrientes pouco móveis (como o P, por exemplo) e produção de hormônios vegetais por PGPRs associadas (Genre *et al.*, 2020).

Os tratamentos inoculados promoveram melhorias significativas na capacidade de troca catiônica efetiva (t) e na saturação por bases (V%) (Tabela 2), indicando maior eficiência na retenção e disponibilidade de nutrientes no solo. Esse efeito pode ser atribuído, em parte, ao aumento da matéria orgânica do solo (MOS) observado nos tratamentos com FMA, uma vez que a MOS atua como importante reservatório de cargas negativas, contribuindo a elevação da capacidade de troca catiônica total (T), que representa o total de sítios de troca disponíveis no solo a pH 7,0 e para a complexação de cátions como Ca^{2+} e Mg^{2+} (Souza *et al.*, 2020).

Além disso, a presença de FMA favorece a formação de agregados estáveis, por meio da ação de suas hifas extrarradiculares e da produção de glomalina, uma glicoproteína que atua como agente cimentante das partículas do solo (Rillig *et al.*, 2017). Essa estruturação melhora a porosidade e a retenção de água, reduzindo perdas por lixiviação e promovendo maior resiliência do solo frente a variações ambientais.

A maior quantidade de argila dispersa em água (AD) observada nos solos inoculados reforça o papel dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na melhoria da estrutura física do solo e na mitigação do estresse hídrico, especialmente em ambientes com baixa capacidade de retenção de água. Embora os FMA não incorporem nutrientes ao sistema como as bactérias fixadoras de nitrogênio, atuam como mineradores, explorando o substrato em busca de nutrientes pouco disponíveis, como o fósforo, e favorecendo sua absorção pelas plantas. Segundo Bahadur *et al.* (2019), os FMA aumentam a eficiência do uso da água e ativam

mecanismos antioxidantes nas plantas, enquanto Bintarti *et al.* (2025) destacam sua contribuição para a estabilidade da microbiota e da estrutura do solo sob condições de seca. Esses resultados indicam que a inoculação com FMA *on farm* não apenas influencia a dinâmica química do solo, mas também contribui para sua qualidade física e funcional, sendo uma estratégia promissora para sistemas agrícolas mais resilientes e sustentáveis.

No contexto da fitorremediação, o inóculo FMA *on farm* aplicado no tratamento T2 demonstrou capacidade de modular a distribuição de metais pesados, com destaque para o maior acúmulo de cromo (Cr) e níquel (Ni) nas raízes das plantas inoculadas. Esse padrão de imobilização radicular sugere que os FMA atuam como barreiras biológicas, limitando a translocação de metais para a parte aérea — um mecanismo desejável em estratégias de fitoestabilização, especialmente em áreas contaminadas (Skuzza *et al.*, 2022). A retenção de metais nas raízes reduz o risco de entrada desses elementos na cadeia alimentar, protegendo herbívoros e consumidores humanos (Bellis *et al.*, 2020). Além disso, a estabilização de metais no solo promovida pelos FMA pode ocorrer por meio da sequestração na parede celular, complexação com glomalina e alteração do pH e da microbiota rizosférica, tornando os metais menos biodisponíveis (Yan *et al.*, 2020). Esses efeitos reforçam o potencial dos FMA como aliados em tecnologias de remediação verde, com benefícios tanto ecológicos quanto agronômicos.

A análise da colonização micorrízica (Figura 2) revela aspectos fundamentais da interação simbiótica entre os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e *Caesalpinia peltophoroides*. A elevada taxa de colonização observada no tratamento T2 confirma a eficiência do inóculo FMA *on farm* em estabelecer uma associação funcional com a planta hospedeira, mesmo em condições de substrato básico. Em contraste, a redução expressiva da colonização em T3 sugere que a aplicação rotineira da solução nutritiva, ainda que em baixa concentração, especialmente com fósforo (P), pode ter inibido a formação da simbiose. Esse comportamento está alinhado ao fenômeno conhecido como *trade-off* nutricional, no qual plantas cultivadas em ambientes com alta disponibilidade de P tendem a reduzir o investimento na simbiose micorrízica, priorizando a absorção direta via raízes (Liu *et al.*, 2021; Balzergue *et al.*, 2013). Isso reforça a ideia de que os FMA atuam como mineradores de nutrientes já presentes no substrato, e que sua eficácia depende da demanda nutricional da planta e da disponibilidade relativa de recursos no ambiente.

Esse comportamento adaptativo reforça a importância de se considerar o balanço nutricional ideal ao implementar estratégias de inoculação, uma vez que a eficácia dos FMA depende da demanda da planta por nutrientes e da limitação do ambiente. Como destacado por Balzergue *et al.* (2013), altos níveis de P reduzem a capacidade da planta de hospedar os fungos, mesmo quando os sinais moleculares da simbiose estão presentes. Portanto, alinhar a inoculação com o manejo nutricional é essencial para maximizar os benefícios da simbiose e garantir a sustentabilidade do sistema produtivo, inclusive no cenário de mudas florestais.

4. Conclusões

Os resultados deste estudo demonstram o potencial do inóculo *on farm* de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na promoção do crescimento e nutrição de *Caesalpinia peltophoroides* Benth., uma espécie nativa e de grande interesse para recuperação de áreas degradadas. Além da melhoria da nutrição e desenvolvimento das plantas, a simbiose micorrízica promove a saúde do solo e estrutura do solo, contribuindo para maior resiliência em ambientes impactados.

No solo rizosférico, os tratamentos com FMA *on farm* (T2 e T3) aumentaram simultaneamente a matéria orgânica, Mg^{2+} , soma de bases, capacidade de troca catiônica e saturação por bases, além de elevar os teores de argila e silte e a água disponível. Esses ganhos decorrem da produção de glomalina e exopolissacarídeos pelas hifas fúngicas, que promovem agregação estável e diminuem perdas por lixiviação e estresse hídrico. Em particular, a combinação de inóculo com fertilização de Clark (T3) potencializou ainda mais o ganho de K e Mg ao sistema, resultando no maior incremento de altura, diâmetro e biomassa das mudas, evidenciando um claro efeito sinérgico entre aporte direto de nutrientes e extensão radicular micorrízica.

Isoladamente, o inóculo (T2) destacou-se por elevar a solubilização e translocação de fósforo e ferro para a parte aérea, ao passo que reteve cobre e manganês na rizosfera, sinalizando sua capacidade de modular seletivamente macro e micronutrientes. A colonização micorrízica atingiu cerca de 60 % em T2, mas caiu para ~32 % em T3, confirmando o *trade-off* nutricional desencadeado por altos níveis de P disponível. Em termos de fitorremediação, T2 concentrou cromo e níquel nas raízes, restringindo sua passagem à parte aérea e reforçando o papel dos FMA como barreira natural contra metais pesados. Análises multivariadas (NMDS, PCA)

corroboraram que tanto a inoculação isolada quanto sua combinação com fertilização ocasionaram o perfil físico-químico do solo, o estado nutricional e o crescimento vegetal, distinguindo nitidamente os tratamentos inoculados com FMA dos demais tratamentos.

O inóculo de FMA *on farm* se revela como uma tecnologia sustentável para a produção de mudas florestais de alta qualidade, capaz de melhorar simultaneamente a fertilidade e a estrutura do solo, otimizar a nutrição vegetal e atuar como escudo contra metais pesados. Seu uso combinado a doses moderadas de fertilizante maximiza esses benefícios, embora exija ajuste fino do balanço nutricional a fim de não comprometer a interação simbiótica.

Este trabalho reforça o potencial do uso de FMA *on farm* como ferramenta biotecnológica para a produção de mudas de alta qualidade e a recuperação de ecossistemas, alinhando-se às demandas por práticas mais sustentáveis e eficientes.

5. Referências bibliográficas

AHMED, N. *et al.* Symbiotic synergy: How Arbuscular Mycorrhizal Fungi enhance nutrient uptake, stress tolerance, and soil health through molecular mechanisms and hormonal regulation. **IMA Fungus**, v. 16, p. e144989, 2025.

AKINWANDE, M. O. *et al.* Variance inflation factor: as a condition for the inclusion of suppressor variable (s) in regression analysis. **Open Journal of Statistics**, v. 5, n. 07, p. 754, 2015.

ALEXANDER, M. *et al.* Effects of acidity on microorganisms and microbial processes in soil. In: **Effects of Acid Precipitation on Terrestrial Ecosystems**. Boston, MA: Springer US, 1980. p. 363-374.

ALORI, E. T. *et al.* Microbial inoculants for soil quality and plant health. **Sustainable Agriculture Reviews**, p. 281-307, 2017.

ARCIDIACONO, M. *et al.* Field inoculation by arbuscular mycorrhizal fungi with contrasting life-history strategies differently affects tomato nutrient uptake and residue decomposition dynamics. **Plant and Soil**, v. 500, n. 1, p. 105-127, 2024.

BAHADUR, A. *et al.* Mechanistic insights into arbuscular mycorrhizal fungi-mediated drought stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 4199, 2019.

BALZERGUE, C. *et al.* High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 426, 2013.

BELLIS, L. *et al.* Heavy metals accumulation, toxicity and detoxification in plants. MDPI - **Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, 2020.

BHANTANA, P. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and its major role in plant growth, zinc nutrition, phosphorous regulation and phytoremediation. **Symbiosis**, v. 84, n. 1, p. 19-37, 2021.

BINTARTI, A. F. *et al.* Cropping system modulates the effect of spring drought on ammonia-oxidizing communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 201, p. 109658, 2025.

BREMNER, J. M. *et al.* Nitrogen-total. **Methods of soil analysis: part 2 chemical and microbiological properties**, v. 9, p. 595-624, 1982.

CHAMIZO, S. *et al.* Cyanobacteria inoculation improves soil stability and fertility on different textured soils: gaining insights for applicability in soil restoration. **Frontiers in Environmental Science**, v. 6, p. 49, 2018.

CHEN, L. *et al.* Plant growth-promoting bacteria improve maize growth through reshaping the rhizobacterial community in low-nitrogen and low-phosphorus soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 57, p. 1075-1088, 2021.

CHEN, X. W. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and the associated bacterial community influence the uptake of cadmium in rice. **Geoderma**, v. 337, p. 749-757, 2019.

CHEN, Y. *et al.* Effects of different types of microbial inoculants on available nitrogen and phosphorus, soil microbial community, and wheat growth in high-P soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 23036-23047, 2021.

CLARK, C. A. The important role of soil texture on water. **University of Wisconsin-Madison, Crops and Soils, Division of Extension: Madison, WI, USA**, 2024.

CLARK, R. B. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 23, n. 7, p. 867-902, 2000.

DA SILVA, J. M. *et al.* Bioinputs in Sustainable Agriculture: Benefits, Challenges, and Pathways for Resilient Farming Systems. **Asian Journal of Research in Crop Science**, v. 10, n. 2, p. 85-97, 2025.

DE MENDIBURU, F. *et al.* Package ‘agricolae’. **R Package, version**, v. 1, n. 3, p. 1143-1149, 2019.

DHIMAN, N. *et al.* Plant-microbe interaction to improve soil health. In: **Advancements in Microbial Biotechnology for Soil Health**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 189-226.

ETESAMI, H. *et al.* Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing bacteria, and silicon to P uptake by plant. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 699618, 2021.

FAYUAN, W. A. N. G. *et al.* Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and soil amendments to remediation of a heavy metal-contaminated soil using sweet sorghum. **Pedosphere**, v. 32, n. 6, p. 844-855, 2022.

GARCIA, K.; ZIMMERMANN, S. D. The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 337, 2014.

GENRE, A. *et al.* Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 649-660, 2020.

GIANNINI, T. C. *et al.* Ecological niche modeling and geographical distribution of pollinator and plants: A case study of *Peponapis fervens* (Smith, 1879)(Eucerini: Apidae) and *Cucurbita* species (Cucurbitaceae). **Ecological Informatics**, v. 5, n. 1, p. 59-66, 2010.

GIANNINI, T. C. *et al.* Selecting plant species for practical restoration of degraded lands using a multiple-trait approach. **Austral Ecology**, v. 42, n. 5, p. 510-521, 2017.

HNINI, M. *et al.* Prevalence, diversity and applications potential of nodules endophytic bacteria: a systematic review. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1386742, 2024.

IPCC, 2023. Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland.

ISLAM, M. *et al.* Phytoremediation as a green and sustainable prospective method for heavy metal contamination: a review. **RSC Sustainability**, 2024.

JARRELL, W. M.; BEVERLY, R. B. The dilution effect in plant nutrition studies. **Advances in Agronomy**, v. 34, p. 197-224, 1981.

JINI, D. *et al.* Sustainable agricultural practices using potassium-solubilizing microorganisms (KSMS) in coastal regions: a critical review on the challenges and opportunities. **Environment, Development and Sustainability**, v. 26, n. 6, p. 13641-13664, 2024.

JOHNSON, C. *et al.* 2. Analytical methods for use in plant analysis. 1959.

JORDAO, T. C. *et al.* Shifts in Arbuscular Mycorrhizal fungal properties due to vegetative remediation of mine spoil contamination from a dam rupture in Mariana, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 162, p. 103885, 2021.

KASUYA, M. C. M. *et al.* **Micorrizas arbusculares**: conceitos, metodologias e aplicações. Viçosa: UFV, 2021.

KERMEUR, N. *et al.* Iron availability and homeostasis in plants: a review of responses, adaptive mechanisms, and signaling. **Plant Abiotic Stress Signaling**, p. 49-81, 2023.

KOEPPEN, W. Climatologia con un estudio de los climas de la tierra. 1948.

KUILA, D. *et al.* Aspects, problems and utilization of Arbuscular Mycorrhizal (AM) application as bio-fertilizer in sustainable agriculture. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100107, 2022.

LEHMANN, A. *et al.* Mycorrhizas and soil aggregation. In: **Mycorrhizal Mediation of Soil**. Elsevier, 2017. p. 241-262.

LIU, M. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungal colonization and soil pH induced by nitrogen and phosphorus additions affects leaf C: N: P stoichiometry in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) forests. **Plant and Soil**, v. 461, p. 421-440, 2021.

LONERAGAN, J. F. *et al.* Phosphorus accumulation and toxicity in leaves in relation to zinc supply. **Soil Science Society of America Journal**, v. 46, n. 2, p. 345-352, 1982.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. v.3. 286p.

LUQMAN, M. *et al.* PGPR and nutrient consortia promoted cotton growth, antioxidant enzymes, and mineral uptake by suppressing sooty mold in arid climate. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, p. 1551465, 2025.

MAITRA, S. *et al.* Bioinoculants—Natural biological resources for sustainable plant production. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 51, 2021.

MARSCHNER, H. Marschner's mineral nutrition of higher plants. Academic press, 2012.

MARTINS, W. B. R. *et al.* Ecological methods and indicators for recovering and monitoring ecosystems after mining: A global literature review. **Ecological Engineering**, v. 145, p. 105707, 2020.

MEENA, V. S. *et al.* Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. **Ecological Engineering**, v. 81, p. 340-347, 2015.

MISHRA, V. *et al.* Synergistic effects of Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria in bioremediation of iron contaminated soils. **International journal of phytoremediation**, v. 18, n. 7, p. 697-703, 2016.

MOREIRA, A. *et al.* Soybean response to copper applied to two soils with different levels of organic matter and clay. **Journal of Plant Nutrition**, v. 42, n. 18, p. 2247-2258, 2019.

MOREIRA, B. C. *et al.* Effect of inoculation of pineapple plantlets with arbuscular mycorrhizal fungi obtained from different inoculum sources multiplied by the on-farm method. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 43, 2019.

NAZ, M. *et al.* The soil pH and heavy metals revealed their impact on soil microbial community. **Journal of Environmental Management**, v. 321, p. 115770, 2022.

OKSANEN, J. *et al.* Package ‘vegan’. **Community Ecology Package, version**, v. 2, n. 9, p. 1-295, 2013.

- OKSANEN, J. Vegan: community ecology package. **R Package Version**, v. 2, p. 3, 2015.
- PAN, J. *et al.* Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth-promoting bacteria (PGPR) inoculations on *Elaeagnus angustifolia* L. in saline soil. **Applied Sciences**, v. 10, n. 3, p. 945, 2020.
- PANG, F. *et al.* Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1383813, 2024.
- PHILLIPS, J. M. & HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, n. 1, p. 158-IN18, 1970.
- POWELL, J. R. *et al.* Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem function. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1059-1075, 2018.
- PRADO, I. G. O. *et al.* Revegetation process increases the diversity of total and arbuscular mycorrhizal fungi in areas affected by the Fundão dam failure in Mariana, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 141, p. 84-95, 2019.
- PRATES JÚNIOR, P. (Coord). *Micorrizas arbusculares: conceitos, metodologias e aplicações*. 1. ed. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Núcleo Regional Leste, Minas Gerais, 2021.
- PRATES JÚNIOR, P. *et al.* Extensão em Microbiologia: mudas inoculadas com microrganismos benéficos na bacia do rio Doce. **Revista Ciência em Extensão**, v. 16, p. 332-343, 2020.
- PUSZTAHELYI, T. *et al.* Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 573, 2015.
- QIN, Y. *et al.* Forest conservation in Indigenous territories and protected areas in the Brazilian Amazon. **Nature Sustainability**, v. 6, n. 3, p. 295-305, 2023.
- QUAN, L. *et al.* Beneficial effects of arbuscular mycorrhizae on Cu detoxification in *Mimosa pudica* L. grown in Cu-polluted soils. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 10, p. 25755-25763, 2023.

RAWAT, P. *et al.* Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 49-68, 2021.

RILLIG, M. C. *et al.* Soil aggregates as massively concurrent evolutionary incubators. **The ISME Journal**, v. 11, n. 9, p. 1943-1948, 2017.

SANTOS, D. R. Fósforo e fungos micorrizicos no crescimento de mudas arbóreas da caatinga. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 12, n. 4, p. 391-396, 2016.

SANTOS, N. G. N. *et al.* Granulometric fractions and physical-hydric behavior of sandy soils. **Agrarian**, v. 12, n. 45, p. 318-327, 2019.

SCHULZE, C. R. *et al.* Carbono da biomassa microbiana do solo em sistema de plantio direto com mais de 25 anos de implementação na Região Sul do Brasil. 2025.

SHUAB, R. *et al.* Retraction Note to: Arbuscular Mycorrhizal Fungi: A Potential Tool for Restoration of Degraded Land. **Mycorrhiza-Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration**, p. C1-C1, 2017.

SIQUEIRA, J. O. *et al.* Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. **Mycorrhiza**, v. 11, n. 5, p. 245-255, 2001.

SKUZA, L. *et al.* Natural molecular mechanisms of plant hyperaccumulation and hypertolerance towards heavy metals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9335, 2022.

SMITH, S. E. *et al.* **Mycorrhizal Symbiosis**. AcademicPpress, 2010.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. Academic press, 2010.

SOUZA DE SOUSA, C. E. *et al.* Soil Organic Matter Mineralization and Carbon Emission Across Different Land Uses in Coarse-Textured Soils. **Available at SSRN 5122823**.

STEFFEN, R. B. *et al.* Óleo essencial de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden no estímulo à micorrização de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 69-78, 2012.

SUN, Z. *et al.* Effects of biochar on soil chemical properties: A global meta-analysis of agricultural soil. **Plant, Soil and Environment**, v. 68, n. 6, p. 272-289, 2022.

TISDALL, J. M. *et al.* Organic matter and water-stable aggregates in soils. **Journal of Soil Science**, v. 33, n. 2, p. 141-163, 1982.

VERGARA, C. *et al.* Interação da planta com fungo micorrízico e sua resposta à inoculação com diferentes fungos promotores de crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, p. e25140, 2018.

VERMA, K. K. *et al.* Synergistic interactions of nanoparticles and plant growth promoting rhizobacteria enhancing soil-plant systems: a multigenerational perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1376214, 2024.

VIEIRA, N. A. Promoção de crescimento de espécies florestais a partir da triagem e inoculação de consórcios microbianos. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2021.

WEI, W. *et al.* Soil P-stimulating bacterial communities: response and effect assessment of long-term fertilizer and rhizobium inoculant application. **Environmental Microbiome**, v. 19, n. 1, p. 86, 2024.

WICKHAM, H. *et al.* Package ‘ggplot2’. **Create elegant data visualizations using the grammar of graphics. Version**, v. 2, n. 1, p. 1-189, 2016.

XU, F. *et al.* The mechanism of arbuscular mycorrhizal fungi-alleviated manganese toxicity in plants: A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 108808, 2024.

XU, Y. *et al.* Mycorrhizal fungi alter root exudation to cultivate a beneficial microbiome for plant growth. **Functional Ecology**, v. 37, n. 3, p. 664-675, 2023.

YAN, A. *et al.* Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 359, 2020.

YANG, P. *et al.* Utilizing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) to Advance Sustainable Agriculture. **Bacteria**, v. 3, n. 4, p. 434-451, 2024.

ZHANG, Y. *et al.* Enhancing the phytoremediation of heavy metals by combining hyperaccumulator and heavy metal-resistant plant growth-promoting bacteria. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 912350, 2022.

ZHEN, L. I. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi regulate plant mineral nutrient uptake and partitioning in iron ore tailings undergoing eco-engineered pedogenesis. **Pedosphere**, v. 34, n. 2, p. 385-398, 2024.

ZÖRB, C. *et al.* Potassium in agriculture—status and perspectives. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 9, p. 656-669, 2014.

6. Material Suplementar

Tabela 1S: Resultados do teste de Tukey HSD ($p < 0,05$) para parâmetros de crescimento de *Caesalpinia peltophoroides*. Tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente. C1: controle; T1: fertilização; T2: inoculação FMA *on farm*; T3: FMA *on farm* + fertilização. As siglas referem-se a PA – parte aérea, e RA – raiz.

	C1	T1	T2	T3
Parâmetros de crescimento				
Massa fresca PA (g)	5,27 c	7,18 b	14,99 a	13,57 a
Massa Seca PA (g)	2,68 c	3,78 b	6,34 a	5,91 a
Altura PA (cm)	29,67 c	32,33 bc	42,33 a	37,00 b
Massa fresca RA (g)	5,12 b	4,35 b	20,42 a	20,50 a
Massa seca RA (g)	2,15 b	1,53 c	8,30 a	8,21 a
Massa seca total (g)	4,90 a	4,69 a	15,10 b	14,10 b
Volume RA (mL)	10,42 c	16,00 b	24,33 a	16,67 b
Altura RA (cm)	15,00 b	16,17 b	26,67 a	24,33 a

Diâmetro de caule (mm)	4,07 c	4,37 b	5,80 a	6,17 a
Altura total (cm)	44,67 c	48,50 b	69,00 a	61,33 a

CAPÍTULO 2

Dinâmica da comunidade microbiana e interações ecológicas na rizosfera de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. frente à inoculação com FMA *on farm*

1. Introdução

Os microrganismos do solo são reconhecidos por seu papel fundamental na manutenção da funcionalidade dos ecossistemas terrestres, impulsionando ciclos biogeoquímicos através da decomposição e mineralização da matéria orgânica, processos que culminam na disponibilização de nutrientes essenciais para o desenvolvimento vegetal (Hannula *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2019; Doran & Parkin, 1994). Nesse contexto, os bioinoculantes representam uma estratégia promissora para a promoção da saúde das plantas. Definidos como formulações contendo microrganismos viáveis, capazes de colonizar a rizosfera e promover benefícios às plantas, eles atuam tanto na melhoria da nutrição vegetal quanto no fortalecimento de sua resistência a estresses bióticos e abióticos (Baez-Rogelio *et al.*, 2017). A aplicação de bioinoculantes oferece vantagens significativas, incluindo a redução ou eliminação da dependência de fertilizantes químicos sintéticos, o que pode levar à diminuição dos custos de produção vegetal e ao aumento da produtividade de forma sustentável (Pena Junior *et al.*, 2023). O crescente interesse e investimento no setor de bioinsumos são evidenciados pela Minuta 02/2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece diretrizes para o registro de produtos microbiológicos, fomentando um mercado agrícola e ambiental mais sustentável (MAPA, 2020). O expressivo aumento de 74% na produção de bioinsumos, em contraste com o modesto crescimento de 3,7% no setor de defensivos agrícolas, aponta para uma tendência promissora, com a projeção de um faturamento de 18,5 bilhões de dólares para o mercado de produtos microbiológicos até 2026 (Goulet, 2021).

Dentre os diversos bioinoculantes, a produção *on farm* de inóculos de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) representa uma abordagem inovadora e adaptada às condições locais (Chen *et al.*, 2018). Estes inóculos são obtidos a partir da coleta de microrganismos nativos de áreas de vegetação nativa, representando um *pool* microbiano potencialmente otimizado para as interações com as plantas da região (Lee *et al.*, 2008). A estratégia de propagação envolve a multiplicação desses microrganismos em substratos simples, como vermiculita e bagaço de cana, utilizando os exsudatos liberados por plantas hospedeiras para estimular seu crescimento (Prates Júnior *et al.*, 2021; Douds Jr *et al.*, 2006). Embora o foco principal da produção *on farm*

seja a obtenção de FMA, é importante destacar que o inóculo resultante naturalmente conterá uma diversidade de outros microrganismos do solo, incluindo rizobactérias potenciais como promotoras do crescimento de plantas (PGPR) (Akyol *et al.*, 2019).

Para compreender o mecanismo de ação desses bioinoculantes e monitorar seu estabelecimento e impacto no ambiente rizosférico, métodos moleculares baseados em DNA se revelam como ferramentas poderosas (Cerqueira *et al.*, 2008). Em particular, o sequenciamento de *amplicon*, utilizando plataformas como a *Illumina Miseq*, permite uma análise aprofundada da composição e estrutura da comunidade microbiana associada ao inóculo e à rizosfera das plantas (Pradhan *et al.*, 2020; Taberlet *et al.*, 2018). Essa abordagem também possibilita a identificação de espécies ou grupos microbianos biomarcadores e indicadores, que podem estar fortemente associados a determinados tratamentos ou condições, oferecendo *insights* sobre os microrganismos-chave envolvidos na promoção do crescimento vegetal (Simon *et al.*, 2011).

Em relação à detecção e rastreamento de grupos microbianos biomarcadores, a metodologia de *Fluorescence in Situ Hybridization* (FISH) pode ser aplicada. O FISH tem como princípio a utilização de sondas oligonucleotídicas marcadas com fluorescência, que se hibridizam a sequências-alvo de ácidos nucleico, permitindo a visualização e identificação de microrganismos até mesmo em amostras ambientais complexas como o solo (Schimak *et al.*, 2016). O desenvolvimento de sondas específicas para os microrganismos identificados através do sequenciamento de *amplicon* é uma estratégia valiosa para monitorar a presença e a distribuição desses grupos no sistema solo-planta (Lasa *et al.*, 2019).

Nesse contexto, este capítulo teve como objetivo principal investigar a dinâmica da comunidade microbiana associada à aplicação de FMA *on farm* na espécie florestal *C. peltophoroides* Benth., para compreender a composição e estrutura da microbiota, bem como identificar espécies ou grupos indicadores relacionados ao bioinoculante.

Para isso, foram realizadas análises da diversidade microbiana, por abordagem de metataxonomia, em diferentes condições experimentais: Substrato (S), solo adicionado de inóculo (SI), solo rizosférico controle (C1), solo rizosférico de plantas que receberam apenas fertilização de Clark (T1), solo rizosférico inoculado (T2) e solo rizosférico que combinou os fatores inoculação e fertilização (T3). Dentre as investigações acerca da diversidade microbiana, foi conduzida a análise de composição e abundância de táxons presentes nas amostras, análise de grupos microbianos indicadores e/ou biomarcadores para o inóculo de

FMA *on farm*. Os dados biológicos foram contrastados com os dados físico-químicos do solo, com os parâmetros nutricionais e de crescimento vegetal, por meio de análise multivariada. Adicionalmente, a técnica de FISH foi padronizada para permitir a visualização de alguns grupos microbianos em amostras de solo rizosférico.

2. Material e Métodos

2.1. Experimento em Casa de Vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando a espécie florestal *Caesalpinia peltophoroides* Benth. O inóculo de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) empregado foi obtido pelo método *on farm*, produzido pela microempresa Cogumê Biotecnologia, em parceria com o Laboratório de Associações Micorrízicas (LAMIC) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A produção seguiu a metodologia de multiplicação de esporos de solo nativo em vasos com plantas de *Sorghum bicolor*, conforme descrito por Prates Júnior *et al.* (2020).

Sementes de *C. peltophoroides*, fornecidas pela Sociedade de Investigações Florestais (SIF) da UFV, foram desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio 2% e germinadas em areia autoclavada por aproximadamente 14 dias. As plântulas resultantes foram transplantadas para vasos de plástico de 2,3 L contendo substrato composto por uma mistura de solo horizonte B textural e areia (1:1), com a adição ou não de 30% (v/v) do inóculo de FMA *on farm*. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por um período de seis meses, sendo irrigadas diariamente para manter a umidade do substrato em torno de 60% da capacidade de campo. Adicionalmente, aos tratamentos com fertilização nutritiva, foi aplicada semanalmente a solução de Clark na concentração de 1/2 da força (Clark, 1975).

2.2. Análises de Crescimento, Colonização Micorrízica, Nutricionais e Físico-Químicas do solo rizosférico de estudo e condições experimentais

Ao final do período experimental, foram realizadas as seguintes avaliações nas plantas: volume radicular (obtido por deslocamento de água em proveta graduada), diâmetro do caule, altura da base do caule até a gema apical, altura radicular, massa fresca e massa seca da parte

aérea e das raízes. Para a determinação da massa seca, as amostras foram secas em estufa de circulação forçada a 65 °C até peso constante. A porcentagem de colonização micorrízica foi avaliada em amostras de raízes coletadas e fixadas em solução FAA (formaldeído, ácido acético e álcool etílico na proporção 5:5:90 v/v/v). As raízes foram descoloradas com hipoclorito de sódio comercial (2,5%) por 15 minutos, seguidas de acidificação em HCl 2% por 20 minutos, conforme metodologia descrita por Moreira *et al.* (2021). Em seguida, foram coradas com azul de tripano em lactoglicerol. A quantificação da colonização foi realizada por microscopia óptica EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA), com aumento de 200×, considerando a presença de arbúsculos, hifas, vesículas e esporos como indicativos de colonização.

Amostras de solo rizosférico, definido como o solo aderido às raízes após leve agitação, representando a zona de maior atividade microbiana e trocas entre planta e solo, e de tecido vegetal (parte aérea e raízes) foram coletadas e enviadas ao Laboratório de Análise de Solo, Tecido Vegetal e Fertilizante do Departamento de Solos da UFV, onde foram submetidas a análises físico-químicas para o solo e análises de rotina para o tecido vegetal.

2.3. Delineamento experimental

A tabela abaixo resume os tratamentos que foram empregados para avaliar a diversidade microbiana por amplicon no substrato, no solo acrescido de FMA *on farm* e no solo rizosférico. Cada tratamento teve três replicatas.

Tratamento	Componentes	Descrição
S	Substrato	Substrato sem planta nem inóculo, para caracterizar a comunidade original do Substrato
SI	Substrato + inóculo FMA <i>on farm</i>	Substrato acrescido de inóculo FMA <i>on farm</i> , sem planta, isolando o efeito da comunidade microbiana do inóculo
C1	Substrato + planta	Controle de cultivo, avaliando a microbiota associada às raízes
T1	Substrato + planta + fertilização	Avaliar o impacto da adição de nutrientes de Clark à microbiota rizosférica,

T2	Solo + planta + inóculo FMA <i>on farm</i>	Investigar o efeito do FMA <i>on farm</i> sobre a microbiota rizosférica
T3	Solo + planta + inóculo FMA <i>on farm</i> + fertilização	Estudar interações entre aporte nutricional e simbiose na microbiota rizosférica

2.4. Extração de DNA e envio para sequenciamento

A extração de DNA total das amostras de solo rizosférico e do controle do experimento, em triplicata, foi realizada a partir de 500 mg de solo com o kit NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel). A qualidade das amostras de DNA foi avaliada por análise de géis de agarose a 0,8 % (m v⁻¹) e foram quantificadas utilizando Qubit® dsDNA Assay Kit no Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, CA, EUA). As amostras de DNA foram enviadas para sequenciamento de alto rendimento (Illumina MiSeq, MrDNA Lab, Shallowater, EUA), utilizando as regiões do rRNA, com base nos primers 515F-806R para identificação taxonômica bacteriana e *primers* ITS1F-ITS2R para identificação taxonômica fúngica.

2.5. Análise de dados de sequenciamento de amplicon

Os dados brutos de sequenciamento, foram processados utilizando o pacote DADA2 no *software* R *version* 4.4.2 (2024-10-31) (R Core Team, 2025), seguindo o *pipeline* para 16S (available at: <http://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>) e para ITS (available at: http://benjjneb.github.io/dada2/ITS_workflow.html) (Callahan *et al.*, 2016). Os bancos de dados SILVA 138 foram utilizados para atribuir a taxonomia (McLaren, 2020; Quast *et al.*, 2012). As análises de diversidade, foram realizadas no *software* R, aplicando o pacote *microeco* (Liu *et al.*, 2021). As análises multivariadas para os dados biológicos e as variáveis ambientais foram realizadas pelo pacote *vegan* do *software* R (Oksanen *et al.*, 2013).

2.6. Análises estatísticas

As análises multivariadas foram executadas no ambiente RStudio (versão 4.4.2) (2024-10-31) (R Core Team, 2025) utilizando o pacote "vegan" (Oksanen *et al.*, 2022). Inicialmente, calculou-se a matriz de dissimilaridade de Bray–Curtis com base nos ASVs, que foi submetida ao Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS - *Non-metric Multidimensional Scaling*). Para análises complementares, realizou-se também a Análise de Componentes Principais (PCA - *Principal Component Analysis*) baseada na transformação Hellinger dos dados de abundância dos ASVs, apropriada para dados composicionais de comunidades microbianas (Legendre & Gallagher, 2001). O NMDS posicionou os pontos de modo a refletir as diferenças ecológicas em duas dimensões baseadas na dissimilaridade de Bray-Curtis, enquanto a PCA identificou os eixos que mais capturam a variação na comunidade bacteriana e fúngica. Para avaliar diferenças estatísticas entre tratamentos, aplicou-se a Análise de Variância Multivariada Permutacional (PERMANOVA - *Permutational Multivariate Analysis of Variance*) por meio do teste de Adonis, complementado por comparações múltiplas ajustadas pelo critério de Bonferroni. Em seguida, para relacionar a composição microbiana a variáveis ambientais, procedeu-se à Análise de Correspondência Canônica (CCA - *Canonical Correspondence Analysis*). Anteriormente à CCA, verificou-se a multicolinearidade entre preditores por meio do cálculo do Fator de Inflação da Variância (VIF - *Variance Inflation Factor*), eliminando-se variáveis com VIF elevado (> 10) para garantir a robustez dos parâmetros estimados na CCA (Akinwande *et al.*, 2015). Todas as etapas seguiram as recomendações e funções nativas do "vegan", assegurando confiabilidade na inferência ecológica.

A identificação de ASVs indicadoras foi realizada utilizando o método IndVal (Indicator Value) através do pacote *indicspecies* no ambiente RStudio (De Cáceres, 2016). Os dados de sequenciamento foram organizados em um objeto phyloseq e submetidos à análise IndVal.g com 999 permutações e nível de significância $\alpha = 0,05$. As ASVs significativas foram classificadas em únicas (indicadoras de apenas um tratamento) ou compartilhadas (indicadoras de múltiplos tratamentos). Para visualização, foi construída uma rede bipartida conectando tratamentos às suas ASVs indicadoras, utilizando os pacotes "igraph", "tidygraph" e "gggraph" (Pedersen, 2020; Csardi & Nepusz, 2006). O layout foi otimizado pelo algoritmo Fruchterman-Reingold, com tratamentos dispostos hexagonalmente e ASVs posicionadas conforme seu padrão de compartilhamento. Um sistema de coloração diferenciada foi implementado, sendo

que, ASVs únicas receberam a cor do seu tratamento, enquanto ASVs compartilhadas receberam cores específicas para cada combinação de tratamentos. As arestas foram ponderadas pelos valores de IndVal, com espessuras proporcionais à força da associação indicadora.

A análise de \log_2 -FoldChange (Love *et al.*, 2014) foi utilizada para quantificar as variações diferenciais na abundância relativa das ASVs indicadoras entre os tratamentos C1 (solo + planta) e T2 (solo + planta + inóculo FMA on farm). Os dados de abundância relativa foram previamente obtidos a partir da análise de espécies indicadoras, conduzida com o pacote “*indicspecies*” no ambiente R (Cáceres *et al.*, 2009). Para cada ASV, foi calculada a razão entre a média de abundância relativa em T2 e em C1. Os valores foram transformados em escala logarítmica de base 2 (\log_2), permitindo interpretar aumentos (valores positivos) ou reduções (valores negativos) na abundância relativa. Para a visualização dos resultados, foram consideradas as ASVs com táxons conhecidos com variação superior a 10 vezes ($|\log_2\text{-FC}| > 3,3$).

2.7. Teste metodológico de *Fluorescent in Situ Hybridization* (FISH) em solo rizosférico

Com o objetivo de validar a aplicabilidade da técnica de Hibridização *in Situ* Fluorescente (FISH - *Fluorescent in Situ Hybridization*) em amostras de solo rizosférico, foi realizado um teste metodológico utilizando sondas específicas para diferentes domínios microbianos. As sondas utilizadas foram: EUB338, direcionada ao domínio *Bacteria*; EUK538, para eucariotos totais; e AMF, específica para fungos micorrízicos arbusculares (FMA), todas marcadas com fluoróforos compatíveis com microscopia de epifluorescência (Amann *et al.*, 1995; Morales *et al.*, 2022). Como controle de DNA total, foi aplicado o corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), que se liga preferencialmente a regiões ricas em A-T do DNA de fita dupla (Li *et al.*, 2004).

Para causar a desagregação das partículas do solo, liberando as células microbianas e melhorar a penetração das sondas, as amostras foram suspensas em tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) contendo *Tween* 80 a 0,5% (v/v) e submetidas à vórtex e sonicação leve (3 ciclos de 2 minutos)), conforme adaptado de Zhou *et al.* (2007). Em seguida, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 3,4 % (v/v), desidratadas e aplicadas em lâminas de microscopia. A hibridização foi realizada em câmara úmida a 46 °C por 2 horas, seguida de lavagens em

wash buffer. A visualização foi feita em microscópio de fluorescência EVOS M5000 (Thermo Fischer Scientific, EUA) com filtros apropriados para os fluoróforos utilizados. Essa abordagem permitiu observar a distribuição espacial de bactérias, eucariotos e material genético de FMA diretamente no solo, independente de cultivo, bem como avaliar a eficiência de penetração e hibridização das sondas em uma matriz complexa como o solo.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise de Correspondência Canônica (CCA) dos Perfis Microbianos e sua Relação com Fatores Ambientais e Biológicos

Para investigar a influência da inoculação com FMA *on farm* sobre as comunidades microbianas e sua relação com variáveis abióticas e biológicas, foi realizada uma Análise de Correspondência Canônica (CCA), apresentada na Figura 1.

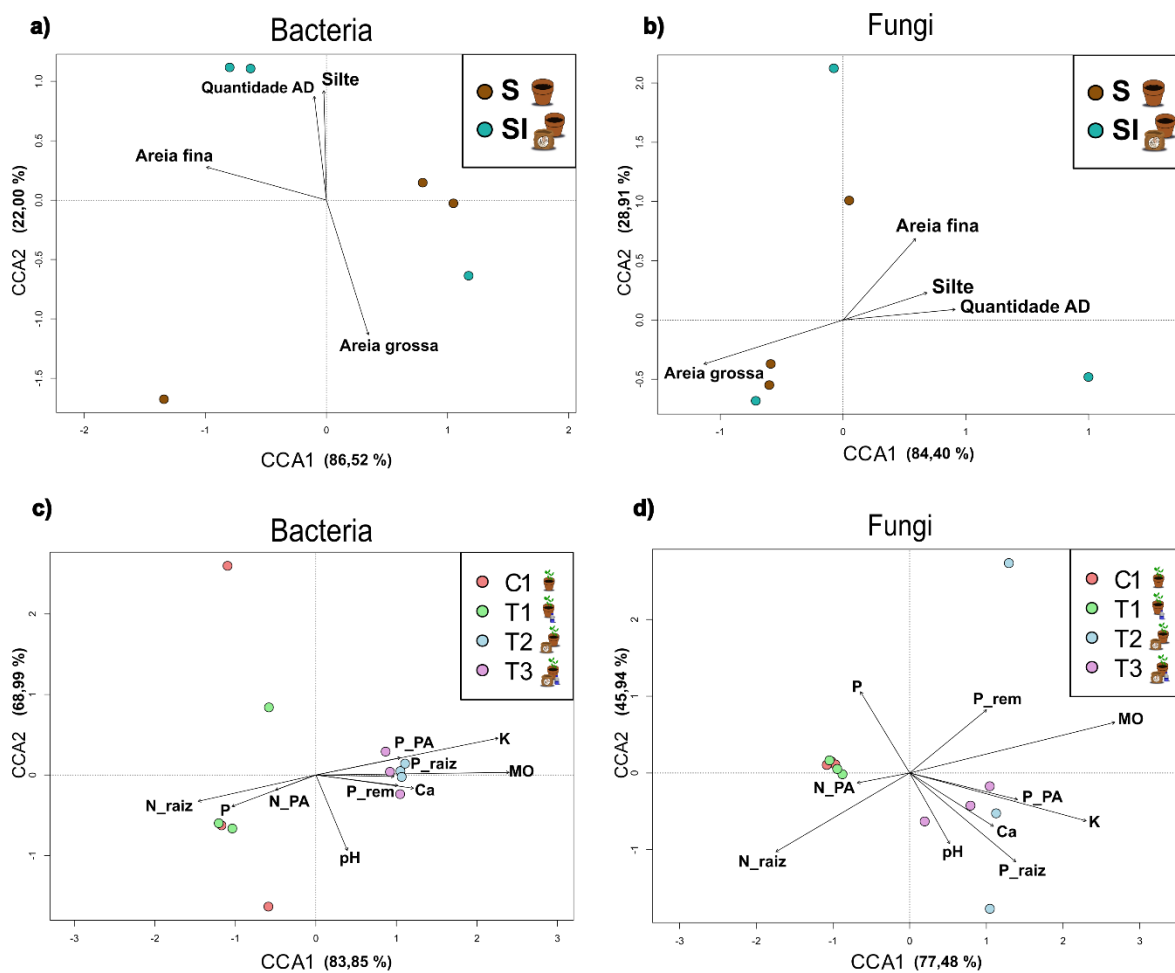


Figura 1: Análise de Correspondência Canônica (CCA) da composição das comunidades microbianas e suas associações com variáveis ambientais. Subfiguras 1a e 1b: CCA para as comunidades bacteriana e fúngica, respectivamente, nos tratamentos sem planta (S: Substrato; SI: substrato + inóculo). Subfiguras 1c e 1d: CCA para comunidades bacteriana e fúngica nos tratamentos com planta (C1: solo + planta; T1: planta + fertilização de Clark; T2: planta + inóculo; T3: planta + inóculo + fertilização). Vetores representam variáveis físico-químicas e nutricionais mais correlacionadas à distribuição das comunidades.

Os quadros da Figura 1 (1a e 1b) demonstram a CCA para as comunidades bacterianas e fúngicas, respectivamente, considerando os tratamentos de solo sem planta: Substrato (S) e solo com inóculo (SI). Observou-se uma separação clara entre S e SI em ambos os domínios, indicando que a adição do inóculo, por si só, remodelou a estrutura microbiana. No domínio Bacteria (Figura 1a), areia grossa esteve associada a S, enquanto silte, areia fina e AD

correlacionaram-se com SI, indicando que o inóculo alterou a textura do solo, o que influenciou a composição bacteriana. Para o domínio fúngico (Figura 1b), a separação entre S e SI também foi evidente, embora com pontuais dispersões entre as repetições. As amostras de SI se associaram a silte, areia fina e AD, reforçando o papel potencial da textura e da estabilidade do solo na mediação da comunidade fúngica.

Nas figuras 1c e 1d, são apresentados os tratamentos com planta (C1, T1, T2 e T3) para as comunidades bacterianas e fúngicas, respectivamente. Nesse contexto rizosférico, a CCA revelou um padrão de agrupamento distinto entre tratamentos inoculados e não inoculados. As amostras de C1 e T1 posicionaram-se mais à esquerda, associadas a vetores como nitrogênio na raiz (N_raiz), fósforo disponível (P) e nitrogênio de parte aérea (N_PA). Por outro lado, T2 e T3 se agruparam à direita, correlacionando-se com potássio (K), matéria orgânica (MO), fósforo remanescente (P_rem), fósforo da parte aérea (P_PA) e cálcio (Ca). Esses resultados indicam que a inoculação com FMA *on farm*, com ou sem fertilizante, direcionou a estrutura microbiana para um ambiente rizosférico mais rico em nutrientes e matéria orgânica, refletindo o potencial efeito funcional da simbiose.

3.2. Diversidade e Composição Taxonômica das Comunidades Bacterianas e Fúngicas

A análise de composição da comunidade microbiana das diferentes condições experimentais revelou padrões distintos de diversidade taxonômica, tanto para bactérias quanto para fungos (Figura 2).

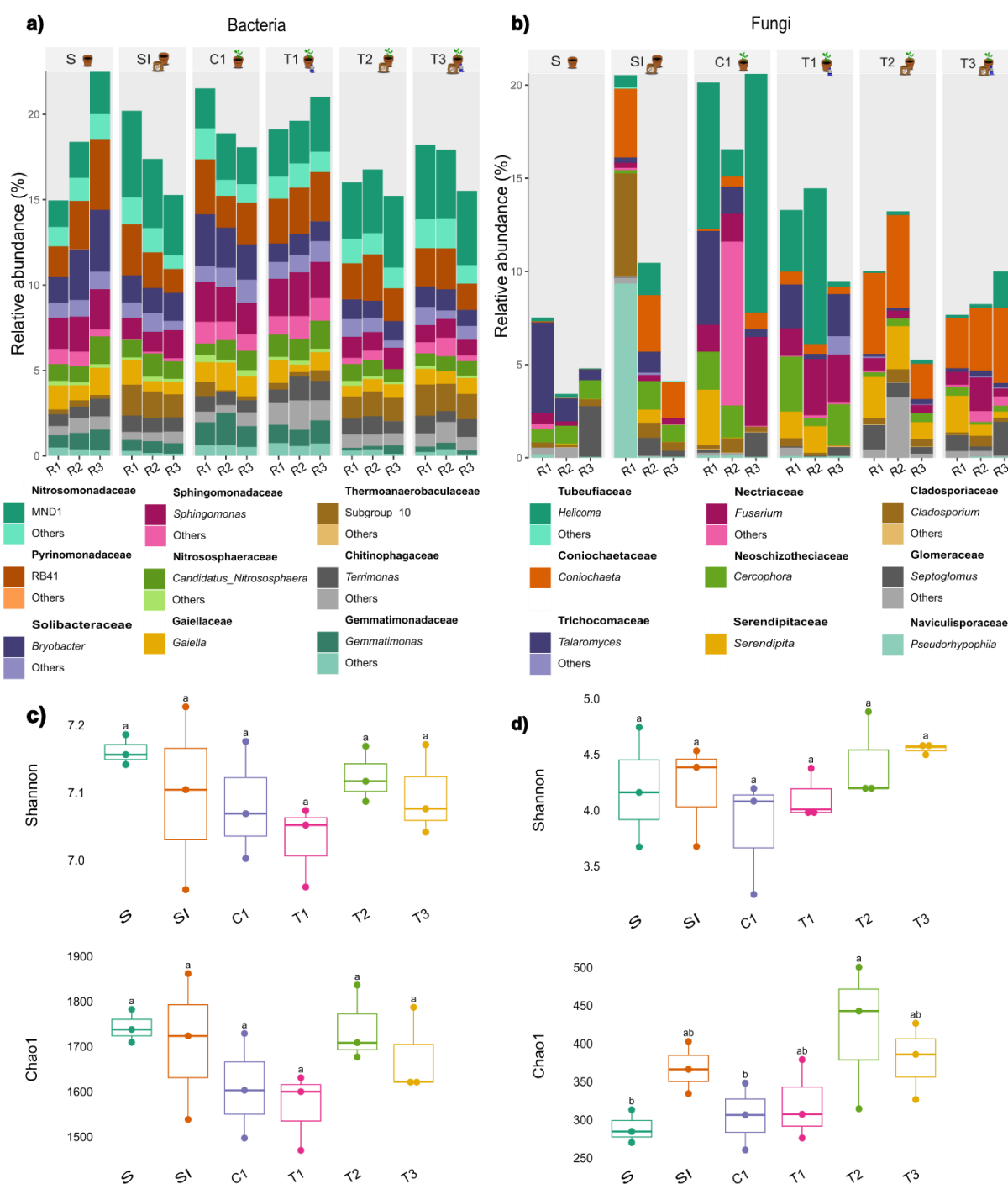


Figura 2: Composição e diversidade alfa das comunidades microbianas sob diferentes tratamentos. Abundância relativa das principais famílias e gêneros da comunidade bacteriana (a) e da comunidade fúngica (b). Índices de diversidade alfa (Shannon e Chao1) da comunidade bacteriana (c) e da comunidade fúngica (d), em que letras minúsculas diferentes acima dos boxplots indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido por teste de Tukey ou Dunn, $p \leq 0.05$). Tratamentos: S – Substrato; SI – Substrato + inóculo FMA *on farm*; C1 – Substrato + planta (controle sem fertilização nem

inóculo); T1 – Substrato + planta + fertilização de *Clark*; T2 – Substrato + planta + inóculo FMA *on farm*; T3 – Substrato + planta + inóculo FMA *on farm* + fertilização de *Clark*.

A composição taxonômica das comunidades bacterianas (Figura 2a) revelou pequenas variações entre os tratamentos, refletindo ajustes refinados na estrutura dos grupos predominantes. O Substrato (S) apresentou alta riqueza e distribuição equilibrada entre famílias, sem dominância de grupos específicos. A inoculação com FMA *on farm* (SI) manteve essa diversidade, mas reduziu ligeiramente a abundância de Sphingomonadaceae e Nitrosomonadaceae. A introdução da planta no tratamento controle (C1) promoveu maior prevalência de Sphingomonadaceae, sugerindo seleção rizosférica. No tratamento com fertilização (T1), observou-se maior dominância de Thermoanaerobacteraceae, indicando resposta da comunidade bacteriana aos nutrientes da solução de Clark. Nos tratamentos com inóculo (T2 e T3), houve redistribuição entre famílias, com aumento de Thermoanaerobacteraceae e redução de Gemmatimonadaceae, mas mantendo um padrão relativamente uniforme.

Apesar dessas mudanças taxonômicas, os índices de diversidade alfa (*Shannon* e *Chao1*) para bactérias (Figura 2) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Isso sugere que as alterações ocorreram na abundância relativa dos grupos, sem impactar substancialmente a riqueza ou equitabilidade da comunidade bacteriana.

Por outro lado, a comunidade fúngica apresentou maior sensibilidade aos diferentes tratamentos (Figura 2b). O solo de cultivo (S) foi dominado por Tubeufiaceae (*Helicoma*) e Trichomonaceae (*Talaromyces*), indicando baixa diversidade. A inoculação (SI) promoveu um aumento expressivo na riqueza, confirmado pelo índice *Chao1* (Figura 2d), com surgimento de grupos como *Cladosporium*, *Serendipita* e *Coniochaetaceae*. A presença da planta em C1 resultou em um perfil distinto, com maior proporção de *Helicoma*, *Coniochaeta*, *Talaromyces*, *Fusarium* e *Cercophora*, e queda na abundância de *Cladosporium*, indicando o impacto seletivo da rizosfera. A fertilização (T1) alterou a composição em favor de *Fusarium* (Nectriaceae) e Serendipitaceae, enquanto o inóculo (T2) favoreceu o estabelecimento de Cladosporiaceae, Serendipitaceae e Glomeraceae, demonstrando a emergência de táxons associados a fungos micorrízicos arbusculares. Já T3 apresentou uma distribuição mais balanceada entre famílias, sugerindo uma comunidade fúngica mais estável. O índice *Chao1* refletiu essas mudanças, sendo significativamente mais elevado nos tratamentos SI, T2 e T3, onde surgiram e se consolidaram novos grupos, de acordo com a composição taxonômica.

As comunidades bacterianas não apresentaram diferenças significativas nos índices de diversidade, apesar de pequenas redistribuições taxonômicas de abundância nos gráficos de composição. Por outro lado, as comunidades fúngicas responderam fortemente à presença do inóculo e da planta, com elevação da riqueza dado o surgimento de novos táxons. Em ambos os domínios, os microrganismos não classificados compuseram mais de 60 % da abundância relativa, fato comum em amostras de solo devido à complexidade e à limitação dos bancos de referência.

É importante ressaltar que, a composição relativa a táxons não classificados (*unknown taxa*) foi omitida da representação na figura, resultando em somas de abundância relativa que não correspondem a 100 %. Desse modo, subentende-se que a porcentagem não representada corresponde à fração das comunidades que não foi classificada taxonomicamente. Os conjuntos de dados da análise de diversidade microbiana incluíram 21.643 ASVs bacterianas e 3.032 ASVs fúngicas.

3.3. Integração da Diversidade Beta e Análise de Biomarcadores: Efeitos Complementares das Condições Experimentais na Estrutura e Função da Comunidade Microbiana

Ao integrar as análises de diversidade beta (PCA) e identificação de biomarcadores (LEfSe), foi possível evidenciar ainda mais como as diferentes condições nos tratamentos moldaram de forma complementar a estrutura e os perfis funcionais das comunidades microbianas (Figura 3).

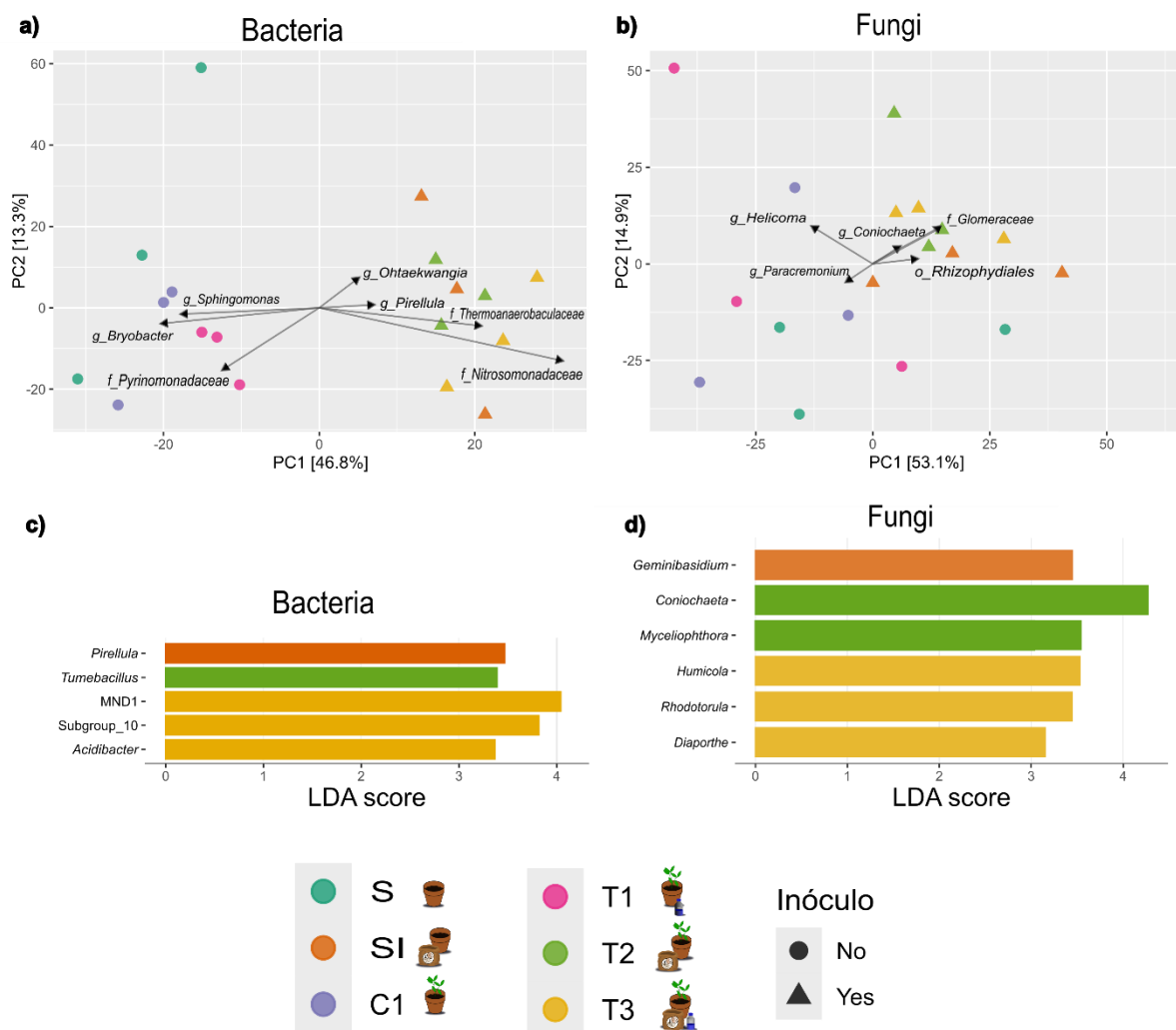


Figura 3: Análise integrada da estrutura e dos biomarcadores das comunidades microbianas nos diferentes tratamentos. (a) Análise de Componentes Principais (PCA) da comunidade bacteriana com base nas ASVs mais representativas. (b) PCA da comunidade fúngica. Cada ponto representa uma amostra biológica individual, colorida de acordo com o tratamento: S (Substrato), SI (substrato + inóculo), C1 (solo + planta), T1 (planta + fertilização), T2 (planta + inóculo) e T3 (planta + inóculo + fertilização). Triângulos indicam tratamentos que receberam inóculo FMA *on farm*. As setas (vetores) representam a correlação dos principais táxons (gêneros ou famílias mais abundantes) com a ordenação das amostras. (c) Biomarcadores taxonômicos do domínio *Bacteria* identificados pela análise LefSe (LDA > 2,0; $p < 0,05$), destacando táxons mais indicativos de cada condição experimental. (d) Biomarcadores taxonômicos do domínio *Fungi* identificados por LefSe, representando grupos com maior abundância relativa em cada tratamento.

Na prancha da figura 3, especificamente em 3a e 3b, a análise de diversidade beta revelou que os tratamentos avaliados promoveram alterações significativas na estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas, com explicação acumulada de 60,1% da variância para bactérias (PC1 = 46,8%; PC2 = 13,3%) e 68% para fungos (PC1 = 53,1%; PC2 = 14,9%). A separação espacial das amostras evidenciou o papel da inoculação com FMA *on farm* e da fertilização na remodelação do microbioma rizosférico.

No domínio Bacteria (Figura 3a), observou-se que o Substrato (S) e o solo com inóculo (SI) ocuparam posições opostas no gráfico, refletindo o impacto direto da inoculação na comunidade bacteriana, mesmo na ausência da planta. Já os tratamentos com planta se dividiram em dois grupos principais: no quadrante esquerdo, C1 e T1 (sem inoculação), associados a *Sphingomonas*, *Bryobacter* e à família Pyrinomonadaceae; no quadrante direito, T2 e T3 (inoculados), agrupados com SI, e positivamente correlacionados com os gêneros *Ohtaekwangia* e *Pirellula*, além das famílias Thermoanaerobaculaceae e Nitrosomonadaceae. O tratamento T2, em especial, apresentou baixo grau de dispersão entre réplicas, indicando que a inoculação isolada, na presença da planta, conduziu a uma comunidade bacteriana mais uniforme. Esse padrão foi reforçado pela análise LEfSe (Figura 3c), que identificou *Pirellula* e *Tumebacillus* como biomarcadores específicos de T2, e Nitrosomonadaceae, Thermoanaerobacteraceae e *Acidibacter* como biomarcadores de T3.

Para os fungos (Figura 3b), a separação entre S e SI também foi nítida, com o inóculo promovendo mudanças substanciais mesmo no solo sem planta. Entre os tratamentos com planta, a distinção entre grupos inoculados (T2 e T3) e não inoculados (C1 e T1) ficou evidente. *Helicoma* e *Paracremonium* foram mais associados às condições sem inóculo, enquanto *Coniochaeta*, Glomeraceae e representantes de Rhizophydiales estiveram correlacionados aos tratamentos inoculados. A análise LEfSe (Figura 3d) validou essas observações, identificando *Coniochaeta* e *Myceliophthora* como biomarcadores de T2, e *Humicola*, *Rhodotorula* e *Diaporthe* como táxons discriminantes de T3.

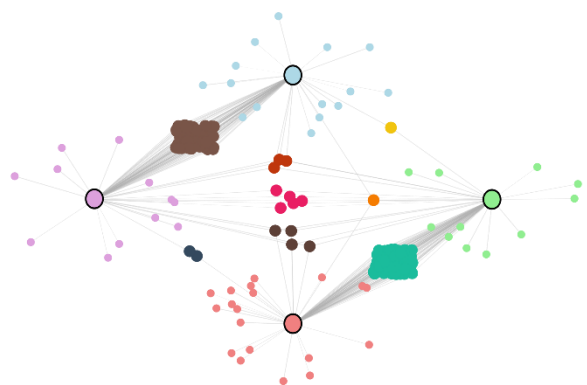
Portanto, ao integrar as análises de diversidade beta e de biomarcadores em uma única abordagem, foi possível observar de forma complementar não apenas como as comunidades microbianas se diferenciam entre os tratamentos, mas também quais grupos taxonômicos sustentam essas diferenças. Essa combinação fornece evidências robustas sobre o papel modulador da inoculação com FMA *on farm* na estrutura da microbiota rizosférica, além de

destacar táxons com potencial uso como bioindicadores da eficácia do uso desse inóculo em *C. peltophoroides*.

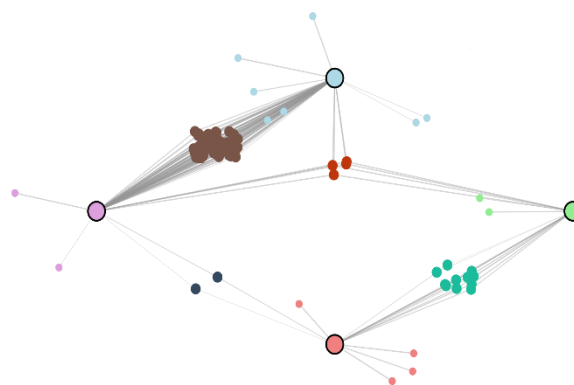
3.4. Interação de ASVs Indicadoras

A análise de espécies indicadoras revelou padrões distintos de associação entre ASVs e tratamentos para comunidades bacterianas e fúngicas (Figura 4). O sistema de coloração diferenciada permitiu identificar oito padrões principais de compartilhamento entre tratamentos, revelando a complexidade das interações microbianas e sua resposta diferencial aos tratamentos.

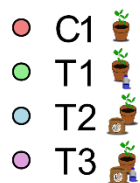
a) Bacteria



b) Fungi



Tratamentos



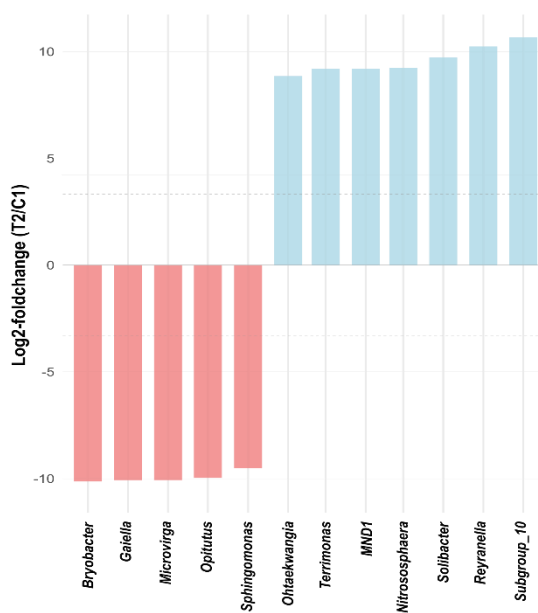
Tipo de ASV



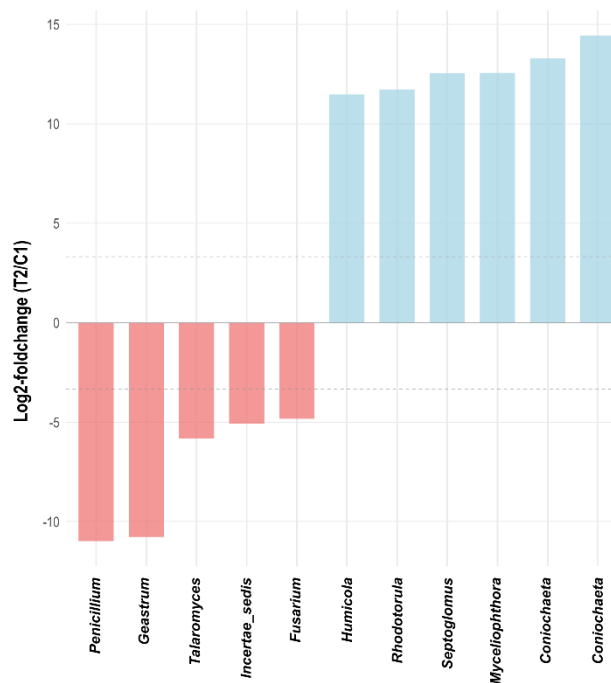
Cores das combinações



c) Bacteria



d) Fungi



Comparação de ASVs indicadoras



Figura 4: Rede de ASVs indicadoras para comunidades bacteriana (a) e fúngica (b) nos tratamentos com planta. Círculos maiores representam os tratamentos: C1 (solo + planta), T1 (planta + fertilização de *Clark*), T2 (planta + inóculo de FMA *on farm*) e T3 (planta + inóculo de FMA *on farm* + fertilização de *Clark*). Cada círculo menor corresponde a uma ASV indicadora associada a um ou mais tratamentos. ASVs únicas apresentam a mesma cor do respectivo tratamento, enquanto ASVs compartilhadas entre dois ou mais tratamentos recebem coloração específica de acordo com a legenda de cores. Os quadros (c) e (d) apresentam a comparação da abundância diferencial de ASVs indicadoras bacterianas e fúngicas, respectivamente, com base na análise de *Log2-Foldchange*. Foram apresentadas apenas as ASVs de gêneros descritos e que surtiram aumento ou diminuição maior que 10 vezes na abundância relativa em T2.

Para bactérias (Figura 4a), a rede foi composta por 241 vértices conectados por 425 arestas, totalizando 237 ASVs indicadoras distribuídas entre os quatro tratamentos. Destas, 57 ASVs foram classificadas como únicas (24%) e 180 como compartilhadas (76%), com oito padrões distintos de compartilhamento entre tratamentos.

O padrão de compartilhamento mais frequente foi C1_T1 (87 ASVs), seguido por T2_T3 (77 ASVs), indicando forte correlação entre o controle e o tratamento que incluiu apenas fertilização de *Clark* (C1_T1), bem como entre aqueles com inoculação de FMA (T2_T3). Combinações menos frequentes incluíram T1_T3 (5 ASVs), C1_T1_T3 (4 ASVs), T1_T2_T3 (3 ASVs), C1_T3 (2 ASVs), C1_T1_T2 (1 ASV) e T1_T2 (1 ASV), demonstrando a complexidade das respostas bacterianas às diferentes condições experimentais.

Para a comunidade fúngica (Figura 4b), a rede apresentou estrutura mais compacta, com 103 vértices e 187 arestas, totalizando 99 ASVs indicadoras. A proporção de ASVs compartilhadas foi maior (84 ASVs), com apenas 15 ASVs únicas. Nessa análise, ocorreram apenas quatro padrões de compartilhamento. O padrão predominante foi T2_T3 (67 ASVs), evidenciando o papel central da inoculação com FMA *on farm* na estruturação da comunidade fúngica. Os demais padrões incluíram C3_T1 (11 ASVs), T1_T2_T3 (4 ASVs) e C3_T3 (2 ASVs).

A maior proporção de ASVs compartilhadas em fungos (85%) comparada a bactérias (76%) sugere que a comunidade fúngica apresenta maior sobreposição entre tratamentos, possivelmente devido à maior plasticidade funcional dos fungos em resposta aos tratamentos aplicados. O predomínio das associações envolvendo inoculação de FMA (T2_T3) em ambos os grupos microbianos demonstra o efeito estruturante do inóculo na microbiota do solo. A maior densidade de conexões nos tratamentos combinados (T3) demonstra o efeito sinérgico entre fertilização e inoculação micorrízica na estruturação das comunidades microbianas do solo.

Complementando os dados de ASVs indicadoras, a análise de \log_2 -*Foldchange* foi aplicada para quantificar as variações diferenciais de abundância relativas da inoculação com FMA *on farm* em relação ao controle C1. Para a comunidade bacteriana (Figura 4c) e fúngica (Figura 4d), observou-se a presença de ASVs significativamente enriquecidas em ambos os tratamentos, permitindo identificar os grupos microbianos favorecidos ou suprimidos pela inoculação. ASVs com valores positivos de \log_2 -*Foldchange* indicam maior abundância relativa em T2 (inoculado), enquanto valores negativos representam redução em relação ao controle C1.

Na comunidade bacteriana (Figura 4c), o tratamento T2 apresentou aumento significativo na abundância relativa de ASVs pertencentes aos gêneros *Ohtaekwangia*, *Terrimonas*, *MND1* (f_Nitrosomonadaceae), *Nitrososphaera*, *Solibacter*, *Reyranella* e *Subgroup_10* (f_Thermoanaerobaculaceae). Gêneros como *Bryobacter*, *Gaiella*, *Microvirga*, *Opitutus* e *Sphingomonas* apresentaram redução significativa para T2. Na comunidade fúngica (Figura 4d), o tratamento T2 favoreceu o aumento de ASVs dos gêneros *Humicola*, *Rhodotorula*, *Septoglomus*, *Myceliophthora* e *Coniochaeta*. Em contrapartida, houve redução na abundância relativa de *Penicillium*, *Geastrum*, *Talaromyces* e *Fusarium*.

3.5. Teste Metodológico de *Fluorescent hybridization in situ* (FISH)

Nas imagens geradas pelo teste metodológico de FISH em solo rizosférico, observou-se fluorescência específica para cada sonda aplicada, confirmando a eficiência da hibridização (Figura 5).

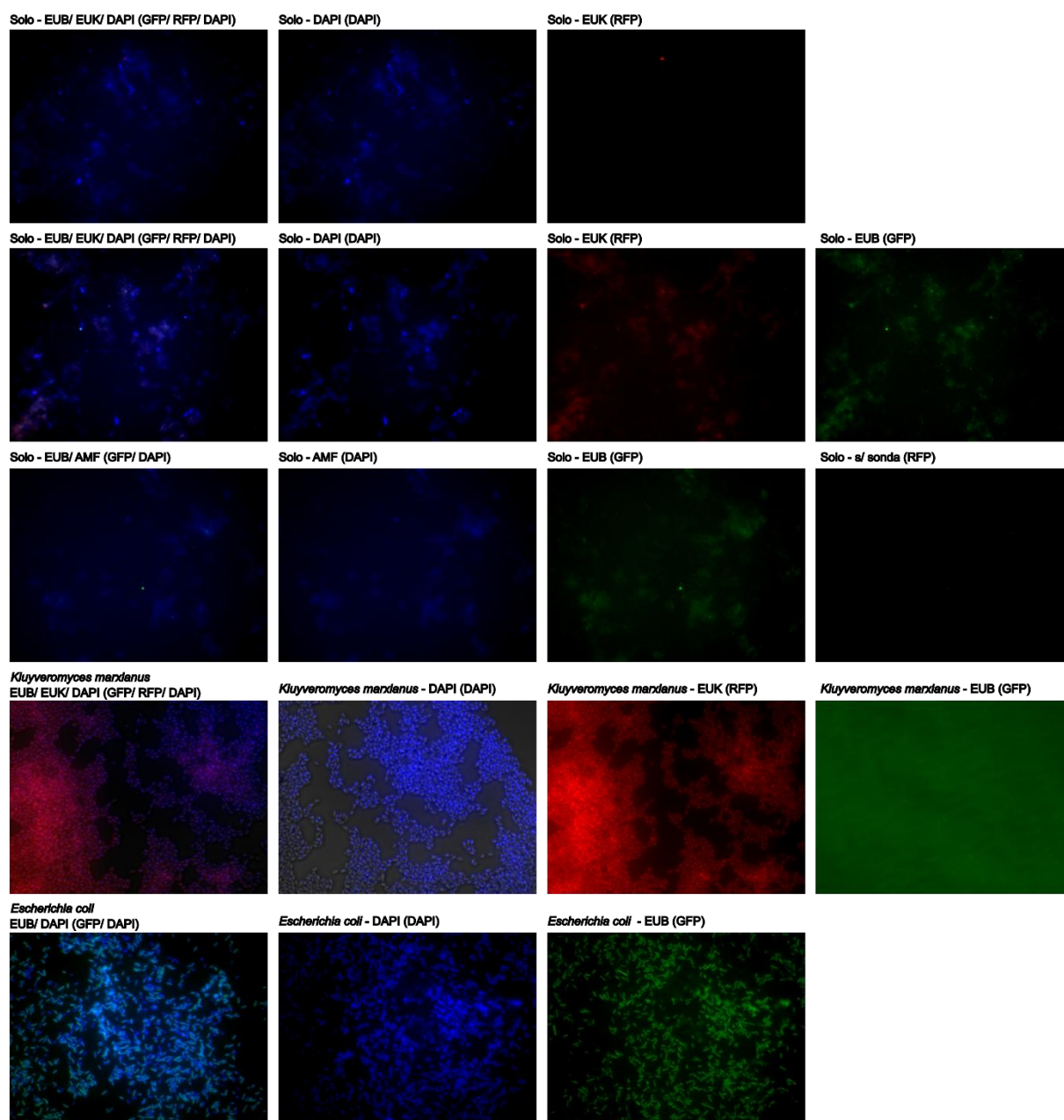


Figura 5: Visualização por FISH em amostras de solo rizosférico, *Escherichia coli* e *Kluyveromyces marxianus* com diferentes sondas e fluoróforos. Na primeira, segunda e terceira linhas, os poços referem-se às amostras de solo marcadas com combinações das sondas EUB338 (domínio Bacteria), EUK538 (Eukarya), AMF (fungos micorrízicos arbusculares) e o corante DAPI (DNA total). Na quarta linhas estão células de *Kluyveromyces marxianus* marcadas com os mesmos fluoróforos. Na última linha, células de *Escherichia coli* marcadas com sonda EUB e corante DAPI. As imagens foram capturadas em microscopia de epifluorescência com filtros para os fluoróforos GFP (verde), RFP (vermelho) e DAPI (azul).

A organização das lâminas remete à testagem das sondas quanto à especificidade e eficiência de hibridização em matriz complexa de solo rizosférico.

Em amostras tratadas simultaneamente com EUB338 (GFP), EUK538 (RFP) e DAPI (DAPI), foram visualizadas regiões de fluorescência verde, vermelha e azul, correspondendo à presença de bactérias, eucariotos e DNA total, respectivamente. A aplicação isolada de DAPI evidenciou toda a população de células com DNA geral como alvo, enquanto as sondas EUB338 e EUK538, marcadas separadamente, destacaram predominantemente células bacterianas e de eucariotos.

Na combinação de EUB e AMF, ambas as sondas revelaram pontos fluorescentes muito semelhantes entre si, indicando possíveis associações entre materiais genéticos de bactérias e fungos micorrízicos arbusculares. O controle sem sonda não apresentou fluorescência detectável, descartando autofluorescência da matriz do solo. Em amostras de *Kluyveromyces marxianus* e de *Escherichia coli*, usados como isolados controles, a hibridização com EUB338, EUK538 e DAPI validou a especificidade das sondas e dos fluoróforos.

Em conjunto, esses resultados demonstram que o protocolo otimizado de FISH, que inclui suspensão em PBS, e submissão das amostras à Tween 80, sonicação leve, fixação em paraformaldeído e hibridização a 46 °C, é capaz de detectar e diferenciar bactérias, eucariotos e material genético de fungos micorrízicos vindos de amostras de solo rizosférico. Essa validação experimental destaca o FISH como ferramenta promissora para o monitoramento espacial de biomarcadores microbianos em estudos de bioinoculação.

Discussão

Os resultados apresentados nesse capítulo sugerem que a aplicação de FMA *on farm* em *Caesalpinia peltophoroides* modificou claramente a microbiota rizosférica e impactou as propriedades físico-químicas do solo. A Análise de Correlação Canônica (CCA) revelou que silte, areia fina e matéria orgânica se correlacionaram fortemente com a comunidade microbiana nos tratamentos inoculados, apontando que o consórcio micorrízico influenciou parte química, bem como a textura e a agregação do solo.

Entre os biomarcadores, em bactérias, o gênero *Pirellula* destacou-se nos solos rizosféricos inoculados. *Pirellula* é um táxon bacteriano associado à ciclagem de nitrogênio no solo, atuando na transformação de nitrogênio e no aumento do seu conteúdo disponível na rizosfera (Ravinath *et al.*, 2022). Além disso, *Pirellula* foi identificado como uma bactéria característica que contribui para o maior teor de nutrientes disponíveis no solo rizosférico e para a elevação da atividade enzimática relacionada a ciclos biogeoquímicos-chave, o que pode impactar diretamente a promoção de crescimento vegetal (Jia *et al.*, 2024).

A análise de biomarcadores também identificou o gênero fúngico *Coniochaeta* como taxa significativo dos tratamentos com inóculo de FMA *on farm*. A literatura relata que *Coniochaeta* são comumente encontradas em solos, sedimentos e consórcios microbianos derivados de madeira em decomposição (Jiménez *et al.*, 2020). Isso indica que este microrganismo é adaptado a ambientes ricos em lignocelulose e desempenha um papel na degradação de matéria orgânica complexa (Liang *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2023). A abundância de *Coniochaeta* em consórcios microbianos degradadores de palha de trigo, por exemplo, reforça sua capacidade de participar ativamente na ciclagem de nutrientes a partir de resíduos vegetais do solo (Wang *et al.*, 2021). No contexto da rizosfera de *C. peltophoroides*, a presença de *Coniochaeta* pode, portanto, contribuir para a liberação de nutrientes essenciais à planta por meio da decomposição de detritos vegetais, indiretamente favorecendo o crescimento e o desenvolvimento da planta, como observado por Jiménez *et al.* (2020) em pesquisa com consórcios de palha de trigo.

Para a comunidade bacteriana, os índices de diversidade alfa (*Shannon* e *Chao1*) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, o que sinaliza que a inoculação com FMA *on farm*, ou até mesmo a fertilização de *Clark*, redirecionaram abundâncias relativas sem prejudicar padrões de riqueza ou diversidade (Finn *et al.*, 2021). Já no domínio fúngico, a riqueza (*Chao1*) aumentou significativamente nos tratamentos com planta e inóculo de FMA *on farm*. Esse incremento refletiu na maior representação de famílias do filo Glomeromycota, como Glomeraceae e Serendipitaceae. Tais microrganismos apresentam hifas extrarradiculares, que ampliam a captura de P e micronutrientes em associação simbiótica e podem dessa forma ter atuado no melhor desenvolvimento das plantas de *C. peltophoroides* inoculadas neste estudo (Ahmed *et al.*, 2025; Parniske *et al.*, 2008).

No domínio Bacteria, a beta diversidade (PC1=46,8%; PC2=13,3%) revelou uma clara separação entre Substrato (S) e substrato + inóculo de FMA *on farm* (SI), bem como entre tratamentos com planta sem inoculação (C1, T1) e com inoculação (T2, T3). Os vetores

taxonômicos indicaram correlações positivas de S e C1/T1 com *Sphingomonas*, *Bryobacter* e *Pyrinomonadaceae*, enquanto SI, T2 e T3 se associaram a *Ohtaekwangia*, *Pirellula*, *Thermoanaerobaculaceae* e *Nitrosomonadaceae*. A estabilidade dos índices de diversidade alfa bacteriana, apesar dessas redistribuições, sugere que a riqueza e a equitabilidade não foram tão impactadas, mas que o inóculo redirecionou abundâncias relativas em favor de grupos nitrificantes e *planctomycetais*, que são capazes de converter amônia diretamente em nitrogênio gasoso, quando em condições anaeróbias (Ravinath *et al.*, 2022; Jia *et al.*, 2024).

Para a comunidade fúngica, a beta diversidade (PC1=53,1%; PC2=14,9%) também destacou o impacto do inóculo e da fertilização na comunidade. As condições sem inóculo (S, C1, T1) se relacionaram principalmente a *Helicoma* e *Paracremonium*, enquanto os tratamentos com inóculo se correlacionaram com *Coniochaeta*, *Glomeraceae* e *Rhizophydiales*. O índice *Chao1* aumentou significativamente em SI, T2 e T3, refletindo o surgimento de táxons saprófitos e micorrízicos como *Coniochaetaceae* e *Serendipitaceae*, ambos ligados à decomposição de lignocelulose e à mobilização de nutrientes (Jiménez *et al.*, 2020; Shinde *et al.*, 2022).

A rede de ASVs indicadoras forneceu uma visão complementar, sendo que 24% das ASVs bacterianas foram exclusivas de um único tratamento, enquanto 76% foram compartilhadas, com destaque para os padrões C1–T1 e T2–T3. Em fungos, apenas 15% das ASVs foram únicas, e 85% compartilhadas, principalmente entre T2 e T3, o que evidencia uma maior plasticidade e conectividade funcional da microbiota fúngica (Manfredini *et al.*, 2021).

A análise de *log2-Foldchange*, aplicada para comparar os tratamentos C1 (solo + planta) e T2 (solo + planta + inóculo FMA *on farm*), permitiu evidenciar os gêneros microbianos que apresentaram variações significativas na abundância relativa em resposta à inoculação. Entre os gêneros bacterianos enriquecidos destacam-se os grupos associados a funções ecológicas relevantes, como a nitrificação (*Nitrososphaera*, *MND1*) (Norton & Ouyang, 2019; Lehtovirta-Morley *et al.*, 2016), a degradação de matéria orgânica (*Solibacter*, *Terrimonas*) (Zhang *et al.*, 2013; Ward *et al.*, 2009) e a adaptação a ambientes oligotróficos (*Subgroup_10*, *Reyranella*) (Dedysh & Yilmaz, 2018). Na comunidade fúngica, os gêneros com aumento expressivo incluem fungos associados à decomposição de resíduos lignocelulósicos (*Humicola*, *Myceliophthora*) (Ibrahim *et al.*, 2021; Gomes, 2018), produção de metabólitos bioativos (*Rhodotorula*) (Kot *et al.*, 2016), e simbiose micorrízica arbuscular (*Septoglomus*) (Öpik *et al.*, 2010). Por outro lado, a diminuição de fungos como *Fusarium* em T2, indica o benefício do

inóculo de FMA *on farm* no biocontrole desses grupos patógenos de plantas. Conhecidamente, algumas espécies de *Fusarium* podem provocar sintomas como marchas vasculares, podridão radicular, necrose e morte de plantas, além de serem produtoras de micotoxinas, impactando esferas da segurança alimentar, bem como a saúde humana e animal (Ekwomadu *et al.*, 2023). A dinâmica de ASVs indicadoras, no geral, evidencia o papel estruturante do inóculo FMA *on farm* na modulação da microbiota do solo, promovendo grupos funcionalmente relevantes para a ciclagem de nutrientes, estabilidade da rizosfera, promoção do crescimento vegetal e diminuição de grupos patógenos de plantas.

Nesse capítulo, a primeira otimização de protocolo de FISH em solo rizosférico das amostras de *C. peltophoroides*, é um ponto de partida, para no futuro, validar a presença e a distribuição espacial de principais grupos microbianos, bem como biomarcadores para o inóculo de FMA *on farm*.

Em resumo, a integração das análises de CCA, análises de diversidade alfa e beta, LefSE, bem como as análises de ASVs indicadoras, por log₂-Foldchange, revelou que o inóculo FMA *on farm* reestrutura a microbiota rizosférica de *C. peltophoroides*, promovendo comunidades conhecidamente capazes de elevar a ciclagem de nutrientes e de favorecer o estabelecimento de simbioses benéficas. Com ajustes na metodologia de FISH para solo rizosférico, os biomarcadores, como *Pirellula*, *Coniochaeta*, Glomeraceae e Nitrosomonadaceae, são candidatos promissores para monitorar a persistência e a eficácia desse inoculante em condições de campo. Esses resultados reforçam o potencial do FMA *on farm* para a produção de mudas florestais robustas de forma sustentável, alinhando-se às demandas globais por redução de insumos químicos e impactos ambientais, possibilitando a aplicação dessas mudas, com maior chance de sobrevivência, em programas de reabilitação de áreas impactadas.

4. Conclusões

O tratamento com FMA *on farm* em mudas de *Caesalpinia peltophoroides* reestruturou de forma clara a microbiota rizosférica e alterou características físico-químicas do solo através de um conjunto integrado de processos que envolvem a micorrizosfera, o metabolismo vegetal e as interações planta-solo-microrganismo. A análise multivariada demonstrou que a matéria orgânica se correlacionou positivamente aos tratamentos inoculados, refletindo a maior

atividade biológica e deposição de carbono na rizosfera, enquanto a diversidade beta revelou que táxons relacionados ao ciclo do N (*Pirellula*, Nitrosomonadaceae) e de decomposição de matéria orgânica (*Coniochaeta*, Glomeraceae) foram selecionados pelo sistema planta-inóculo de FMA *on farm*. A diversidade alfa bacteriana manteve-se estável, mas a riqueza fúngica (*Chao1*) aumentou significativamente nas mudas inoculadas, confirmando nossa hipótese de que o tratamento com inóculo modifica a dinâmica da composição e da estrutura microbiana na rizosfera através de efeitos cascata que incluem alterações nos exsudatos radiculares, estabelecimento da micorrizosfera e mudanças no metabolismo da planta hospedeira.

Esses *insights* revelam que o inoculante FMA *on farm* tanto promove o estabelecimento de simbioses benéficas, como também cria nichos nos quais processos fundamentais de ciclagem de nutrientes podem ser potencializados.

Do ponto de vista prático, esses resultados oferecem um roteiro para viveiros e programas de restauração, em que o monitoramento de biomarcadores por FISH ou mesmo por PCR específico para grupos indicadores podem servir como ferramenta rápida de avaliação de qualidade de inoculação e persistência do bioinoculante. A adoção dessa estratégia de bioinoculação contribui para reduzir insumos químicos, melhorar a sobrevivência de mudas e possivelmente restaurar a saúde de solos degradados.

5. Referências bibliográficas

AHMED, N. *et al.* Symbiotic synergy: How Arbuscular Mycorrhizal Fungi enhance nutrient uptake, stress tolerance, and soil health through molecular mechanisms and hormonal regulation. **IMA Fungus**, v. 16, p. e144989, 2025.

AKINWANDE, M. O. *et al.* Variance inflation factor: as a condition for the inclusion of suppressor variable (s) in regression analysis. **Open Journal of Statistics**, v. 5, n. 07, p. 754, 2015.

AKYOL, T. Yigit *et al.* Impact of introduction of arbuscular mycorrhizal fungi on the root microbial community in agricultural fields. **Microbes and Environments**, v. 34, n. 1, p. 23-32, 2019.

AMANN, R. *et al.* Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 339-348, 2008.

AMANN, R. I. *et al.* Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 2, p. 762-770, 1990.

AMANN, R. I. *et al.* Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

BAEZ-ROGELIO, A. *et al.* Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. **Microb Biotechnol**, 10 (1), 19-21. 2017.

Bioinsumos, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. <http://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/bioinsumos>. Visualizado em 04/10/2023.

CÁCERES, M. D. *et al.* Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. **Ecology**, v. 90, n. 12, p. 3566-3574, 2009.

CALLAHAN, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.

CERQUEIRA, L. *et al.* DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1944-1960, 2008.

CHEN, M. *et al.* Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi—from ecology to application. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1270, 2018.

CLARKE, K. R. *et al.* Getting started with PRIMER v7. PRIMER-E: Plymouth, Plymouth Marine Laboratory, v. 20, n. 1, 2015.

CSARDI, G. *et al.* The igraph software. **Complex Syst**, v. 1695, p. 1-9, 2006.

DE CACERES, M. *et al.* Package ‘indicpecies’. **Indicators**, v. 8, n. 1, 2016.

DEDYSH, S.a N. & YILMAZ, P. Refining the taxonomic structure of the phylum Acidobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 3796-3806, 2018.

DELONG, E. F. *et al.* Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. **Science**, v. 243, n. 4896, p. 1360-1363, 1989.

DORAN, J. W. *et al.* Defining and assessing soil quality. **Defining Soil Quality for a Sustainable Environment**, v. 35, p. 1-21, 1994.

DOUDS JR, D. D. *et al.* On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 809-818, 2006.

EKWOMADU, T. I. *et al.* *Fusarium* fungi pathogens, identification, adverse effects, disease management, and global food security: A review of the latest research. **Agriculture**, v. 13, n. 9, p. 1810, 2023.

FINN, D. R. *et al.* Cropping systems impact changes in soil fungal, but not prokaryote, alpha-diversity and community composition stability over a growing season in a long-term field trial. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 10, p. fiab136, 2021.

GOMES, A. C. dos S. Mecanismo de indução de enzimas despolimerizantes da biomassa vegetal em *Myceliophthora thermophila*. 2018.

GOULET, F. Characterizing alignments in socio-technical transitions. Lessons from agricultural bio-inputs in Brazil. **Technology in Society**, v. 65, p. 101580, 2021.

HANNULA, S. E. *et al.* Persistence of plant-mediated microbial soil legacy effects in soil and inside roots. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 5686, 2021.

IBRAHIM, S. RM *et al.* Natural products of the fungal genus *Humicola*: Diversity, biological activity, and industrial importance. **Current Microbiology**, v. 78, n. 7, p. 2488-2509, 2021.

JESUS, E. da C. Bacterial community diversity and structure in soils from different land use systems of the western Brazilian Amazon evaluated by T-RFLP and sequencing analyses. 2008.

JIA, X. *et al.* Analysis of rhizosphere soil microbial diversity and its functions between Dahongpao mother tree and cutting Dahongpao. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1444436, 2024.

JIMÉNEZ, D. J. *et al.* Defining the eco-enzymological role of the fungal strain *Coniochaeta* sp. 2T2. 1 in a tripartite lignocellulolytic microbial consortium. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 1, p. fiz186, 2020.

KOT, A. M. *et al.* *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 6103-6117, 2016.

LASA, A. V. *et al.* Metabarcoding reveals that rhizospheric microbiota of *Quercus pyrenaica* is composed by a relatively small number of bacterial taxa highly abundant. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1695, 2019.

LEE, S. *et al.* Effects of Organic Farming on Communities of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Mycobiology**, v. 36, n. 1, p. 19-23, 2008.

LEGENDRE, P. & GALLAGHER, E. D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, v. 129, n. 2, p. 271-280, 2001.

LEHTOVIRTA-MORLEY, L. E. *et al.* Isolation of *Candidatus Nitrosocosmicus franklandus*, a novel ureolytic soil archaeal ammonia oxidiser with tolerance to high ammonia concentration. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 5, p. fiw057, 2016.

LI, Y. *et al.* Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms—a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, p. 301-311, 2004.

LIANG, Y. *et al.* Impact of Aerated Irrigation Duration on the Growth of Greenhouse Grape Seedlings and Rhizosphere Soil Microorganisms. **Horticulturae**, v. 10, n. 12, p. 1351, 2024.

LIU, C. *et al.* microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 2, p. fiaa255, 2021.

LOVE, M. I. *et al.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, p. 1-21, 2014.

- MANFREDINI, A. *et al.* Current methods, common practices, and perspectives in tracking and monitoring bioinoculants in soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 698491, 2021.
- MCLAREN, M. R. Silva SSU taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 138), 2020.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>>. MME, 2020.
- MORALES, D. P. *et al.* Advances and challenges in fluorescence in situ hybridization for visualizing fungal endobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 892227, 2022.
- NORTON, J. & OUYANG, Y. Controls and adaptive management of nitrification in agricultural soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1931, 2019.
- OKSANEN, J. *et al.* Package ‘vegan’. **Community ecology package, version**, v. 2, n. 9, p. 1-295, 2013.
- OKSANEN, J. *et al.* **Vegan: a community ecology. R package version**, p. 1-297, 2018.
- ÖPIK, M. *et al.* The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **New Phytologist**, v. 188, n. 1, p. 223-241, 2010.
- PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 763-775, 2008.
- PEDERSEN, T. L. ggraph: An implementation of grammar of graphics for graphs and networks. **R package version**, v. 2, n. 3, p. 1, 2020.
- PENA JUNIOR, M. A. G. *et al.* O futuro da agricultura brasileira: 10 visões. 2023.
- PRADHAN, S. K. *et al.* Illumina MiSeq based assessment of bacterial community structure and diversity along the heavy metal concentration gradient in Sukinda chromite mine area soils, India. **Ecological Genetics and Genomics**, v. 15, p. 100054, 2020.
- PRATES JÚNIOR, P. (Coord). Micorrizas arbusculares: conceitos, metodologias e aplicações. 1. ed. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Núcleo Regional Leste, Minas Gerais, 2021.

PRATES JÚNIOR, P. *et al.* Extensão em Microbiologia: mudas inoculadas com microrganismos benéficos na bacia do rio Doce. **Revista Ciência em Extensão**, v. 16, p. 332-343, 2020.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

RAVINATH, R. *et al.* Targeted metagenome sequencing reveals the abundance of Planctomycetes and Bacteroidetes in the rhizosphere of pomegranate. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 8, p. 481, 2022.

SCHIMAK, M. P. *et al.* MiL-FISH: Multilabeled oligonucleotides for fluorescence in situ hybridization improve visualization of bacterial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 62-70, 2016.

SHINDE, R. *et al.* Potential of lignocellulose degrading microorganisms for agricultural residue decomposition in soil: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 320, p. 115843, 2022.

SILVA, R. MF *et al.* *Coniochaeta monsterae*, sp. nov.,(Coniochaetaceae, Coniochaetales): a new endophytic fungal species from Brazil. **Sydowia**, v. 75, p. 283, 2023.

SIMON, C. *et al.* Metagenomic analyses: past and future trends. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153-1161, 2011.

TABERLET, P. *et al.* Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. **Oxford University Press**, 2018.

TEIXEIRA, A. FS *et al.* Microbiological Indicators of Soil Quality Under Native Forests are Influenced by Topographic Factors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, 2019.

VIEIRA, N. A. Promoção de crescimento de espécies florestais a partir da triagem e inoculação de consórcios microbianos. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2021.

WANG, Y. *et al.* Effect of culture conditions on the performance of lignocellulose-degrading synthetic microbial consortia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 7981-7995, 2021.

WARD, N. L. *et al.* Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

ZHANG, X. *et al.* Soil bacterial communities respond to climate changes in a temperate steppe. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e78616, 2013.

ZHOU, J. *et al.* Functional molecular ecological networks. **MBio**, v. 1, n. 4, p. 10.1128/mbio.00169-10, 2010.

ZHOU, Z. *et al.* Automated image analysis for quantitative fluorescence in situ hybridization with environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 2956-2962, 2007.

CAPÍTULO 3

Especialização funcional da rizosfera de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. inoculada com FMA *on farm*: otimização da comunidade microbiana para a promoção de crescimento

1. Introdução

O espaço rizosférico abrange uma complexa rede de interações microbianas que desempenham papéis importantes na ciclagem de nutrientes, promoção do crescimento vegetal e resistência a estresses (Berendsen *et al.*, 2012). Enquanto estudos baseados em sequenciamento de *amplicons* revelam a composição taxonômica dessas comunidades, a metagenômica *shotgun* surge como uma ferramenta promissora para desvendar o potencial funcional dessas comunidades, além de permitir a reconstrução de genomas microbianos e a identificação de genes-chave associados aos processos biogeoquímicos e aos mecanismos de PGP (*plant growth promotion*) (Quince *et al.*, 2017). No contexto de bioinoculantes, a exemplo de FMA *on farm*, compreender “quem está presente” e “o que eles podem fazer” é essencial para otimizar sua aplicação e prever impactos no solo rizosférico (Manfredini *et al.*, 2021).

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) são reconhecidos por sua capacidade de melhorar a aquisição de nutrientes e modular a microbiota do solo (Sadhana *et al.*, 2014; Bagyara and Sturmer., 2012). No entanto, inóculos de FMA obtidos pelo método *on farm*, por sua natureza não estéril, carregam uma diversidade microbiana adicional, cujas funções, nesse sistema de inóculo, permanecem pouco investigadas. A predição funcional via metagenômica *shotgun* tem o potencial de gerar *insights* sobre como esse inóculo atua na rizosfera, passando por diversos mecanismos que incluem desde a degradação de matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, à síntese de fitormônios, bem como à resistência a estresses abióticos (Levy *et al.*, 2018). Além disso, a reconstrução de Genomas Montados a partir de Metagenomas (*Metagenome-Assembled Genomes – MAGs*) permite vincular funções a microrganismos específicos, superando limitações de análises baseadas apenas em marcadores taxonômicos (Albertsen *et al.*, 2013).

Para espécies florestais, como *Caesalpinia peltophoroides* Benth., cuja produção de mudas demanda estratégias sustentáveis, entender a funcionalidade microbiana associada ao inóculo de FMA *on farm* é um passo relevante. Estudos recentes destacam que a eficácia de

bioinoculantes depende não apenas da presença de FMA, mas também de interações sinérgicas com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) (Basu *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a abordagem de metagenômica *shotgun* pode demonstrar o potencial funcional dessas associações, revelando, por exemplo, como se dá a contagem de categorias metabólicas e a presença de genes relacionados à PGP triados em *MAGs* vindas do solo rizosférico. Portanto, nosso objetivo foi empregar a abordagem de *shotgun* para predizer o perfil funcional do inóculo de FMA *on farm* e seu impacto no Substrato, e no solo rizosférico de *C. peltophoroides*, comparando tratamentos inoculados e não inoculados, além de reconstruir *MAGs* para caracterizar microrganismos-chave presentes no Substrato, no inóculo e na rizosfera, relacionando-os a processos de PGP, buscando explicar diferenças observadas no crescimento das mudas.

2. Material e Métodos

2.1. Experimento em Casa de Vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando a espécie florestal *Caesalpinia peltophoroides* Benth. O inóculo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) utilizado foi obtido pelo método *on farm*, produzido pela microempresa Cogumê Biotecnologia em colaboração com o Laboratório de Associações Micorrízicas (LAMIC), vinculado à Universidade Federal de Viçosa (UFV). A produção seguiu a metodologia de multiplicação de esporos de solo nativo em vasos com plantas de *Sorghum bicolor*, conforme descrito por Moreira *et al.* (2021).

Sementes de *C. peltophoroides*, fornecidas pela Sociedade de Investigações Florestais (SIF) da UFV, foram desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio 2% e germinadas em areia autoclavada por aproximadamente 14 dias. As plântulas resultantes foram transplantadas para tubetes contendo substrato composto por uma mistura de solo horizonte B textural e areia (1:1), com a adição ou não de 30% (v/v) do inóculo de FMA *on farm*. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por um período de seis meses, sendo irrigadas diariamente para manter a umidade do substrato em torno de 60% da capacidade de campo. Adicionalmente, aos tratamentos delineados com solução nutritiva, foi aplicada semanalmente solução de Clarck na concentração de 1/2 da força.

2.2. Delineamento Experimental

Para a análise da diversidade microbiana, foram coletadas amostras de solo dos seguintes tratamentos, com três repetições biológicas por tratamento:

Tratamento	Componentes	Descrição
S	Substrato	Representar o potencial funcional inerente do substrato sem manipulações, servindo como base para comparações.
SI	Substrato + inóculo FMA <i>on farm</i>	+ Demonstrar potenciais funções metabólicas ativadas pela presença do inóculo de FMA no substrato, sem influência da planta.
C1	Substrato + planta	Destacar o perfil funcional da comunidade microbiana influenciada pela rizosfera da planta, isoladamente.
T1	Substrato + planta + inóculo FMA <i>on farm</i>	Investigar o impacto combinado da planta e do inóculo na moldagem do potencial funcional da comunidade microbiana.
T2	Substrato + planta + inóculo FMA <i>on farm</i> + fertilização	Analisar como a adição de fertilizantes afeta o potencial funcional microbiano já influenciado pela planta e pelo inóculo.

2.3. Extração de DNA e envio para sequenciamento

Para as análises metagenômicas, coletamos em triplicata por tratamento amostras de solo rizosférico (C1, T1 e T2), solo controle (S - sem planta, sem inóculo e sem fertilização) e solo adicionado de inóculo (SI). A extração de DNA total dessas amostras foi realizada a partir de 500 mg de solo, utilizando o *kit NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel)*, seguindo as instruções

do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v). A quantificação do DNA foi realizada com o kit *Qubit® dsDNA Assay Kit* no *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies, CA, EUA), garantindo a concentração adequada para as etapas posteriores. Após a avaliação da qualidade e quantificação, as amostras de DNA foram enviadas para a *Novogene* (Sacramento, CA, EUA), empresa responsável pela preparação das bibliotecas de sequenciamento e pela execução do sequenciamento de alto rendimento pela plataforma *NovaSeq X Plus Series* (PE150).

2.4. Análise de dados de sequenciamento de *shotgun*

Os dados brutos de sequenciamento metagenômico *shotgun* foram processados utilizando a plataforma KBase (Chivian *et al.*, 2023) e recursos computacionais do servidor Cluster.DTI. Inicialmente, o controle de qualidade dos dados de sequenciamento foi realizado com a aplicação do FastQC (Andrews, 2010), seguindo do pré-processamento das leituras (*reads*) pelo Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014). As leituras foram filtradas de acordo com um limiar de qualidade pré-definido, para a remoção de dados de baixa confiabilidade. Em seguida, sequências artificiais como adaptadores e *primers*, foram identificadas e descartadas e o mesmo foi feito para leituras contaminantes.

Sequencialmente, a montagem de *contigs*, união das *reads* em fragmentos de DNA mais extensos, foi realizada visando uma compreensão mais aprofundada das estruturas e funções genômicas, para investigação de genes e microrganismos presentes nas amostras. Essa montagem foi realizada utilizando o MetaSPAdes (Nurk *et al.*, 2017). Anterior à etapa de *binning*, utilizando o Strobealign, as leituras foram alinhadas aos *contigs* de cada amostra (Sahlín, 2022). No processo de *binning*, agrupamento de *contigs* em *MAGs*, foi empregada uma abordagem que utiliza a combinação de três algoritmos complementares, sendo eles: CONCOCT (Alneberg *et al.*, 2013), MaxBin (Wu *et al.*, 2014) e MetaBAT2 (Kang *et al.*, 2019). Para essa parte do processamento, considerou-se um comprimento mínimo de *contigs* de 1000 pares de bases. O módulo *Metagenome Binning* no KBase (Chivian *et al.*, 2023) também foi utilizado para a reconstrução de genomas microbianos (*MAG - Metagenome-Assembled Genome*), refinando o resultado com o *DAS Tool* (Sieber *et al.*, 2017) e *MetaWRAP* (Uritskiy *et al.*, 2018). A partir dos resultados obtidos por diferentes métodos de *binning*, a etapa de refinamento otimizou a qualidade dos *MAGs* montados, pela seleção dos melhores candidatos

e união de *MAGs* redundantes. Com isso, foi possível maximizar a completude e minimizar a contaminação, de forma que os *MAGs* apresentassem no mínimo 50 % de completude e no máximo 10 % de contaminação. A dereplicação por dRep (Olm *et al.*, 2017) garantiu a eliminação de *MAGs* duplicados. Ao final desse processamento, a qualidade de cada *bin* foi verificada por CheckM (Parks *et al.*, 2015) e CheckM2 (Chklovski *et al.*, 2023).

A classificação taxonômica dos *MAGs* foi atribuída aplicando o GTDB-Tk (Chaumeil *et al.*, 2022), banco de dados *Genome Taxonomy Database* (GTDB) versão r214 (Parks *et al.*, 2022). Para quantificar a abundância relativa de cada *bin* nas diferentes condições experimentais, foi realizado o mapeamento das leituras originais voltando às *MAGs* utilizando o Bowtie2 e CoverM (Aroney *et al.*, 2025). Para o cálculo de abundância relativa, foram considerados apenas os mapeamentos com mais de 95 % de identidade e mais de 80 % de cobertura (CoverM v0.6.1). A classificação taxonômica aplicada às *reads* foi feita pelo aplicativo Kaiju (Menzel *et al.*, 2016), no KBase.

A composição taxonômica de *reads* foi determinada para os microrganismos pertencentes aos domínios Bacteria e Fungi. A classificação taxonômica foi realizada utilizando o algoritmo Kaiju, por meio da plataforma Kbase, com foco na identificação de genes correspondentes à região codificadora do RNA ribossômico da subunidade pequena (SSU rRNA). Não foram utilizadas *contigs* nem *MAGs* (*Metagenome-Assembled Genomes*) para essa etapa. Essa análise priorizou a recuperação direta de sequências de marcadoras de rRNA nas *reads*, sem reconstrução genômica, visando preservar a representatividade da diversidade microbiana presente nas amostras.

A predição funcional foi realizada a partir da tradução das *reads* e dos genomas das *MAGs* reconstruídas em proteoma. As *reads* e *MAGs* foram submetidas à predição do proteoma com o aplicativo DRAMM (Shaffer *et al.*, 2020) no KBase, para obtenção dos dados relacionados a categorias metabólicas de contexto geral como Metabolismo de proteínas, Carboidratos, entre outros. E, especialmente para as *MAGs*, a identificação de genes associados à promoção de crescimento vegetal (PGP – *plant growth promotion*) foi realizada a partir da construção de um perfil de modelo de *Markov* oculto (HMM - *Hidden Markov Model*) e a anotação funcional foi realizada com o HMMER 3 (Potter *et al.*, 2018). Esse perfil inclui genes relevantes como: fixação de nitrogênio (*nifH*, *nifD*, etc.), biossíntese de exopolissacarídeos (*epsD*, *epsE*, etc.), nodulação (*nodA*, *nodB*, etc.), eliminação de espécies reativas de oxigênio (*sod3*, *ssodC*, etc.), aquisição de ferro (*lipA*, *lipB*, etc.), além de genes relacionados a respostas ao estresse salino,

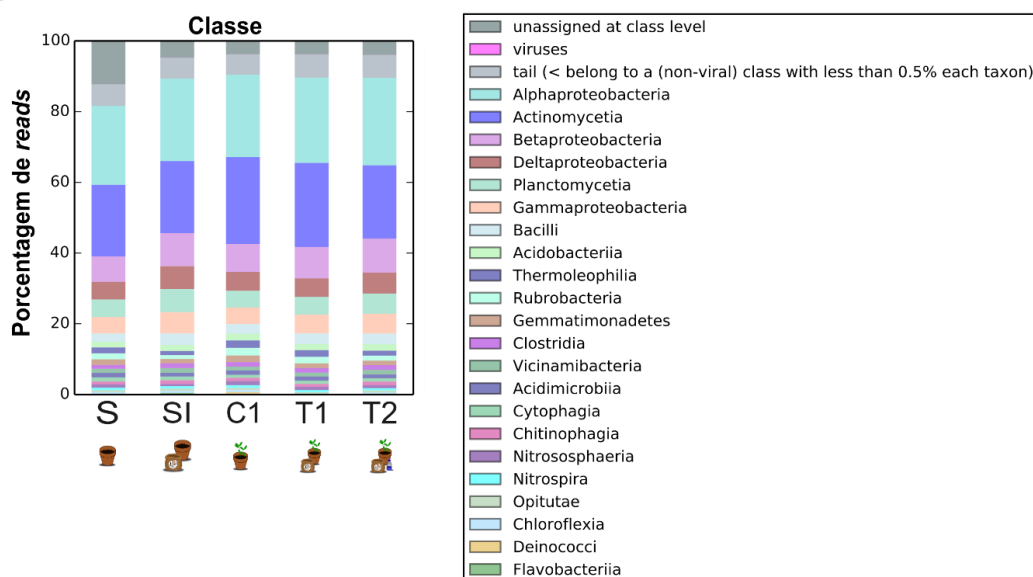
marcadores de embriogênese vegetal, vias associadas a auxinas e genes envolvidos na solubilização de fósforo. As sequências relativas a esses genes foram recuperadas do *Uniprot* (*Uniprot Consortium*, 2024) e foram alinhadas usando o *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994).

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise de Composição Taxonômica de Reads

Da abordagem metagenômica *shotgun*, a composição taxonômica de *reads* foi baseada na recuperação de genes correspondentes à região codificadora do RNA ribossômico (SSU rRNA - *small subunit ribosomal RNA*) (Figura 1).

a) Bacteria



b) Fungi

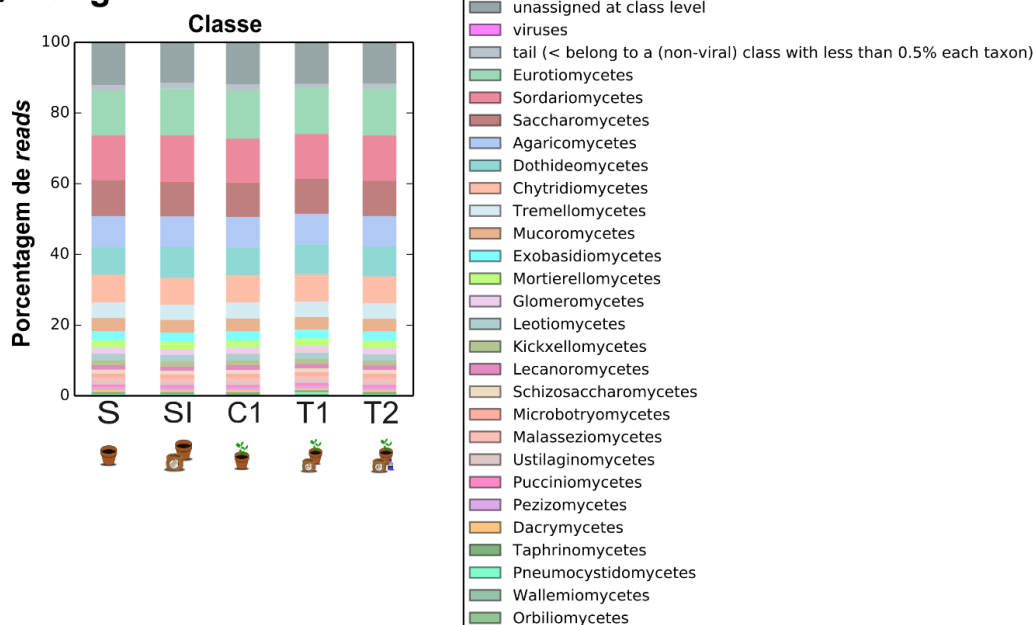


Figura 1: Composição taxonômica em nível de Classe das *reads* nos domínios (a) Bacteria e (b) Fungi do solo, solo inoculado, e solo rizosférico em *C. peltophoroides*. Tratamentos: S - Substrato; SI - substrato + inóculo de FMA *on farm*; C1 - solo + planta (controle); T1 - solo + planta + inóculo de FMA *on farm*; T2 - solo + planta + inóculo de FMA *on farm* + fertilização de Clark.

Para bactérias (Figura 1a) e fungos (Figura 1b), a composição taxonômica a nível de Classe não variou significativamente entre as diferentes condições experimentais. No domínio

bacteriano, o solo adicionado de inóculo (SI) mostrou um leve aumento de Alphaproteobacteria, Actinomycetia, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Plantomycetia e Gammaproteobacteria. No entanto, nos tratamentos com efeito rizosférico (C1, T1 e T2), a porcentagem de *reads* anotadas permaneceu estável para as diferentes classes bacterianas.

No domínio Fungi, a variação foi ainda menor, praticamente inexistente. Dentre os microrganismos mais abundantes destacaram-se: Eurotiomycetes, Sordariomycetes, Saccharomycetes, Agaricomycetes, Dothideomycetes e Chytridiomycetes. Microrganismos da classe Glomeromycetes também foram anotados, mas em menor porcentagem.

3.2. Perfis Funcionais Metagenômicos

No contexto geral, foi analisado o perfil metabólico de cada tratamento, em termos de *reads* (Figura 2). As categorias foram selecionadas com base em sua relevância ecológica e metabólica, incluindo processos-base como aqueles relacionados ao metabolismo de proteínas, carboidratos, e processos-chave como fixação de nitrogênio, metabolismo de carbono e respostas ao estresse.

Abundância média ± erro padrão por tratamento (n = 34135)

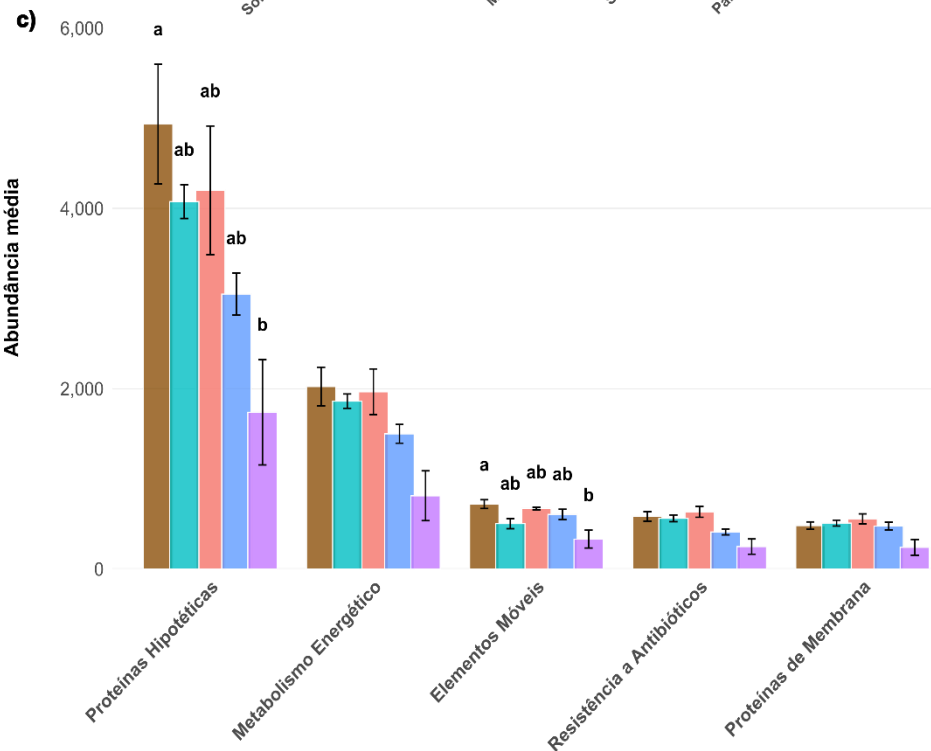
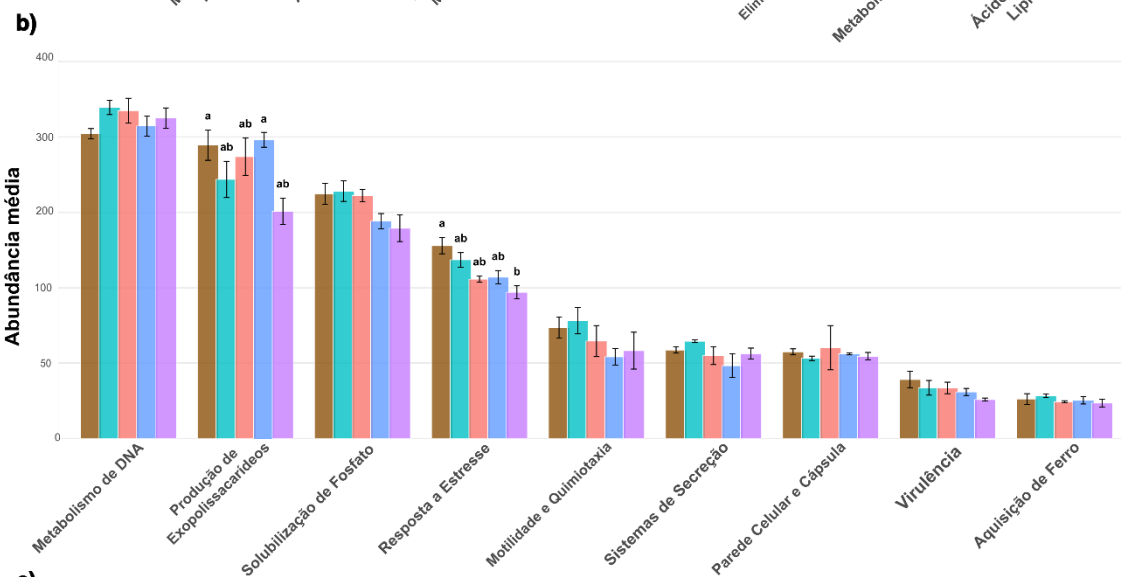
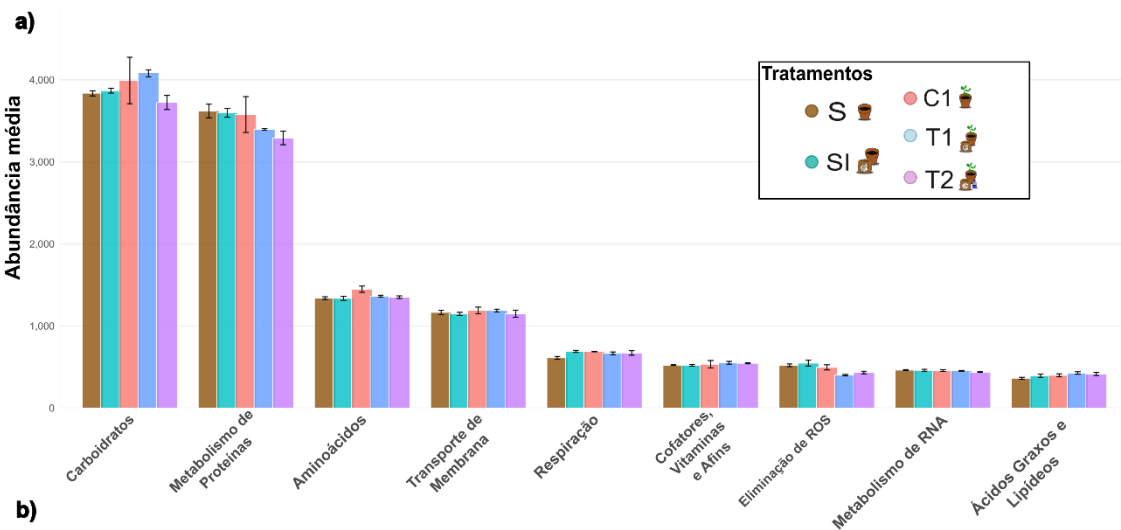


Figura 2: Distribuição das categorias metabólicas por tratamento, com base na contagem de *reads*. Em (a) estão as categorias mais abundantes e em (b) as categorias menos abundantes. Em (c) estão as categorias funcionais refinadas, em que genes anteriormente classificados como "Outros", agora são categorizados de forma mais específica. A plotagem dos dados de (a), (b) exclui a categoria "Outros" para melhor visualização das categorias funcionais. Tratamentos: S - Substrato; SI - substrato + inóculo de FMA *on farm*; C1 - solo + planta (controle); T1 - solo + planta + inóculo de FMA *on farm*; T2 - solo + planta + inóculo de FMA *on farm* + fertilização de *Clark*. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativa ($p < 0.05$).

O gráfico de barras agrupadas (Figura 2), apresenta o perfil funcional das *reads* com rarefação de dados, partindo de 34135 sequências para as análises de abundância. As categorias metabólicas de maior abundância (Figura 2a) são representadas principalmente por Carboidratos e Metabolismo de proteínas, seguido de Aminoácidos e Transporte de Membrana. O gráfico no quadro (b) ilustra as categorias de abundância média, também de relevância ecológica nas funções metabólicas. Dentre elas, a Produção de Exopolissacarídeos e Resposta a Estresse apresentaram diferenças significativas, com alta abundância média para o tratamento T2. Em (c), a categoria "Outros" foi investigada e nela foram encontradas principalmente Proteínas Hipotéticas, Metabolismo Energético e Elementos móveis, com alta abundância em *reads* de T2.

A análise de metagenômica *shotgun* permitiu reconstruir *MAGs* metagenômicos e identificar o potencial funcional das comunidades microbianas nos diferentes tratamentos (Figura 3). Os resultados estão apresentados em um *heatmap* de presença e ausência, indicando a distribuição de categorias funcionais relacionadas à defesa e à PGP entre os *MAGs* de cada condição.

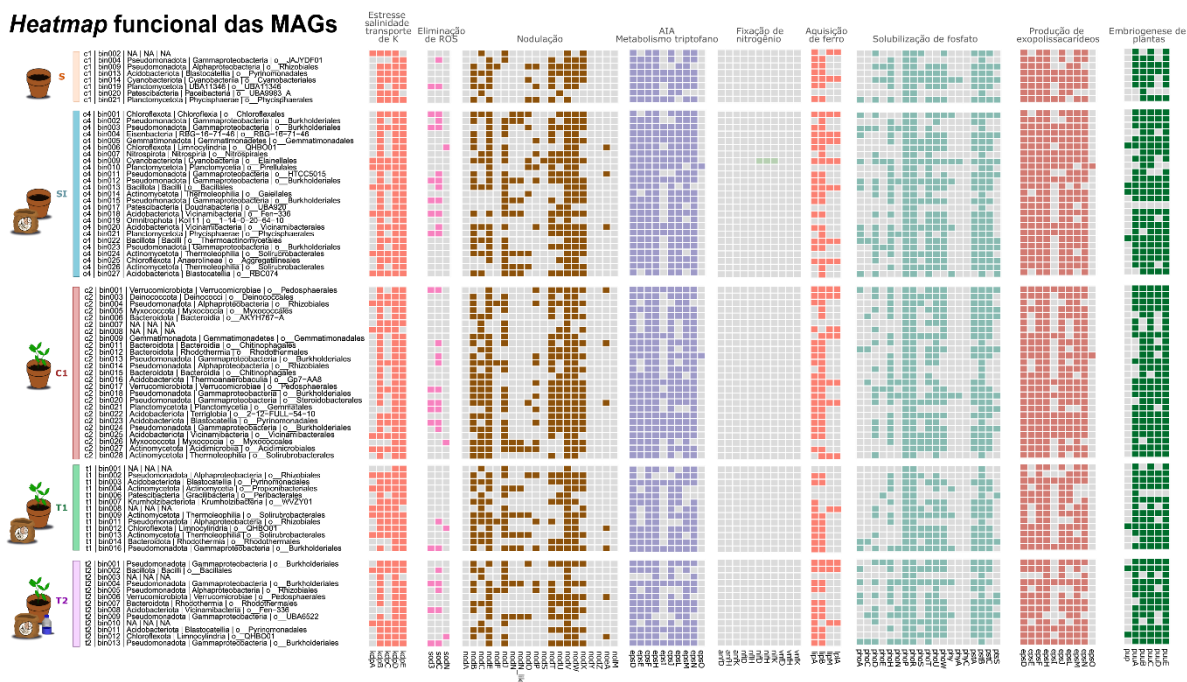


Figura 3: Perfil da predição funcional potencial em comunidades microbianas do solo rizosférico de *C. peltophoroides* sob diferentes tratamentos. O heatmap representa a presença ou ausência dos genes para as funções genéticas relacionadas à defesa e à promoção do crescimento de plantas. Tratamentos: S - Substrato; SI - substrato + inóculo de FMA *on farm*; C1 - solo + planta (controle); T1 - solo + planta + inóculo de FMA *on farm*; T2 - solo + planta + inóculo de FMA *on farm* + fertilização de Clark.

Apesar do perfil funcional visualmente padronizado, notou-se que as funções variaram em relação ao número de MAGs reconstruídos. As categorias funcionais estudadas incluíram os genes relacionados a: estresse por salinidade e transporte de potássio, eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*), nodulação, metabolismo de triptofano relacionado à ácido indol-3-acético (IAA - *indole-3-acetic acid*), fixação de nitrogênio, aquisição de ferro, produção de exopolissacarídeos e embriogênese de plantas.

Dentre os tratamentos sem a presença de planta, o Substrato (S) mostrou-se pouco redundante pelo baixo número de MAGs reconstruídas desempenhando uma mesma função categórica. Ou seja, uma comunidade de MAGs menos diversificada e com menor sobreposição funcional. Já no solo adicionado de inóculo (SI), observou-se maior número de MAGs para desempenharem uma mesma função, sendo o único tratamento em que os MAGs reconstruídos obtinham genes putativos relacionados à fixação de nitrogênio.

Em C1, a presença da planta associada ao substrato de cultivo sem a presença do inóculo, gerou um aumento do número de *MAGs* desempenhando mesma função categórica. Por outro lado, nos tratamentos inoculados (T1 e T2), notou-se uma maior densidade da presença de genes relacionados à nodulação e ao estresse por salinidade e transporte de potássio. Os genes relacionados à fixação de nitrogênio não foram relatados na reconstrução das *MAGs* dos tratamentos com planta.

Esses padrões de números de *MAGs* e de funções relacionadas à PGP que foram observados, sugerem uma transição intrigante, de um perfil de uma redundância funcional nos sistemas controle (S) e (C1), para uma maior especialização e eficiência funcional da comunidade microbiana rizosférica dos tratamentos inoculados (T1 e T2).

3.3. Análise de Composição Taxonômica de *MAGs*

A análise da composição taxonômica dos *MAGs* revelou perfis microbianos distintos em cada tratamento, fornecendo insights sobre a identidade e a abundância relativa dos microrganismos que compõem as comunidades funcionais do solo rizosférico (Figura 4).

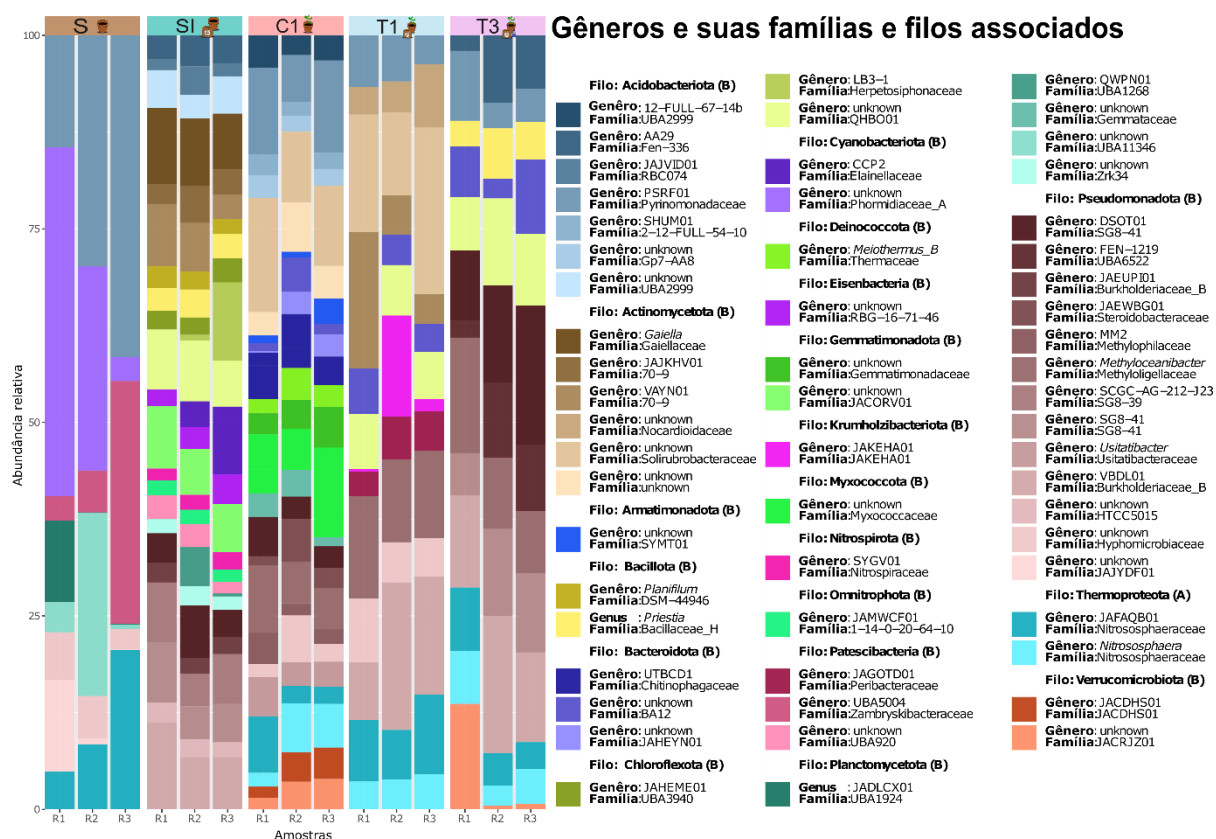


Figura 4: Composição taxonômica em nível de gênero, família e filo dos *MAGs* metagenômicos reconstruídos nas comunidades microbianas do solo, solo inoculado, e solo rizosférico em *C. peltophoroides*. Tratamentos: S - Substrato; SI - substrato + inóculo de FMA *on farm*; C1 - solo + planta (controle); T1 - solo + planta + inóculo de FMA *on farm*; T2 - solo + planta + inóculo de FMA *on farm* + fertilização de *Clark*.

O solo (S) foi caracterizado pela predominância do filo Acidobacteriota, com destaque para a família Pyrimonodaceae, além de Cyanobacteriota (Família Phormidiaceae) e Patescibacteria. Portanto, esses grupos representam a comunidade microbian, em termos de *MAGs*, do Substrato utilizado no experimento.

A adição do inóculo de FMA *on farm* ao solo (SI) resultou em um aumento notável da diversidade microbiana dos genomas possíveis de serem reconstruídos. Houve um incremento significativo de bactérias do filo Actinomycetota, incluindo as famílias Gaiellaceae e Nocardiodaceae. Além desses grupos, notou-se o surgimento de *MAGs* pertencentes aos filios Bacillota, Chloroflexota, Eisenbacteria e Nitrospirota, indicando o estabelecimento de um consórcio microbiano diversificado pelo inóculo.

Na presença da planta, o solo rizosférico sem inóculo (C1) apresentou uma maior diversidade de *MAGs* reconstruídos, com alta abundância relativa de Solirubrobacteraceae e gêneros desconhecidos do filo Actinomycetota, bem como o aparecimento de *MAGs* de gêneros desconhecidos dos filios Gemmatimonadota e Myxococcota, evidenciando o efeito seletivo da rizosfera exercido pela planta.

Nos tratamentos que combinaram planta e inóculo, a estrutura da comunidade de *MAGs* continuou a ser moldada pela interação da planta com o inóculo e, no tratamento T2, pela fertilização. Em T1 (solo + planta + inóculo), o aumento de *MAGs* do filo Actinomycetota foi notável, principalmente das famílias Nocardiodaceae e Solirubrobacteraceae. Além disso, observou-se o surgimento dos filios Krumholzibacteriota e do gênero *Peribacteraceae*, evidenciando a formação de uma comunidade rizosférica distinta sob a influência combinada de *C. peltophoroides*.

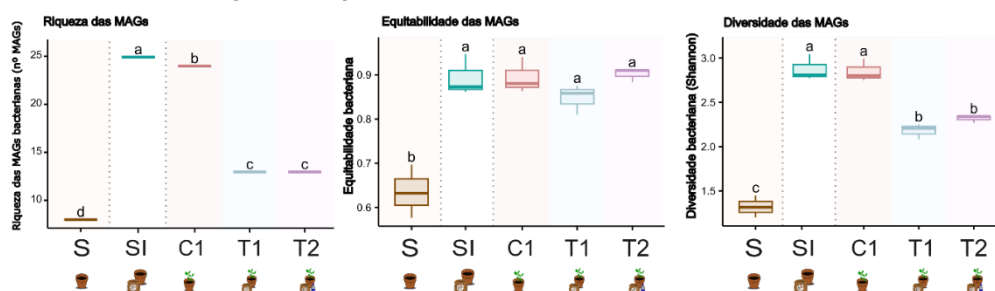
Para o tratamento T2 (solo + planta + inóculo FMA *on farm* + fertilização), o perfil taxonômico manteve-se semelhante a T1 em alguns aspectos, mas com alterações específicas.

Destacou-se o surgimento do gênero *Priestia* (Família Bacillaceae, Filo Bacillota) e a presença de *MAGs* dos filos Pseudomonadota e Verrucomicrobiota. Além destes, notou-se uma elevação de Bacteroidota e Chloroflexota quando comparado a T1.

3.4. Métricas de Diversidade Baseadas em *MAGs* (*Metagenome-Assembled Genomes*)

Das análises baseadas em *MAGs*, as métricas de diversidade alfa e beta demonstraram diferentes padrões entre os tratamentos (Figura 5).

a) Métricas de riqueza, equitabilidade e diversidade das *MAGs*



b) Beta diversidade baseada nas *MAGs*

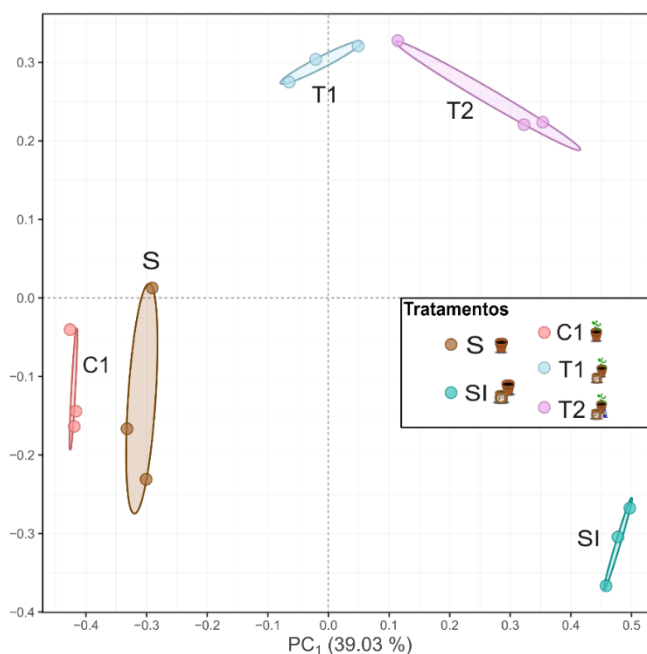


Figura 5: Análises de diversidade das *MAGs* (*Metagenome-Assembled Genomes*). (a) Métricas de diversidade alfa: índices de riqueza, equitabilidade e diversidade para os diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

(b) Análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na diversidade beta das *MAGs*, em que PC1 explica 39,03% da variação total. Tratamentos: S - Substrato; SI - substrato + inóculo de FMA *on farm*; C1 - solo + planta (controle); T1 - solo + planta + inóculo de FMA *on farm*; T2 - solo + planta + inóculo de FMA *on farm* + fertilização de Clark.

Os dados de diversidade alfa indicam que os tratamentos SI (substrato + inóculo) e C1 (solo + planta) apresentaram os maiores valores de riqueza (25 *MAGs*), com uma microbiota mais diversa. Os tratamentos T1 e T2, que combinam planta e inóculo, adicionado de fertilização (em T2), apresentaram riqueza intermediária (12–14 *MAGs*), enquanto o tratamento S (Substrato) apresentou a menor riqueza. A equitabilidade foi maior nos tratamentos com planta (C1, T1, T2) e no solo adicionado de inóculo de FMA *on farm* (SI), sendo significativamente menor em S. O índice de Shannon seguiu padrão semelhante ao da riqueza, com SI e C1 apresentando os maiores valores e S o menor valor.

Na análise de diversidade beta (PCoA), observou-se uma clara separação entre os tratamentos ao longo do eixo PC1 (39,03% da variação). Três agrupamentos foram identificados: (i) S e C1, (ii) SI, e (iii) T1 e T2. Tratamentos com e sem inoculação de FMA *on farm* se posicionaram em lados opostos do gráfico, indicando um efeito relevante do inóculo na composição da comunidade microbiana.

Discussão

Das análises taxonômicas baseadas em *reads*, a comunidade bacteriana e fúngica mostrou-se estável entre os diferentes tratamentos. Embora a abordagem de *shotgun* possibilite a recuperação de genes SSU rRNA dos dados brutos, esses genes tendem a ser poucos abundantes nesses dados e, portanto, podem fornecer uma resolução limitada da taxonomia presente na amostra (Quince *et al.*, 2017). Em Bacteria, o inóculo de FMA *on farm* contribuiu com um leve incremento na abundância relativa de grupos microbianos versáteis em termos metabólicos, que desempenham funções na ciclagem de nutrientes e decomposição de matéria orgânica (Ma *et al.*, 2025; Masuda *et al.*, 2024;). Na comunidade fúngica, a variação foi ainda menor, sendo as classes mais abundantes pertencentes a *Eurotiomycetes*, *Sordariomycetes*, *Saccharomycetes*, *Agaricomycetes*, *Dothideomycetes* e *Chytridiomycetes*. Ainda que em menor proporção, a

presença de *Glomeromycetes* é relevante por representar potencialmente a presença dos FMA (Da Silva *et al.*, 2024), corroborando com a colonização micorrízica que foi observada no Capítulo 1 desse trabalho. Os grupos fúngicos abundantes citados apresentam alta distribuição ecológica e diversidade funcional, a exemplo de *Sordariomycetes* e *Eurotiomycetes* em solos florestais e agrícolas (Chen *et al.*, 2023).

As categorias funcionais mais abundantes associadas às *reads*, como o Metabolismo de Carboidratos, Proteínas, Aminoácidos, Respiração, entre outras, evidenciam a predominância de vias metabólicas fundamentais para a manutenção da atividade microbiana do solo, relacionadas à obtenção de energia (Salam *et al.*, 2019). Essas categorias aumentadas refletem a rizosfera como um ambiente rico em açúcares e aminoácidos, que podem ser utilizados pelos microrganismos (Wani *et al.*, 2024). Os Elementos Móveis presentes em alta abundância média, inclusive nos tratamentos inoculados, pode evidenciar uma maior plasticidade genômica e adaptabilidade da comunidade microbiana rizosférica, dado que esses elementos são frequentemente associados a genes de mecanismos de defesa, resposta ao estresse oxidativo e resistência a metais (Rodrigues *et al.*, 2023). Além disso, esses elementos podem facilitar a transferência horizontal de genes relacionados à promoção de crescimento vegetal, bem como auxiliar na regulação das interações planta-microrganismo (Cotta *et al.*, 2024; Huang *et al.*, 2022; Ku *et al.*, 2021).

Em relação aos *MAGs* reconstruídos, os perfis funcionais foram semelhantes entre as condições experimentais. No entanto, essa abordagem revelou que as funções se concentraram em um menor número de *MAGs*, levando a uma interpretação de um padrão de especificidade funcional. Ou seja, ao invés de inúmeros microrganismos desempenharem as mesmas funções (redundância funcional), notou-se que as funções-chave ficaram restritas a poucos táxons específicos. Esse resultado evidencia uma especialização funcional dentro da comunidade microbiana no tratamento inoculado, o que pode refletir uma adaptação mais refinada às condições ambientais ou uma seleção funcional direcionada pelo inóculo de FMA *on farm*.

A obtenção de um menor número de *MAGs* metagenômicos desempenhando a mesma função nos tratamentos inoculados, na presença de planta (T1 e T2), ressalta uma perspectiva diferenciada da funcionalidade da rizosfera. Ainda que o esperado fosse evidências de redundância funcional, os dados obtidos sugerem uma especialização funcional e maior eficiência da comunidade microbiana nos aspectos de PGP.

Esse tipo de padrão também foi observado nos estudos de Meneghine *et al.*, (2016), que identificou, por meio de análise metagenômica de solos com adubação orgânica, que determinadas funções metabólicas estavam associadas a grupos microbianos específicos, sugerindo baixa redundância e alta especificidade funcional. O trabalho publicado por Goulart *et al.* (2013), sobre metagenômica aplicada à biotecnologia, destaca que a identificação de genes com potencial biotecnológico, frequentemente depende de poucos microrganismos especializados, reforçando a ideia de que a funcionalidade pode estar concentrada em táxons específicos, ainda que em comunidades microbianas diversas (Suman *et al.*, 2022).

O espaço rizosférico é um ambiente altamente complexo e seletivo, que se molda pelos exsudatos radiculares da planta e pelas interações com microrganismos simbiotes. Nesse espaço, os exsudatos atuam como sinalizadores e fontes de carbono, com potencial para atrair uma comunidade microbiana específica (Philippot *et al.*, 2013; Badri *et al.*, 2009). Na presença de *C. peltophoroides*, a inoculação com FMA *on farm* pode ter exercido uma pressão seletiva, favorecendo o estabelecimento de microrganismos altamente especializados e eficientes em funções destaque para a sobrevivência e o crescimento vegetal. O funcionamento da comunidade microbiana se reflete em mecanismos mais eficientes de ciclagem de nutrientes, na redução da competição por recursos, que possibilita o direcionamento metabólico para vias que beneficiam diretamente o crescimento vegetal e no fortalecimento de interações sinérgicas. Esses aspectos, no contexto da inoculação com FMA *on farm*, podem favorecer uma rizosfera mais resiliente, adaptada ao contexto planta-solo. Em pesquisa realizada por Czerniak *et al.* (2014), foi observado que a aplicação de inoculantes micorrízicos produzidos com resíduos da indústria florestal favoreceu a colonização radicular e a proliferação de propágulos no solo, evidenciando o potencial da inoculação como pressão seletiva sobre comunidades microbianas eficientes e especializadas.

Os inóculos de FMA, além de formar a simbiose com a planta, também tem potencial de interagir com outras bactérias e fungos no solo, causando o efeito de micorrizosfera (Wei *et al.*, 2025). Esse efeito causa a liberação de compostos bioativos que estimulam microrganismos benéficos, favorecendo a co-seleção de uma comunidade microbiana especializada e funcional (Barwant *et al.*, 2025). Trabalhos como os de Moreira *et al.* (2014) e Martins *et al.* (2017) corroboram que a inoculação com FMA pode elevar a colonização radicular e modular positivamente a microbiota rizosférica, reforçando a eficiência do sistema planta-solo-microrganismo.

O perfil do solo “basal” de cultivo (S), dominado por Acidobacteriota (como Pyrimonodaceae), Cyanobacteriota (Phormidiaceae) e Patescibacteria, representa a composição de *MAGs* inerente ao solo. Esses filos são frequentemente encontrados em solos oligotróficos e são conhecidos por sua adaptação a essas condições e por papéis na ciclagem biogeoquímica (Bald *et al.*, 2021; Kalam *et al.*, 2020; Herrmann *et al.*, 2019). A presença desses grupos estabelece um ponto de partida para avaliar as alterações influenciadas pelo FMA *on farm*.

A princípio, a adição do inóculo de FMA *on farm* (SI) ao Substrato resultou em um significativo aumento na diversidade taxonômica de *MAGs*. O surgimento de filos como Actinomycetota, Bacillota, Chloroflexota, Eisenbacteria e Nitrospirota após a aplicação do inóculo sugere sua capacidade de enriquecer a comunidade microbiana do solo, seja por adição de novos táxons ou por estímulo ao estabelecimento de grupos funcionais. Os filos citados anteriormente, abrigam espécies conhecidamente potenciais para a ciclagem de nutrientes, produção de metabólitos bioativos e interações benéficas com plantas e outros microrganismos (Gu *et al.*, 2025; Freches *et al.*, 2024; Gorpenchenko *et al.*, 2024; Hourigan *et al.*, 2024; Paes da Costa *et al.*, 2024).

A presença de *C. peltophoroides* no solo (C1) exerceu um efeito seletivo distinto sobre a microbiota, dado o aumento da diversidade de *MAGs* e a alta abundância relativa de Solirubrobacteraceae e gêneros desconhecidos de Actinomycetota. Esse padrão é consistente com o papel da rizosfera enquanto ambiente altamente seletivo, moldado pelos exsudatos radiculares, que atuam como fontes de carbono e sinalizadores químicos para microrganismos adaptados a metabolizá-los (Botelho *et al.*, 2023; Vieira Júnior *et al.*, 2013). A emergência de filos como Gemmatimonadota e Myxococcota nesse contexto reforça a influência da planta na estruturação da comunidade microbiana, uma vez que esses grupos são frequentemente associados a solos com maior atividade biológica e presença de compostos orgânicos complexos (Ling *et al.*, 2022; Garbeva *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2023).

Nos tratamentos que combinaram a planta e o inóculo, a comunidade microbiana continuou a ser moldada por essa interação complexa, mas apresentou menor diversidade de *MAGs* reconstruídos, o que sugere uma comunidade mais específica e funcional. Em solo + planta + inóculo (T1), notou-se o aumento de *MAGs* de Actinomycetota (Nocardiodiaceae e Solirubrobacteraceae), associados à degradação de compostos orgânicos complexos e à promoção da atividade microbiana do solo (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018). Além destes, o surgimento de grupos microbianos menos frequentes como Krumholzibacteriota e

Peribacteraceae, indicam uma comunidade rizosférica específica e diferenciada. Enquanto Krumholzbacteriota vem sendo associado à degradação de compostos aromáticos em ambientes oligotróficos e ricos em matéria orgânica recalcitrante (Campbell *et al.*, 2024), a família Peribacteraceae representa microrganismos com genomas reduzidos e metabolismo simbiótico, que podem contribuir para interações sinérgicas entre plantas e microrganismos (Boubekri *et al.*, 2022; Brown *et al.*, 2015).

Por fim, o tratamento inoculado T2, embora tenha apresentado uma comunidade similar a T1, apresentou leves alterações taxonômicas, influenciadas pela fertilização. A presença de microrganismos pertencentes a *Priestia* (Bacillota), Pseudomonadota e Verrucomicrobiota, bem como o aumento de Bacteroidota e Chloroflexota em comparação a T1, sugerem que a adição de nutrientes via fertilização direcionou o estabelecimento desses grupos microbianos adaptados a ambientes mais ricos em recursos. *Priestia*, gênero anteriormente classificado como *Bacillus*, são capazes de atuar na promoção do crescimento vegetal, são formadores de endósporos, e são mais tolerantes a variações ambientais como estresse por metais pesados (Zelaya-Molina *et al.*, 2023). Já os filos Pseudomonadota e Bacillota, por exemplo, representam grupos de microrganismos promotores de crescimento vegetal capazes de se adaptar a diferentes condições nutricionais (Ujvári *et al.*, 2024; Zhou *et al.*, 2020). Essa modulação pela fertilização pode ter refinado ainda mais a composição da comunidade microbiana, favorecendo táxons com maior plasticidade metabólica e capacidade de otimizar o aproveitamento dos nutrientes disponíveis.

A riqueza microbiana elevada nos tratamentos SI e C1 indica que tanto o inóculo quanto a presença da planta são capazes de promover o recrutamento de uma microbiota mais diferenciada. Em contrapartida, os valores intermediários observados em T1 e T2 podem refletir uma filtragem mais seletiva, favorecendo táxons funcionalmente adaptados à simbiose planta-FMA (Ling *et al.*, 2022). A maior equitabilidade nesses mesmos tratamentos sugere uma comunidade mais equilibrada, enquanto a menor diversidade em S reforça a limitação do Substrato em sustentar uma microbiota complexa.

A separação observada na PCoA entre os tratamentos com e sem inóculo indica, mais uma vez, o papel determinante do FMA *on farm* na estruturação microbiana. Isso reforça a hipótese de que a interação planta-inóculo atua como direcionadora da montagem da comunidade, promovendo interações mais eficientes e específicas (Ujvári *et al.*, 2024; Ulbrich *et al.*, 2022).

Nesse estudo, a reconstrução de *MAGs* não foi capaz de triar genes da categoria de fixação de nitrogênio. Vale ressaltar que isso pode ter ocorrido por diversos fatores, dentre eles: (a) os genes dessa funcionalidade costumam estar em *operons* poucos abundantes e em regiões do genoma que são de difícil montagem, portanto, essas regiões podem não ser anotadas em *MAGs* de alta qualidade e ficarem abaixo do limiar de comprimento para serem detectados na anotação funcional (Parks *et al.*, 2017); (b) os métodos de *binning* são baseados em composição de *k-mers* e cobertura, e genomas de dízimas raras, como são os de fixadores de nitrogênio, podem ser considerados como contaminantes ou *contigs* soltos, sendo descartados (Almeida *et al.*, 2021); (c) as bases de dados contêm genes pseudo-*nif* e homologias fracas, e por isso, escapam do *pipeline* de anotação, levando a uma subestimação dessa categoria funcional (Mise *et al.*, 2021); (d) no FMA *on farm*, a fixação de nitrogênio pode ser realizada por microrganismos de linhagens pouco caracterizadas, com genes *nif* que diferem da referência e não são reconhecidos pelo padrão de perfil de HMM (Daims *et al.*, 2015).

No geral, as mudanças observadas na composição taxonômica dos *MAGs* metagenômicos demonstram a forte influência do inóculo de FMA *on farm*, de *C. peltophoroides* e da fertilização na estruturação funcional das comunidades microbianas do solo rizosférico. Cada tratamento apresentou um perfil taxonômico distinto com base nos *MAGs* reconstruídos, refletindo a adaptação e a resposta dos microrganismos às condições ambientais e às interações estabelecidas.

Os dados de metagenômica *shotgun* apresentados neste capítulo complementam significativamente as análises taxonômicas no Capítulo 3. Enquanto o sequenciamento de *amplicon* permitiu identificar quais táxons estavam presentes e suas abundâncias relativas, a metagenômica *shotgun* contribuiu com os dados de potencial funcional das comunidades microbianas do Substrato (S), solo adicionado de inóculo de FMA *on farm* (SI), e dos solos rizosféricos (C1, T1 e T2), além da reconstrução de *MAGs*. A identificação de genes relacionados à promoção de crescimento vegetal e proteção contra estresses abióticos, assim como sua triagem nos *MAGs* no delineamento experimental proposto fornece *insights* de como os táxons podem estar contribuindo diretamente para a disponibilidade de nutrientes na r

izosfera, bem como para o maior crescimento das mudas florestais de *C. peltophoroides*.

4. Conclusões

A composição taxonômica baseada nas *reads* não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, porém, o potencial funcional da comunidade rizosférica inoculada com FMA *on farm* apresentou implicações relevantes. No contexto geral, as categorias funcionais mais abundantes foram relacionadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas e aminoácidos, sendo que no tratamento inoculado (T2), houve maior abundância de genes da produção de exopolissacarídeos e resposta ao estresse, em termos de *reads*.

No contexto de *MAGs*, a comunidade rizosférica inoculada apresentou menor redundância, e, portanto, maior especialização funcional, em que um menor número de *MAGs* concentrou funções-chave de promoção de crescimento vegetal. A composição taxonômica revelou comunidades distintas, em que a inoculação com FMA *on farm* apresentou *MAGs* de *Priestia*, *Pseudomonadota*, *Verrucomicrobiota* e *Peribacteraceae*, grupos que desempenham mecanismos associados à PGP e à tolerância a estresses. A rizosfera inoculada apresentou menor riqueza de *MAGs*, mas maior equitabilidade e especialização funcional. Ou seja, a comunidade microbiana foi filtrada pela planta e pelo inóculo, gerando uma microbiota mais eficiente e adaptada à rizosfera.

A aplicação da metagenômica *shotgun* foi crucial para preencher parte das lacunas funcionais, permitindo compreender as capacidades biogeoquímicas e promotoras de crescimento do inóculo de FMA *on farm*. Os dados revelaram a complexidade funcional das interações entre a planta, o inóculo de FMA *on farm* e o solo, elucidando os potenciais mecanismos moleculares que sustentam os benefícios observados no desenvolvimento de *C. peltophoroides*, bem como a constituição de *MAGs* para cada tratamento avaliado. Com essas informações funcionais, foi possível contribuir mais *insights* dos modos de atuação do inóculo de FMA *on farm*, validando-o enquanto bioinoculante, e provando mais uma vez o impacto positivo de sua aplicação na produção de mudas de *C. peltophoroides* com melhor desenvolvimento e maior potencial de sobrevivência em áreas impactadas.

5. Referências bibliográficas

ALBERTSEN, M. *et al.* Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 533-538, 2013.

ALMEIDA, A. *et al.* A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. **Nature Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 105-114, 2021.

BADRI, D. V. *et al.* Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 6, p. 666-681, 2009.

BAGYARAJ, J. D. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). In: **A Handbook of Tropical Soil Biology**. Routledge, 2012. p. 131-147.

BALD, D. R. *et al.* Microbiota do solo: A diversidade invisível e a sua importância. **Bio Diverso**, v. 1, n. 1, 2021.

BARWANT, M. M. *et al.* Role of Mycorrhizal Association in Leguminous Plant Growth. In: **Recent Trends and Applications of Leguminous Microgreens as Functional Foods**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2025. p. 277-295.

BASU, A. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. **Sustainability**, v. 13, n. 3, p. 1140, 2021.

BATEMAN, A. *et al.* UniProt: the universal protein knowledgebase in 2025. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. D 1, p. D609-D617, 2024.

BERENDSEN, R. L. *et al.* The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.

BOLGER, A. *et al.* Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BOTELHO, G. R. *et al.* Rizobactérias: uma visão geral da importância para plantas e agrossistemas. **Ambientes em Movimento**, v. 3, n. 1, p. 22 a 46-22 a 46, 2023.

BOUBEKRI, K. *et al.* Multifunctional role of Actinobacteria in agricultural production sustainability: A review. **Microbiological Research**, v. 261, p. 127059, 2022.

BROWN, C. T. *et al.* Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. **Nature**, v. 523, n. 7559, p. 208-211, 2015.

CAMPBELL, B. C. *et al.* Krumholzbacteriota and Deltaproteobacteria contain rare genetic potential to liberate carbon from monoaromatic compounds in subsurface coal seams. **Mbio**, v. 15, n. 3, p. e01735-23, 2024.

CHAUMEIL, P. *et al.* GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. 2020.

CHEN, Y. P. *et al.* Phylogenomics and diversification of Sordariomycetes. **Mycosphere (Online)**, v. 14, n. 1, 2023.

CHIVIAN, D. *et al.* Metagenome-assembled genome extraction and analysis from microbiomes using KBase. **Nature Protocols**, v. 18, n. 1, p. 208-238, 2023.

CHKLOVSKI, Al. *et al.* CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. **Nature Methods**, v. 20, n. 8, p. 1203-1212, 2023.

COTTA, S. R. *et al.* Role of horizontal gene transfer and cooperation in rhizosphere microbiome assembly. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-12, 2024.

CZERNIAK, M. J. *et al.* Produção de inoculante micorrízico *on farm* utilizando resíduos da indústria florestal. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 1712-1721, 2014.

DA SILVA, G. A. *et al.* Four New Families of Arbuscular Mycorrhizal Fungi within the Order Glomerales. **Taxonomy**, v. 4, n. 4, p. 761-779, 2024.

DAIMS, H. *et al.* Complete nitrification by *Nitrospira bacteria*. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 504-509, 2015.

DELGADO-BAQUERIZO, M. *et al.* A global atlas of the dominant bacteria found in soil. **Science**, v. 359, n. 6373, p. 320-325, 2018.

FRECHES, A. *et al.* The biotechnological potential of the Chloroflexota phylum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 90, n. 6, p. e01756-23, 2024.

GARBEVA, P. *et al.* Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. **Plant and Soil**, v. 302, p. 19-32, 2008.

GORPENCHENKO, T. Y. *et al.* Changes in the composition and properties of cultured bacterial strains of ginseng rhizosphere according to soil characteristics in the forest and plots. **Agronomy**, v. 14, n. 12, p. 3019, 2024.

GOULART, K. C. S. *et al.* METAGENÔMICA APLICADA À BIOTECNOLOGIA. **Ciência & Tecnologia**, v. 5, n. 1, 2013.

GU, G. *et al.* Continuous cropping of Patchouli alters soil physiochemical properties and rhizosphere microecology revealed by metagenomic sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1482904, 2025.

HERRMANN, M. *et al.* Predominance of Cand. Patescibacteria in groundwater is caused by their preferential mobilization from soils and flourishing under oligotrophic conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1407, 2019.

HOURIGAN, D. *et al.* Discovery and synthesis of leaderless bacteriocins from the Actinomycetota. **Journal of Bacteriology**, v. 206, n. 11, p. e00298-24, 2024.

HUANG, R. *et al.* Habitat determines the relationships among bacteria, resistance genes and mobile genetic elements in the soil–plant system. **European Journal of Soil Science**, v. 73, n. 1, p. e13132, 2022.

KALAM, S. *et al.* Recent understanding of soil acidobacteria and their ecological significance: a critical review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 580024, 2020.

KANG, D. D. *et al.* MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. **PeerJ**, v. 7, p. e7359, 2019.

KU, Y. S. *et al.* Rhizospheric communication through mobile genetic element transfers for the regulation of microbe–plant interactions. **Biology**, v. 10, n. 6, p. 477, 2021.

LEVY, A. *et al.* Elucidating bacterial gene functions in the plant microbiome. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 4, p. 475-485, 2018.

LING, N. *et al.* Rhizosphere bacteriome structure and functions. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 836, 2022.

MA, L. *et al.* Long-term fertilization legacy effects and temperatures regulate soil microbial function of crop straw decomposition in a greenhouse vegetable field. **Applied Soil Ecology**, v. 210, p. 106056, 2025.

MANFREDINI, A. *et al.* Current methods, common practices, and perspectives in tracking and monitoring bioinoculants in soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 698491, 2021.

MARTINS, A. P. B. *et al.* Inoculação de Microrganismos Eficientes (EM) e Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) em alface: um trabalho de campo conduzido na horta comunitária (HC) Vapabuçu, município de Sete Lagoas-MG. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, 2018.

MASUDA, Y. *et al.* Global soil metagenomics reveals distribution and predominance of Deltaproteobacteria in nitrogen-fixing microbiome. **Microbiome**, v. 12, n. 1, p. 95, 2024.

MENEZHINE, A. K. *et al.* Análise metagenômica e potencial biotecnológico de microrganismos de solo e água de uma área agrícola com adubação orgânica. 2016.

MENZEL, P. *et al.* Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11257, 2016.

MISE, K. *et al.* Undervalued pseudo-nifH sequences in public databases distort metagenomic insights into biological nitrogen fixers. **Mosphere**, v. 6, n. 6, p. e00785-21, 2021.

NURK, S. *et al.* metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 824-834, 2017.

OLM, M. R. *et al.* dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. **The ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2864-2868, 2017.

PAES DA COSTA, D. *et al.* Soil fertility impact on recruitment and diversity of the soil microbiome in sub-humid tropical pastures in northeastern Brazil. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 3919, 2024.

PARKS, D. H. *et al.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043-1055, 2015.

PARKS, D. H. *et al.* Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 1533-1542, 2017.

PHILIPPOT, L. *et al.* Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789-799, 2013.

POTTER, S. C. *et al.* HMMER web server: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W200-W204, 2018.

PRATES JÚNIOR, P. (Coord). Micorrizas arbusculares: conceitos, metodologias e aplicações. 1. ed. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Núcleo Regional Leste, Minas Gerais, 2021.

PRATES JÚNIOR, P. *et al.* Extensão em Microbiologia: mudas inoculadas com microrganismos benéficos na bacia do rio Doce. **Revista Ciência em Extensão**, v. 16, p. 332-343, 2020.

QUINCE, C. *et al.* Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833-844, 2017.

QUINCE, C. *et al.* Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833-844, 2017.

SADHANA, B. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) as a biofertilizer-a review. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 3, n. 4, p. 384-400, 2014.

SALAM, L. B. *et al.* Structural and functional metagenomic analyses of a tropical agricultural soil. **Spanish Journal of Soil Science**, v. 9, n. 1, 2019.

SHAFFER, M. *et al.* DRAM for distilling microbial metabolism to automate the curation of microbiome function. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 16, p. 8883-8900, 2020.

SIEBER, C. Dereplication, aggregation and scoring tool (DAS tool) v1. 0. Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL), Berkeley, CA (United States), 2017.

SIMON, A. *et al.* FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. **Version 0.10**, v. 1, 2010.

SUMAN, A. *et al.* Microbial community and function-based synthetic bioinoculants: a perspective for sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 805498, 2022.

SUOMINEN, S. *et al.* Organic matter type defines the composition of active microbial communities originating from anoxic Baltic Sea sediments. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 628301, 2021.

UJVÁRI, G. *et al.* Root endophytic bacterial communities are shaped by the specific microbiota associated to mycorrhizal symbionts. **Plant and Soil**, p. 1-18, 2024.

ULBRICH, T. C. *et al.* Plant root exudates and rhizosphere bacterial communities shift with neighbor context. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 172, p. 108753, 2022.

URITSKIY, G. *et al.* MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. **Microbiome**, v. 6, p. 1-13, 2018.

VIEIRA JUNIOR, J. R. *et al.* Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas. 2013.

WANG, P. *et al.* Plant growth stages covered the legacy effect of rotation systems on microbial community structure and function in wheat rhizosphere. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 21, p. 59632-59644, 2023.

WANI, A. K. *et al.* Metagenomic profiling of rhizosphere microbiota: Unraveling the plant-soil dynamics. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 133, p. 102381, 2024.

WEI, Q. *et al.* Impact of Tree Mycorrhizal Types on Microbial Populations and Soil Ecological Benefits in Afforestation Sites. **Forest Science**, p. 1-26, 2025.

ZELAYA-MOLINA, L. X. *et al.* Plant growth-promoting and heavy metal-resistant *Priestia* and *Bacillus* strains associated with pioneer plants from mine tailings. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 9, p. 318, 2023.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises integradas de parâmetros fenotípicos e edáficos (Capítulo 1), de composição taxonômica por *amplicon* (Capítulo 2) e de potencial funcional via metagenômica *shotgun* (Capítulo 3) revelaram como o inóculo *on farm* de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi capaz de modificar o sistema rizosférico de *Caesalpinia peltophoroides* em casa de vegetação. No âmbito do crescimento vegetal, a inoculação com FMA, isolada ou aliada a doses moderadas de fertilização, promoveu incrementos expressivos em altura, diâmetro, biomassa aérea e radicular, conferindo às mudas maior vigor do que o uso exclusivo de fertilizante de Clark ou o solo controle. Paralelamente, os solos rizosféricos submetidos ao inóculo exibiram aumento de matéria orgânica, capacidade de troca catiônica e água disponível, além de concentrações mais altas de bases e micronutrientes, evidenciando uma rápida melhoria estrutural e química mesmo em substrato inicial de baixa fertilidade. A colonização micorrízica atingiu níveis próximos a 60 % em plantas tratadas apenas com FMA *on farm* e ainda 30 % quando associada à fertilização, demonstrando o clássico fenômeno de *trade-off* entre disponibilidade de nutrientes e intensidade da simbiose.

Na esfera da diversidade microbiana, o sequenciamento de *amplicons* mostrou que o inóculo remodelou profundamente as comunidades fúngicas e bacterianas; em Bacteria, isso ocorreu sem reduzir sua riqueza geral; em contrapartida, no domínio Fungi, o inóculo ampliou a riqueza e reequilibrou a abundância de táxons associados à ciclagem de nutrientes e à promoção de crescimento. Biomarcadores como *Pirellula*, Nitrosomonadaceae, *Coniochaeta* e Glomeraceae emergiram como grupos robustos de estabelecimento do inóculo e podem ser alvos de métodos de monitoramento, como PCR ou sondas de FISH, para rastrear a persistência e qualidade do bioinoculante em viveiros.

Complementando esses achados, a metagenômica *shotgun* permitiu reconstruir genomas metagenômicos (*MAGs*) e identificar categorias-chave, sendo elas: fixação de nitrogênio, biossíntese de exopolissacarídeos, solubilização de fósforo, síntese de auxinas e mecanismos de tolerância a estresses abióticos, que se apresentaram concentradas em poucos microrganismos. Essa concentração funcional sugere que a comunidade rizosférica, embora menos diversa em *MAGs* após a inoculação, é mais eficiente em promover o crescimento vegetal.

Em conjunto, esses resultados demonstram que o inóculo FMA *on farm* é uma tecnologia viável e sustentável para viveiros de mudas florestais, capaz de melhorar simultaneamente a nutrição das plantas, a qualidade do solo e a estrutura funcional da microbiota rizosférica. Para maximizar seus benefícios, é recomendado dosar a fertilização para não inibir a colonização, bem como incorporar protocolos de controle de qualidade baseados em biomarcadores moleculares. Como perspectivas, ensaios de *feedback* planta-solo em condições de campo e abordagens multi-ômicas complementares, como metatranscriptômica e metabolômica, podem ser realizados a fim de aprofundar o entendimento dos mecanismos que sustentam essa simbiose, com base em quais genes efetivamente são transcritos e quais metabólitos são produzidos na rizosfera, fornecendo uma abordagem mais fiel dos processos sustentam o vigor das mudas.

Até o momento, os achados aqui apresentados representam valiosos *insights* sobre o potencial do inóculo FMA *on farm* e constituem um ponto de partida crucial para a continuidade das pesquisas. Ao demonstrar eficiência na promoção de crescimento vegetal, melhoria edáfica e reestruturação funcional da microbiota rizosférica, este bioinóculo mostra-se tecnicamente viável e alinhado a objetivos socioambientais. Futuras etapas poderão validar sua aplicabilidade em larga escala, otimizar protocolos de produção local e consolidar o FMA *on farm* como tecnologia sustentável, acessível a viveiristas, comunidades rurais e programas de restauração, que podem adquirir inóculos de empresas especializadas ou produzir seu próprio inóculo de FMA *on farm*, ou até mesmo investir em parcerias científicas para suporte técnico, capacitação e garantir o controle de qualidade desses produtos, contribuindo para modos de produções florestais mais sustentáveis e integrados com a saúde do solo.

REFERÊNCIAS

AHMED, N. *et al.* Symbiotic synergy: How Arbuscular Mycorrhizal Fungi enhance nutrient uptake, stress tolerance, and soil health through molecular mechanisms and hormonal regulation. **IMA Fungus**, v. 16, p. e144989, 2025.

AKINWANDE, M. O. *et al.* Variance inflation factor: as a condition for the inclusion of suppressor variable (s) in regression analysis. **Open Journal of Statistics**, v. 5, n. 07, p. 754, 2015.

AKYOL, T. Yigit *et al.* Impact of introduction of arbuscular mycorrhizal fungi on the root microbial community in agricultural fields. **Microbes and Environments**, v. 34, n. 1, p. 23-32, 2019.

ALBERTSEN, M. *et al.* Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 533-538, 2013.

ALEXANDER, M. *et al.* Effects of acidity on microorganisms and microbial processes in soil. In: **Effects of Acid Precipitation on Terrestrial Ecosystems**. Boston, MA: Springer US, 1980. p. 363-374.

ALMEIDA, A. *et al.* A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. **Nature Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 105-114, 2021.

ALORI, E. T. *et al.* Microbial inoculants for soil quality and plant health. **Sustainable Agriculture Reviews**, p. 281-307, 2017.

AMANN, R. *et al.* Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 339-348, 2008.

AMANN, R. I. *et al.* Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 2, p. 762-770, 1990.

AMANN, R. I. *et al.* Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

ARCIDIACONO, M. *et al.* Field inoculation by arbuscular mycorrhizal fungi with contrasting life-history strategies differently affects tomato nutrient uptake and residue decomposition dynamics. **Plant and Soil**, v. 500, n. 1, p. 105-127, 2024.

BADRI, D. V. *et al.* Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 6, p. 666-681, 2009.

BAEZ-ROGELIO, A. *et al.* Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. **Microb Biotechnol**, 10 (1), 19-21. 2017.

BAGYARAJ, J. D. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). In: **A Handbook of Tropical Soil Biology**. Routledge, 2012. p. 131-147.

BAHADUR, A. *et al.* Mechanistic insights into arbuscular mycorrhizal fungi-mediated drought stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 4199, 2019.

BALD, D. R. *et al.* Microbiota do solo: A diversidade invisível e a sua importância. **Bio Diverso**, v. 1, n. 1, 2021.

BALZERGUE, C. *et al.* High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 426, 2013.

BARWANT, M. M. *et al.* Role of Mycorrhizal Association in Leguminous Plant Growth. In: **Recent Trends and Applications of Leguminous Microgreens as Functional Foods**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2025. p. 277-295.

BASU, A. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. **Sustainability**, v. 13, n. 3, p. 1140, 2021.

BATEMAN, A. *et al.* UniProt: the universal protein knowledgebase in 2025. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. D 1, p. D609-D617, 2024.

BELLIS, L. *et al.* Heavy metals accumulation, toxicity and detoxification in plants. MDPI - **Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, 2020.

BERENDSEN, R. L. *et al.* The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.

BINTARTI, A. F. *et al.* Cropping system modulates the effect of spring drought on ammonia-oxidizing communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 201, p. 109658, 2025.

Bioinsumos, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. <http://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/bioinsumos>. Visualizado em 04/10/2023.

BOLGER, A. *et al.* Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BOTELHO, G. R. *et al.* Rizobactérias: uma visão geral da importância para plantas e agrossistemas. **Ambientes em Movimento**, v. 3, n. 1, p. 22 a 46-22 a 46, 2023.

BOUBEKRI, K. *et al.* Multifunctional role of Actinobacteria in agricultural production sustainability: A review. **Microbiological Research**, v. 261, p. 127059, 2022.

BREMNER, J. M. *et al.* Nitrogen-total. **Methods of soil analysis: part 2 chemical and microbiological properties**, v. 9, p. 595-624, 1982.

BROWN, C. T. *et al.* Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. **Nature**, v. 523, n. 7559, p. 208-211, 2015.

CÁCERES, M. D. *et al.* Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. **Ecology**, v. 90, n. 12, p. 3566-3574, 2009.

CALLAHAN, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.

CAMPBELL, B. C. *et al.* Krumholzbacteriota and Deltaproteobacteria contain rare genetic potential to liberate carbon from monoaromatic compounds in subsurface coal seams. **Mbio**, v. 15, n. 3, p. e01735-23, 2024.

CERQUEIRA, L. *et al.* DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1944-1960, 2008.

CHAMIZO, S. *et al.* Cyanobacteria inoculation improves soil stability and fertility on different textured soils: gaining insights for applicability in soil restoration. **Frontiers in Environmental Science**, v. 6, p. 49, 2018.

CHAUMEIL, P. *et al.* GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. 2020.

CHEN, L. *et al.* Plant growth-promoting bacteria improve maize growth through reshaping the rhizobacterial community in low-nitrogen and low-phosphorus soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 57, p. 1075-1088, 2021.

CHEN, M. *et al.* Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi—from ecology to application. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1270, 2018.

CHEN, X. W. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and the associated bacterial community influence the uptake of cadmium in rice. **Geoderma**, v. 337, p. 749-757, 2019.

CHEN, Y. *et al.* Effects of different types of microbial inoculants on available nitrogen and phosphorus, soil microbial community, and wheat growth in high-P soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 23036-23047, 2021.

CHEN, Y. P. *et al.* Phylogenomics and diversification of Sordariomycetes. **Mycosphere (Online)**, v. 14, n. 1, 2023.

CHIVIAN, D. *et al.* Metagenome-assembled genome extraction and analysis from microbiomes using KBase. **Nature Protocols**, v. 18, n. 1, p. 208-238, 2023.

CHKLOVSKI, Al. *et al.* CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. **Nature Methods**, v. 20, n. 8, p. 1203-1212, 2023.

CLARK, C. A. The important role of soil texture on water. **University of Wisconsin-Madison, Crops and Soils, Division of Extension: Madison, WI, USA**, 2024.

CLARK, R. B. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 23, n. 7, p. 867-902, 2000.

CLARKE, K. R. *et al.* Getting started with PRIMER v7. PRIMER-E: Plymouth, Plymouth Marine Laboratory, v. 20, n. 1, 2015.

CSARDI, G. *et al.* The igraph software. **Complex Syst**, v. 1695, p. 1-9, 2006.

CZERNIAK, M. J. *et al.* Produção de inoculante micorrízico *on farm* utilizando resíduos da indústria florestal. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 1712-1721, 2014.

DA SILVA, G. A. *et al.* Four New Families of Arbuscular Mycorrhizal Fungi within the Order Glomerales. **Taxonomy**, v. 4, n. 4, p. 761-779, 2024.

DA SILVA, J. M. *et al.* Bioinputs in Sustainable Agriculture: Benefits, Challenges, and Pathways for Resilient Farming Systems. **Asian Journal of Research in Crop Science**, v. 10, n. 2, p. 85-97, 2025.

DAIMS, H. *et al.* Complete nitrification by *Nitrospira bacteria*. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 504-509, 2015.

DE CACERES, M. *et al.* Package ‘indicspecies’. **Indicators**, v. 8, n. 1, 2016.

DE MENDIBURU, F. *et al.* Package ‘agricolae’. **R Package, version**, v. 1, n. 3, p. 1143-1149, 2019.

DEDYSH, S. N. & YILMAZ, P. Refining the taxonomic structure of the phylum Acidobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 3796-3806, 2018.

DELGADO-BAQUERIZO, M. *et al.* A global atlas of the dominant bacteria found in soil. **Science**, v. 359, n. 6373, p. 320-325, 2018.

DELONG, E. F. *et al.* Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. **Science**, v. 243, n. 4896, p. 1360-1363, 1989.

DHIMAN, N. *et al.* Plant-microbe interaction to improve soil health. In: **Advancements in Microbial Biotechnology for Soil Health**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 189-226.

DORAN, J. W. *et al.* Defining and assessing soil quality. **Defining Soil Quality for a Sustainable Environment**, v. 35, p. 1-21, 1994.

DOUDS JR, D. D. *et al.* On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 809-818, 2006.

ETESAMI, H. *et al.* Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing bacteria, and silicon to P uptake by plant. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 699618, 2021.

FAYUAN, W. A. N. G. *et al.* Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and soil amendments to remediation of a heavy metal-contaminated soil using sweet sorghum. **Pedosphere**, v. 32, n. 6, p. 844-855, 2022.

FINN, D. R. *et al.* Cropping systems impact changes in soil fungal, but not prokaryote, alpha-diversity and community composition stability over a growing season in a long-term field trial. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 10, p. fiab136, 2021.

FRECHES, A. *et al.* The biotechnological potential of the Chloroflexota phylum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 90, n. 6, p. e01756-23, 2024.

GARBEVA, P. *et al.* Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. **Plant and Soil**, v. 302, p. 19-32, 2008.

GENRE, A. *et al.* Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 649-660, 2020.

GIANNINI, T. C. *et al.* Selecting plant species for practical restoration of degraded lands using a multiple-trait approach. **Austral Ecology**, v. 42, n. 5, p. 510-521, 2017.

GOMES, A. C. dos S. Mecanismo de indução de enzimas despolimerizantes da biomassa vegetal em *Myceliophthora thermophila*. 2018.

GORPENCHENKO, T. Y. *et al.* Changes in the composition and properties of cultured bacterial strains of ginseng rhizosphere according to soil characteristics in the forest and plots. **Agronomy**, v. 14, n. 12, p. 3019, 2024.

GOULART, K. C. S. *et al.* METAGENÔMICA APLICADA À BIOTECNOLOGIA. **Ciência & Tecnologia**, v. 5, n. 1, 2013.

GOULET, F. Characterizing alignments in socio-technical transitions. Lessons from agricultural bio-inputs in Brazil. **Technology in Society**, v. 65, p. 101580, 2021.

GU, G. *et al.* Continuous cropping of Patchouli alters soil physiochemical properties and rhizosphere microecology revealed by metagenomic sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1482904, 2025.

HANNULA, S. E. *et al.* Persistence of plant-mediated microbial soil legacy effects in soil and inside roots. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 5686, 2021.

HERRMANN, M. *et al.* Predominance of Cand. Patescibacteria in groundwater is caused by their preferential mobilization from soils and flourishing under oligotrophic conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1407, 2019.

HNINI, M. *et al.* Prevalence, diversity and applications potential of nodules endophytic bacteria: a systematic review. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1386742, 2024.

HOURIGAN, D. *et al.* Discovery and synthesis of leaderless bacteriocins from the Actinomycetota. **Journal of Bacteriology**, v. 206, n. 11, p. e00298-24, 2024.

IBRAHIM, S. RM *et al.* Natural products of the fungal genus *Humicola*: Diversity, biological activity, and industrial importance. **Current Microbiology**, v. 78, n. 7, p. 2488-2509, 2021.

IPCC, 2023. Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland.

ISLAM, M. *et al.* Phytoremediation as a green and sustainable prospective method for heavy metal contamination: a review. **RSC Sustainability**, 2024.

JESUS, E. da C. Bacterial community diversity and structure in soils from different land use systems of the western Brazilian Amazon evaluated by T-RFLP and sequencing analyses. 2008.

JIA, X. *et al.* Analysis of rhizosphere soil microbial diversity and its functions between Dahongpao mother tree and cutting Dahongpao. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1444436, 2024.

JIMÉNEZ, D. J. *et al.* Defining the eco-enzymological role of the fungal strain *Coniochaeta* sp. 2T2. 1 in a tripartite lignocellulolytic microbial consortium. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 1, p. fiz186, 2020.

JOHNSON, C. *et al.* 2. Analytical methods for use in plant analysis. 1959.

JORDAO, T. C. *et al.* Shifts in Arbuscular Mycorrhizal fungal properties due to vegetative remediation of mine spoil contamination from a dam rupture in Mariana, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 162, p. 103885, 2021.

KALAM, S. *et al.* Recent understanding of soil acidobacteria and their ecological significance: a critical review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 580024, 2020.

KANG, D. D. *et al.* MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. **PeerJ**, v. 7, p. e7359, 2019.

KERMEUR, N. *et al.* Iron availability and homeostasis in plants: a review of responses, adaptive mechanisms, and signaling. **Plant Abiotic Stress Signaling**, p. 49-81, 2023.

KOEPPEN, W. *Climatologia con un estudio de los climas de la tierra.* 1948.

KOT, A. M. *et al.* *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 6103-6117, 2016.

KUILA, D. *et al.* Aspects, problems and utilization of Arbuscular Mycorrhizal (AM) application as bio-fertilizer in sustainable agriculture. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100107, 2022.

LASA, A. V. *et al.* Metabarcoding reveals that rhizospheric microbiota of *Quercus pyrenaica* is composed by a relatively small number of bacterial taxa highly abundant. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1695, 2019.

LEE, S. *et al.* Effects of Organic Farming on Communities of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Mycobiology**, v. 36, n. 1, p. 19-23, 2008.

LEHMANN, A. *et al.* Mycorrhizas and soil aggregation. In: **Mycorrhizal Mediation of Soil.** Elsevier, 2017. p. 241-262.

LEHTOVIRTA-MORLEY, L. E. *et al.* Isolation of ‘*Candidatus Nitrosocosmicus franklandus*’, a novel ureolytic soil archaeal ammonia oxidiser with tolerance to high ammonia concentration. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 5, p. fiv057, 2016.

LEVY, A. *et al.* Elucidating bacterial gene functions in the plant microbiome. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 4, p. 475-485, 2018.

LI, Y. *et al.* Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms—a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, p. 301-311, 2004.

- LIANG, Y. *et al.* Impact of Aerated Irrigation Duration on the Growth of Greenhouse Grape Seedlings and Rhizosphere Soil Microorganisms. **Horticulturae**, v. 10, n. 12, p. 1351, 2024.
- LING, N. *et al.* Rhizosphere bacteriome structure and functions. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 836, 2022.
- LIU, C. *et al.* microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 2, p. fiae255, 2021.
- LIU, M. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungal colonization and soil pH induced by nitrogen and phosphorus additions affects leaf C: N: P stoichiometry in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) forests. **Plant and Soil**, v. 461, p. 421-440, 2021.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. v.3. 286p.
- LOVE, M. I. *et al.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, p. 1-21, 2014.
- LUQMAN, M. *et al.* PGPR and nutrient consortia promoted cotton growth, antioxidant enzymes, and mineral uptake by suppressing sooty mold in arid climate. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, p. 1551465, 2025.
- MA, L. *et al.* Long-term fertilization legacy effects and temperatures regulate soil microbial function of crop straw decomposition in a greenhouse vegetable field. **Applied Soil Ecology**, v. 210, p. 106056, 2025.
- MAITRA, S. *et al.* Bioinoculants—Natural biological resources for sustainable plant production. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 51, 2021.
- MANFREDINI, A. *et al.* Current methods, common practices, and perspectives in tracking and monitoring bioinoculants in soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 698491, 2021.
- MARTINS, A. P. B. *et al.* Inoculação de Microrganismos Eficientes (EM) e Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) em alface: um trabalho de campo conduzido na horta comunitária (HC) Vapabuçu, município de Sete Lagoas-MG. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, 2018.

MARTINS, W. B. R. *et al.* Ecological methods and indicators for recovering and monitoring ecosystems after mining: A global literature review. **Ecological Engineering**, v. 145, p. 105707, 2020.

MASUDA, Y. *et al.* Global soil metagenomics reveals distribution and predominance of Deltaproteobacteria in nitrogen-fixing microbiome. **Microbiome**, v. 12, n. 1, p. 95, 2024.

MCLAREN, M. R. Silva SSU taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 138), 2020.

MENEGHINE, A. K. *et al.* Análise metagenômica e potencial biotecnológico de microrganismos de solo e água de uma área agrícola com adubação orgânica. 2016.

MENZEL, P. *et al.* Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11257, 2016.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>>. MME, 2020.

MISE, K. *et al.* Undervalued pseudo-nifH sequences in public databases distort metagenomic insights into biological nitrogen fixers. **Msphere**, v. 6, n. 6, p. e00785-21, 2021.

MISHRA, V. *et al.* Synergistic effects of Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria in bioremediation of iron contaminated soils. **International journal of phytoremediation**, v. 18, n. 7, p. 697-703, 2016.

MORALES, D. P. *et al.* Advances and challenges in fluorescence in situ hybridization for visualizing fungal endobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 892227, 2022.

MOREIRA, A. *et al.* Soybean response to copper applied to two soils with different levels of organic matter and clay. **Journal of Plant Nutrition**, v. 42, n. 18, p. 2247-2258, 2019.

MOREIRA, B. C. *et al.* Effect of inoculation of pineapple plantlets with arbuscular mycorrhizal fungi obtained from different inoculum sources multiplied by the on-farm method. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 43, 2019.

NAZ, M. *et al.* The soil pH and heavy metals revealed their impact on soil microbial community. **Journal of Environmental Management**, v. 321, p. 115770, 2022.

NORTON, J. & OUYANG, Y. Controls and adaptive management of nitrification in agricultural soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1931, 2019.

NURK, S. *et al.* metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 824-834, 2017.

OKSANEN, J. *et al.* Package 'vegan'. **Community Ecology Package, version**, v. 2, n. 9, p. 1-295, 2013.

OKSANEN, J. *et al.* **Vegan: a community ecology. R package version**, p. 1-297, 2018.

OLM, M. R. *et al.* dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. **The ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2864-2868, 2017.

ÖPIK, M. *et al.* The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **New Phytologist**, v. 188, n. 1, p. 223-241, 2010.

PAES DA COSTA, D. *et al.* Soil fertility impact on recruitment and diversity of the soil microbiome in sub-humid tropical pastures in northeastern Brazil. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 3919, 2024.

PAN, J. *et al.* Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth-promoting bacteria (PGPR) inoculations on *Elaeagnus angustifolia* L. in saline soil. **Applied Sciences**, v. 10, n. 3, p. 945, 2020.

PANG, F. *et al.* Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1383813, 2024.

PANG, F. *et al.* Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1383813, 2024.

PARKS, D. H. *et al.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043-1055, 2015.

PARKS, D. H. *et al.* Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 1533-1542, 2017.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 763-775, 2008.

PEDERSEN, T. L. ggraph: An implementation of grammar of graphics for graphs and networks. **R package version**, v. 2, n. 3, p. 1, 2020.

PENA JUNIOR, M. A. G. *et al.* O futuro da agricultura brasileira: 10 visões. 2023.

PHILIPPOT, L. *et al.* Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789-799, 2013.

POTTER, S. C. *et al.* HMMER web server: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W200-W204, 2018.

POWELL, J. R. *et al.* Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem function. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1059-1075, 2018.

PRADHAN, S. K. *et al.* Illumina MiSeq based assessment of bacterial community structure and diversity along the heavy metal concentration gradient in Sukinda chromite mine area soils, India. **Ecological Genetics and Genomics**, v. 15, p. 100054, 2020.

PRADO, I. G. O. *et al.* Revegetation process increases the diversity of total and arbuscular mycorrhizal fungi in areas affected by the Fundão dam failure in Mariana, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 141, p. 84-95, 2019.

PRATES JÚNIOR, P. (Coord). Micorrizas arbusculares: conceitos, metodologias e aplicações. 1. ed. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Núcleo Regional Leste, Minas Gerais, 2021.

PRATES JÚNIOR, P. *et al.* Extensão em Microbiologia: mudas inoculadas com microrganismos benéficos na bacia do rio Doce. **Revista Ciência em Extensão**, v. 16, p. 332-343, 2020.

PUSZTAHELYI, T. *et al.* Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 573, 2015.

QIN, Y. *et al.* Forest conservation in Indigenous territories and protected areas in the Brazilian Amazon. **Nature Sustainability**, v. 6, n. 3, p. 295-305, 2023.

QUAN, L. *et al.* Beneficial effects of arbuscular mycorrhizae on Cu detoxification in *Mimosa pudica* L. grown in Cu-polluted soils. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 10, p. 25755-25763, 2023.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

QUINCE, C. *et al.* Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833-844, 2017.

RAVINATH, R. *et al.* Targeted metagenome sequencing reveals the abundance of Planctomycetes and Bacteroidetes in the rhizosphere of pomegranate. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 8, p. 481, 2022.

RAWAT, P. *et al.* Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 49-68, 2021.

RILLIG, M. C. *et al.* Soil aggregates as massively concurrent evolutionary incubators. **The ISME Journal**, v. 11, n. 9, p. 1943-1948, 2017.

SADHANA, B. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) as a biofertilizer-a review. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 3, n. 4, p. 384-400, 2014.

SALAM, L. B. *et al.* Structural and functional metagenomic analyses of a tropical agricultural soil. **Spanish Journal of Soil Science**, v. 9, n. 1, 2019.

SANTOS, D. R. Fósforo e fungos micorrízicos no crescimento de mudas arbóreas da caatinga. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 12, n. 4, p. 391-396, 2016.

SANTOS, N. G. N. *et al.* Granulometric fractions and physical-hydric behavior of sandy soils. **Agrarian**, v. 12, n. 45, p. 318-327, 2019.

SCHIMAK, M. P. *et al.* MiL-FISH: Multilabeled oligonucleotides for fluorescence in situ hybridization improve visualization of bacterial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 62-70, 2016.

SCHULZE, C. R. *et al.* Carbono da biomassa microbiana do solo em sistema de plantio direto com mais de 25 anos de implementação na Região Sul do Brasil. 2025.

SHAFFER, M. *et al.* DRAM for distilling microbial metabolism to automate the curation of microbiome function. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 16, p. 8883-8900, 2020.

SHINDE, R. *et al.* Potential of lignocellulose degrading microorganisms for agricultural residue decomposition in soil: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 320, p. 115843, 2022.

SHUAB, R. *et al.* Retraction Note to: Arbuscular Mycorrhizal Fungi: A Potential Tool for Restoration of Degraded Land. **Mycorrhiza-Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration**, p. C1-C1, 2017.

SIEBER, C. Dereplication, aggregation and scoring tool (DAS tool) v1. 0. Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL), Berkeley, CA (United States), 2017.

SILVA, R. MF *et al.* *Coniochaeta monsterae*, sp. nov.,(Coniochaetaceae, Coniochaetales): a new endophytic fungal species from Brazil. **Sydowia**, v. 75, p. 283, 2023.

SIMON, A. *et al.* FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. **Version 0.10**, v. 1, 2010.

SIMON, C. *et al.* Metagenomic analyses: past and future trends. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153-1161, 2011.

SKUZA, L. *et al.* Natural molecular mechanisms of plant hyperaccumulation and hypertolerance towards heavy metals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9335, 2022.

SMITH, S. E. *et al.* **Mycorrhizal Symbiosis**. AcademicPpress, 2010.

SOUZA DE SOUSA, C. E. *et al.* Soil Organic Matter Mineralization and Carbon Emission Across Different Land Uses in Coarse-Textured Soils. **Available at SSRN 5122823**.

SUMAN, A. *et al.* Microbial community and function-based synthetic bioinoculants: a perspective for sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 805498, 2022.

SUOMINEN, S. *et al.* Organic matter type defines the composition of active microbial communities originating from anoxic Baltic Sea sediments. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 628301, 2021.

TABERLET, P. *et al.* Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. **Oxford University Press**, 2018.

TEIXEIRA, A. FS *et al.* Microbiological Indicators of Soil Quality Under Native Forests are Influenced by Topographic Factors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, 2019.

TISDALL, J. M. *et al.* Organic matter and water-stable aggregates in soils. **Journal of Soil Science**, v. 33, n. 2, p. 141-163, 1982.

UJVÁRI, G. *et al.* Root endophytic bacterial communities are shaped by the specific microbiota associated to mycorrhizal symbionts. **Plant and Soil**, p. 1-18, 2024.

ULBRICH, T. C. *et al.* Plant root exudates and rhizosphere bacterial communities shift with neighbor context. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 172, p. 108753, 2022.

URITSKIY, G. *et al.* MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. **Microbiome**, v. 6, p. 1-13, 2018.

VERMA, K. K. *et al.* Synergistic interactions of nanoparticles and plant growth promoting rhizobacteria enhancing soil-plant systems: a multigenerational perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1376214, 2024.

VIEIRA JUNIOR, J. R. *et al.* Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas. 2013.

VIEIRA, N. A. Promoção de crescimento de espécies florestais a partir da triagem e inoculação de consórcios microbianos. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2021.

WANG, P. *et al.* Plant growth stages covered the legacy effect of rotation systems on microbial community structure and function in wheat rhizosphere. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 21, p. 59632-59644, 2023.

WANG, Y. *et al.* Effect of culture conditions on the performance of lignocellulose-degrading synthetic microbial consortia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 7981-7995, 2021.

WANI, A. K. *et al.* Metagenomic profiling of rhizosphere microbiota: Unraveling the plant-soil dynamics. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 133, p. 102381, 2024.

WARD, N. L. *et al.* Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WEI, Q. *et al.* Impact of Tree Mycorrhizal Types on Microbial Populations and Soil Ecological Benefits in Afforestation Sites. **Forest Science**, p. 1-26, 2025.

WEI, W. *et al.* Soil P-stimulating bacterial communities: response and effect assessment of long-term fertilizer and rhizobium inoculant application. **Environmental Microbiome**, v. 19, n. 1, p. 86, 2024.

WICKHAM, H. *et al.* Package 'ggplot2'. **Create elegant data visualizations using the grammar of graphics. Version**, v. 2, n. 1, p. 1-189, 2016.

WICKHAM, H. *et al.* Package 'ggplot2'. **Create elegant data visualizations using the grammar of graphics. Version**, v. 2, n. 1, p. 1-189, 2016.

XU, F. *et al.* The mechanism of arbuscular mycorrhizal fungi-alleviated manganese toxicity in plants: A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 108808, 2024.

YAN, A. *et al.* Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 359, 2020.

YANG, P. *et al.* Utilizing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) to Advance Sustainable Agriculture. **Bacteria**, v. 3, n. 4, p. 434-451, 2024.

ZELAYA-MOLINA, L. X. *et al.* Plant growth-promoting and heavy metal-resistant *Priestia* and *Bacillus* strains associated with pioneer plants from mine tailings. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 9, p. 318, 2023.

ZHANG, X. *et al.* Soil bacterial communities respond to climate changes in a temperate steppe. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e78616, 2013.

ZHANG, Y. *et al.* Enhancing the phytoremediation of heavy metals by combining hyperaccumulator and heavy metal-resistant plant growth-promoting bacteria. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 912350, 2022.

ZHEN, L. I. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi regulate plant mineral nutrient uptake and partitioning in iron ore tailings undergoing eco-engineered pedogenesis. **Pedosphere**, v. 34, n. 2, p. 385-398, 2024.

ZHOU, J. *et al.* Functional molecular ecological networks. **MBio**, v. 1, n. 4, p. 10.1128/mbio.00169-10, 2010.

ZHOU, Z. *et al.* Automated image analysis for quantitative fluorescence in situ hybridization with environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 2956-2962, 2007.