

GUILHERME MUSSE MOREIRA

**QUALIDADE DO SOLO E DIVERSIDADE DE FUNGOS EM RESPOSTA AO
CULTIVO DE FORRAGEIRAS E À INTERAÇÃO PLANTA-FUNGO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

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

T

M835q
2017

Moreira, Guilherme Musse, 1988-
Qualidade do solo e diversidade de fungos em resposta ao
cultivo de forrageiras e à interação planta-fungo / Guilherme
Musse Moreira. – Viçosa, MG, 2017.
x, 82f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Raphael Bragança Alves Fernandes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Física do solo. 2. Solo - Manejo. 3. Química do solo.
4. Microbiologia do solo. 5. Análise multivariada. 6. Redes
neurais. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Solos. Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de
Plantas. II. Título.

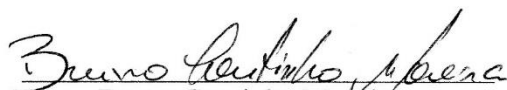
CDD 22 ed. 631.4

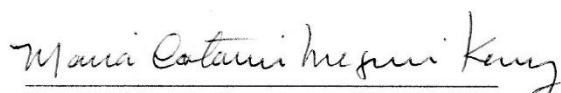
GUILHERME MUSSE MOREIRA

**QUALIDADE DO SOLO E DIVERSIDADE DE FUNGOS EM RESPOSTA AO
CULTIVO DE FORRAGEIRAS E À INTERAÇÃO PLANTA-FUNGO**

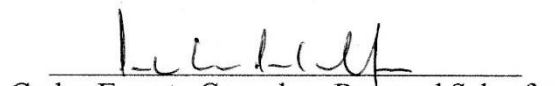
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

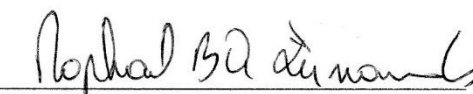
APROVADA: 21 de dezembro de 2017.


Bruno Coutinho Mofeira


Maria Catarina Megumi Kasuya
(Coorientadora)


Diego Lang Burak


Carlos Ernesto Gonçalves Reynaud Schaefer


Raphael Bragança Alves Fernandes
(Orientador)

Aos meus pais Joaquim e Marisa,
irmãos Davi e Jáder
e à minha noiva Camila,
dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida a quem sou devoto, pela vida, saúde, e determinação para lutar e conquistar meus sonhos. A todos meus familiares, por serem minha base forte. A Universidade Federal de Viçosa, na qual tenho orgulho de ter estudado, pelos recursos, beleza, amigos que encontrei. Ao Departamento de Solos, pela infraestrutura, suporte técnico e científico; e à Capes e CNPq, pelo apoio financeiro. Aos meus orientadores Raphael Fernandes e Maria Catarina Kasuya, por todo apoio, amizade, competência, disponibilidade e motivação em todas etapas deste trabalho. Aos professores, pela valiosa contribuição na construção de meu conhecimento e auxílio neste estudo, em especial os professores Julio César Lima Neves, Igor Rodrigues Assis e Paulo Roberto Cecon. Aos meus amigos Robson Gonçalves, Gustavo Magalhães, Laís Silva, Steliane Coelho, Cristiano Souza, Rafael Teixeira, Rafael Oliveira, Aristides Ngolo, Vanessa Schiavon, Conrado Viera, Paulo Prates, Marliane Silva, Bruno Moreira e Tomás Veloso e todos os demais que tive o prazer de conhecer, por todo companheirismo, apoio emocional e laboral durante o doutorado. Um agradecimento especial aos estagiários Guilherme Xavier, Clarice Lopes, Eleniz Dias e Iara Dias, por terem sido fundamentais em etapas decisivas deste trabalho. Aos técnicos de laboratório Claudio Brustolini, João Milagres, Humberto Rosado e Camila Costa, pelos ensinamentos e auxílio em todas análises.

Muito obrigado!

“Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total,
buscar seu último limite e dar o melhor de si”

Ayrton Senna

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1: QUALIDADE DO SOLO EM RESPOSTA AO EFEITO RIZOSFERA DE LONGO PRAZO DE DIFERENTES FORRAGEIRAS	4
INTRODUÇÃO	4
MATERIAL E MÉTODOS.....	6
Descrição da área e forrageiras	6
Amostragens e procedimentos analíticos	6
Procedimentos estatísticos	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
Análise multivariada.....	9
Análise univariada.....	13
Considerações finais.....	16
CONCLUSÕES	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 2: DIFERENTES ESPÉCIES DE FORRAGEIRAS DETERMINAM A DIVERSIDADE DE FUNGOS NO SOLO?.....	22
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS	27
Taxonomia	27
Índice de Relevância Taxonômica	29
Rede Neural Artificial	32
DISCUSSÃO	35
Diversidade de Fungos	35
Papel dos principais grupos	38
Considerações finais.....	41
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
CAPÍTULO 3: ALTERAÇÃO DA ESTRUTURA DE SOLOS E RESÍDUO DE MINERAÇÃO POR PLANTAS E FUNGOS.....	48
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54

Comparações com o tratamento controle	54
Comparação entre tratamentos: efeito de planta	58
Comparação entre tratamentos: efeito de inóculo	61
Comparação entre tratamentos: interação inóculo x planta	62
CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
CONCLUSÕES GERAIS	73
MATERIAL SUPLEMENTAR	74

RESUMO

MOREIRA, Guilherme Musse, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2017. **Qualidade do solo e diversidade de fungos em resposta ao cultivo de forrageiras e à interação planta-fungo.** Orientador: Raphael Bragança Alves Fernandes. Coorientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya e Igor Rodrigues Assis.

As forrageiras são plantas de grande importância para o Brasil. Além de proporcionar o desenvolvimento da pecuária no país, essas plantas também são condicionadoras de várias propriedades do solo. Adicionalmente, os microorganismos associados a elas também podem desempenhar um papel preponderante sobre a estrutura do solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes espécies de forrageiras sobre a alteração dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos do solo e identificar as características e grupos de fungos mais relevantes. Para alcançar esta proposta, foram conduzidos dois experimentos em campo e em casa de vegetação. Em condições de campo, avaliou-se solo cultivado com 17 espécies forrageiras, incluindo gramíneas e leguminosas. As plantas foram cultivadas por mais de dez anos na área experimental do Departamento de Agrostologia da Universidade Federal de Viçosa. As características avaliadas foram submetidas a análises multivariadas, univariadas, de bioinformática e de inteligência artificial. Os resultados indicam que o carbono da matéria orgânica particulada, o carbono da matéria orgânica associado aos minerais, a proteína do solo relacionada à glomalina, total e facilmente extraível, os teores de Ca e Mg, a densidade do solo e a microporosidade foram os mais importantes entre os parâmetros avaliados. Os resultados da análise de agrupamento indicam que as características orgânicas do solo são mais influenciadas pelas espécies Mombaça, Colonião, Camarões, Marandu, Xaraés, Massai, Tanzânia, Puerária e Andropogon, enquanto as características físicas do solo foram mais alteradas pelas forrageiras Amendoim, Decumbens e Humidícola. Por sua vez, as características químicas são alteradas pela leguminosa Estilosantes. Em relação à diversidade de fungos do solo associados às forrageiras estudadas, observou-se homogeneidade nos índices de diversidade entre as espécies forragens, indicando que o manejo e não a espécie forrageira deve ter maior influência sobre essa característica. No entanto, houve variações nos perfis de microbiota do solo. A rede neural permitiu identificar os grupos mais importantes de fungos entre todas as forrageiras e em cada espécie. Os grupos de fungos mais importantes pertencentes à ordem Mortierellales e à família Nectriaceae. Além disso, foi proposto um índice para expressar o nível de importância de cada grupo de fungos encontrado. Em condições de casa de vegetação, avaliamos o efeito das plantas (amendoim forrageiro,

Arachis pintoi e braquiária, *Brachiaria brizantha*) e inóculos (fungo *Piroformospora indica* e um mix com três espécies de fungos micorrízicos arbusculares, *Rizophagus clarus*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Gigaspora albida*,) sobre a alteração da estrutura de diferentes solos, neste caso, considerados substratos. Foram avaliados o desenvolvimento da planta e características físicas e microbiológicas do solo. Os resultados indicaram que as mudanças na meso e macroestrutura dos substratos ocorreram predominantemente pela ação das raízes das plantas, especialmente a braquiária. Os inoculados influenciaram a qualidade microbiológica do solo, principalmente na presença de amendoim forrageiro. Os dados sugerem que o processo de alteração da estrutura do solo/substratos depende da ação das raízes das plantas e é potencializado com plantas agressivas, como as gramíneas. Por outro lado, na ausência de plantas, a presença de microorganismos, principalmente grupos autotróficos, alterou a micro e nanoestrutura do solo.

ABSTRACT

MOREIRA, Guilherme Musse, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2017. **Soil Quality and fungal diversity in response to forage cultivate and plant-fungal interaction.** Adviser: Raphael Bragança Alves Fernandes. Co-advisers: Maria Catarina Megumi Kasuya and Igor Rodrigues Assis.

Forages plants have great importance for Brazil. Besides to promote the livestock in the country, these plants are also condition various soil properties. In addition, microorganisms associated with them may also play a preponderant role in on soil structure. The aim of this work was evaluating the effect of different forage species on the alteration of physical, chemical and microbiological soil parameters and identify the most relevant characteristics and groups of fungi. To achieve this proposal, we conducted two experiments under field and green house conditions. On field conditions we explored the soil cultivate with 17 forage species, including grasses and legumes. The plants were cultivated for more than ten years in the experimental area of Agrostology Departament of Universidade Federal de Viçosa. The evaluated characteristics were submitted to multivariate, univariate, bioinformatics and artificial intelligence analyzes. The results indicate that carbon of particulate organic matter, organic matter carbon associated with minerals, soil protein related to glomalin, total and easy extractable, Ca and Mg contents, soil bulk density and microporosity were the most important among the parameters evaluated. The results of the clustering analysis indicate that the soil organic characteristics are more influenced by the species Mombaça, Colônia, Cameroon, Marandu, Xaraés, Massai, Tanzânia, Puerária and Andropogon, whereas the soil physical characteristics are more altered by the forages Amendoim, Decumbens and Humidícola. In turn, the chemical characteristics are altered by the leguminous Estilosantes. In relation to the soil fungal diversity associated with the studied forage, it was observed homogeneity in the indexes of diversity among the species, indicating that the management and not the forage species, should have a greater influence on this characteristic. Nevertheless, there were variations in the soil microbiota profiles. The neural network allowed to identify the most important groups of fungi among all forage and in each forage. The most important fungi groups belonging to the order Mortierellales and the family Nectriaceae. In addition, an index was proposed to express the level of importance of each fungus group founded. On greenhouse conditions, we evaluated the effect of plants (brachiaria, *Brachiaria brizantha* and forage peanuts, *Arachis pintoi*) and inocula (fungus *Piroformospora indica* and mix with three species of arbuscular

mycorrhizal fungi, *Rizophagus clarus*, *Claroideoglossum etunicatum* and *Gigaspora albida*,) on structure alteration of different soils, in this case, considered substrates. We evaluated the plant development and soil physical and microbiological characteristics. The results indicated that the changes in the meso and macrostructure of the substrates occurred predominantly by the action of the plants roots, with emphasis for the brachiaria. The inoculums used influenced the soil microbiological quality, especially in the presence of forage peanut. The data suggest that the process of substrates/soil structure alteration is dependent on the action of the roots of plants, and is potentialized with aggressive plants such as grasses. On the other hand, in the absence of plants, the presence of microorganisms, mainly autotrophic groups, altered the micro and nano soil structure.

INTRODUÇÃO GERAL

A qualidade do solo é um tema frequente de estudos acadêmicos. Trata-se de um estado do solo de visão extremamente holística, e cuja avaliação é baseada em indicadores sensíveis às mudanças provocadas, principalmente, pelo manejo. Por ser uma característica complexa, muitas vezes a qualidade do solo tem sido abordada isoladamente sob os aspectos químicos, físicos e microbiológicos. Entretanto, a avaliação isolada deste estado muitas vezes não é satisfatória, por não oferecer um retrato fiel da qualidade do solo. Neste sentido trabalhos que busquem avaliar interfaces entre as diversas características do solo (variáveis físicas, químicas e microbiológicas) são mais informativos e confiáveis para se retratar a qualidade do solo, uma vez que essas características são dinâmicas e interdependentes.

Dentre os diversos serviços ambientais prestados pelo solo destacam-se os relacionados à sua estrutura. Basicamente, a estrutura de um solo consiste na organização ou arranjo de seus componentes minerais e orgânicos, e governa diversos processos como a disponibilidade de água às culturas e ao homem, a disponibilidade de nutrientes e condições favoráveis ao desenvolvimento das plantas, bem como os relacionados ao habitat e funções microbianas. Ao mesmo tempo que governa, a estrutura é dependente de todos estes processos. Logo qualquer manejo que atue sobre eles poderá também alterar o estado da estrutura do solo e interferir na qualidade do mesmo. Deste modo a avaliação da estrutura pode por si só, não é suficiente para informar adequadamente a real situação de todos os processos que ocorrem no solo.

A proposta desta tese consistiu em analisar interfaces entre as características químicas, físicas e microbiológicas, buscando o melhor entendimento das funções e dos processos guiadores da qualidade do solo. Para isso, alguns pontos chave foram explorados, como o efeito rizosfera e o longo tempo de cultivo, uma vez que mudanças pontuais nessas características muitas das vezes são difíceis de serem detectadas pelos métodos analíticos disponíveis.

Os estudos foram conduzidos partindo-se do princípio de que as plantas e os microrganismos são os principais agentes organizadores e estabilizadores da estrutura do solo. Plantas forrageiras foram selecionadas por possuírem grande potencial de alteração da qualidade do solo dada a vigorosidade de seu sistema radicular e a alta capacidade de incremento nos teores de carbono no solo. Além disso, estas plantas são amplamente utilizadas no Brasil, ocupando área significativa do território nacional.

Do ponto de vista microbiológico, optou-se por avaliar microrganismos presentes no solo que mantivessem algum tipo de associação com as forrageiras por serem eles os principais agentes recicladores neste sistema, e também os fungos micorrízicos arbusculares, tendo em vista sua capacidade de promoção do crescimento vegetal e de alteração da estrutura do solo.

A tese foi dividida em três capítulos apresentados em formato de artigos científicos. Os dois primeiros capítulos tratam da avaliação da influência do cultivo por mais de dez anos de diferentes espécies de forrageiras sobre características químicas, físicas e microbiológicas do solo. Espécies de forrageiras de representatividade nacional foram selecionadas e, a partir de técnicas estatísticas multivariadas, análises de sequenciamento de DNA e uso de inteligência artificial, buscou-se alcançar os objetivos propostos. O terceiro capítulo consistiu de avaliação realizada em experimento de casa de vegetação, onde se buscou promover a reestruturação do solo por meio do uso combinado de forrageiras e microrganismos.

CAPÍTULO 1

QUALIDADE DO SOLO EM RESPOSTA AO EFEITO RIZOSFERA DE LONGO PRAZO DE DIFERENTES FORRAGEIRAS

CAPÍTULO 1: QUALIDADE DO SOLO EM RESPOSTA AO EFEITO RIZOSFERA DE LONGO PRAZO DE DIFERENTES FORRAGEIRAS

Resumo: As forrageiras são culturas de grande importância para o Brasil. Além de proporcionar sucesso da pecuária no país, estas plantas também são capazes de condicionar diversas propriedades solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes espécies de forrageiras sobre características associadas aos aspectos físicos e químicos de caráter orgânico e inorgânico, bem como identificar as mais relevantes na avaliação da qualidade do solo cultivado com forrageiras. A área experimental está localizada no setor de agrostologia da Universidade Federal de Viçosa onde o solo cultivado com 17 espécies de forrageiras compreendendo gramíneas e leguminosas foi avaliado sobre as características químicas de natureza orgânica e inorgânica e físicas. As características avaliadas foram submetidas a análises multivariada e univariada. Os resultados indicam que o carbono da matéria orgânica particulada, carbono da matéria orgânica associada aos minerais, proteína relacionada à glomalina total e facilmente extraível, teores de Ca e Mg, densidade do solo e microporosidade apresentaram maior importância no modelo multivariado. O agrupamento hierárquico realizado com base nestas características distribuiu as forrageiras em quatro grupos com diferentes potencialidades para alteração das características do solo, principalmente as relacionadas com os teores de proteína relacionada à glomalina total, teores de Ca trocável, e densidade do solo.

Palavras chave: análise multivariada, estrutura do solo, nutrientes, carbono do solo

INTRODUÇÃO

As forrageiras representam importante parte do uso das terras do Brasil. Dos atuais 8.515.767,049 km² (IBGE, 2016), 1.700.000 km² são ocupados por pastagens, o que representa cerca de 20 % do território nacional. Dessa área, cerca de 1.000.000 km² (100.000.000 ha) são pastagens cultivadas e o restante é formado por pastagens naturais (Fonseca e Martuscello, 2010).

Forrageiras são plantas majoritariamente exóticas, podendo ser utilizadas para alimentação animal e também como cobertura morta para o solo. Elas são classificadas quanto à forma de crescimento em cespitosas/eretas, formando touceiras ou estoloníferas/rizomatosas, com crescimento rasteiro ou prostrado (Costa et al., 2004). A maioria das espécies possui boa capacidade de rebrota e boa resistência ao pisoteio. Os principais gêneros atualmente utilizados no Brasil são: *Brachiaria*, *Cynodon*, *Paspalum*,

Panicum, *Pennisetum*, *Andropogom*, *Arachis*, *Stylosantes* e *Calopogonio* (Fonseca e Martuscello, 2010).

As forrageiras quando bem manejadas são fundamentais para a estabilização da estrutura e aumento nos teores de matéria orgânica do solo, processos atribuídos principalmente a dois fatores associados a essas plantas: sistema radicular vigoroso e alta capacidade de acúmulo de biomassa (Costa et al., 2015; Moraes et al., 2016).

O emaranhado provocado pelas raízes é capaz de simultaneamente aproximar partículas minerais, adicionar carbono à matriz do solo e fornecer melhores condições para formação e estabilização da estrutura. Com isso, há o surgimento de um habitat viável para desenvolvimento da microbiota edáfica que são agentes primordiais na ciclagem de carbono e nutrientes. Os microrganismos por sua vez, também desempenham papel fundamental sobre a estrutura através da liberação de exudados metabólicos com propriedades cimentantes no solo (Tisdall e Oades, 1982; Oades, 1984). Desta forma, o fato de possuírem sistemas radiculares vigorosos, faz com que as forrageiras assumam um protagonismo dentre as demais plantas na manutenção da qualidade física do solo.

Como indicado, os potenciais efeitos positivos das forrageiras para a qualidade do solo são diversos, atingindo características físicas e químicas do solo. Muitos trabalhos têm focado em características isoladas ou em um conjunto de mesma natureza. Por outro lado, estudos que buscam integrar características variadas na avaliação do potencial de melhoria da qualidade do solo pelas pastagens são menos comuns. Para tal integração, o uso de técnicas multivariadas é essencial por serem ferramentas adequadas para a seleção de variáveis sensíveis ou indicadoras na caracterização, avaliação e planejamento do uso sustentável de agroecossistemas (Toledo et al., 2009; Freitas et al., 2014).

Outra limitação frequentemente observada em estudos sobre a qualidade do solo é o tempo de implantação dos tratamentos que se procura avaliar. Alterações na qualidade do solo costumam demandar tempo, e a condução de experimentos de longa duração é uma tarefa custosa, ainda mais quando se considera a diversidade de espécies de forrageiras disponíveis e utilizadas na atualidade.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do cultivo de diferentes espécies de forrageiras sobre características associadas com a qualidade do solo, considerando aspectos físicos, químicos orgânicos e inorgânicos, bem como identificar as mais relevantes na avaliação da qualidade do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da área e forrageiras

Amostras de solo foram coletadas no setor de Agrostologia do Departamento de Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa, localizado nas coordenadas 20° 46' 26'' S e longitude 42° 51' 30'' O. A região apresenta clima do tipo Cwa (Köppen) subtropical, com invernos secos e verões quentes e o solo foi classificado como Argissolo Amarelo Distrófico (Embrapa, 2013)

As unidades experimentais foram formadas por parcelas de aproximadamente 16 m² com forrageiras cultivadas no mesmo local há pelo menos dez anos. Inicialmente toda a área teve o solo corrigido e adubado. Anualmente, todas as parcelas receberam adubação (350 g da formulação 08:28:16 por parcela, correspondendo a 220 kg ha⁻¹) e o manejo adotado era a poda anual com roçadeira mecânica e retirada da biomassa da parte aérea.

As forrageiras cultivadas nas parcelas compreenderam gêneros com diferentes exigências nutricionais. Tais exigências são basicamente oriundas de seus processos evolutivos e permitem dividir as espécies em três grupos. O primeiro grupo é formado por espécies e híbrido mais exigentes compreendendo: *Andropogom gayanus* (Andropogom), *Panicum maximum* (três cultivares, Tanzânia, Massai e Mombaça); *Cynodon dactylon* (Tifton); *Pennisetum purpureum* (Cameroon) e híbrido cruzamento de *Pennisetum americanum* x *Pennisetum purpureum* (Colonião). O segundo grupo é formado por espécies e híbrido consideradas mais rústicas: híbrido *Brachiaria decumbens* x *Brachiaria ruziziensis* (Mulato); *Brachiaria brizantha* (cultivares Marandu e Xaraés); *Brachiaria ruziziensis* (Ruzizienses); *Brachiaria humidicola* (Humidícola); *Brachiaria decumbens* (Decumbens) e *Melinis minutiflora* (capim Gordura). Por sua vez, o terceiro grupo foi formado pelas leguminosas *Arachis pintoi* (Amendoim Forrageiro); *Pueraria phaseoloides* (Puerária) e *Stylosanthes guianensis* (Estilosantes). Adicionalmente amostras em área de mata adjacente e em mesma posição da paisagem foram coletadas e tomadas como referência. Apesar da divisão, as espécies ou híbridos, bem como a área de referência foram avaliados como tratamentos individuais.

Amostragens e procedimentos analíticos

As 17 forrageiras avaliadas foram cultivadas por todo período sob as mesmas condições em parcela única. Três amostras foram retiradas na camada de 0 a 15 cm de profundidade em pontos aleatórios dentro de cada parcela e na mata e foram consideradas

como repetições. Dessa forma, o experimento foi analisado considerando um delineamento inteiramente casualizado.

As amostras coletadas foram submetidas às diferentes análises no Laboratório de Isótopos Estáveis e no Laboratório de Física do solo, pertencentes ao Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. Na caracterização química das amostras de terra fina seca ao ar (Defilippo e Ribeiro, 1997) foram avaliados pH em água (1:2,5); Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} trocáveis, extraídos com solução de KCl 1 mol L⁻¹; acidez potencial (H+Al) extraída com acetato de cálcio a pH 7,0; P e K disponíveis extraídos com solução ácida (Mehlich-1).

A produção de raízes foi calculada contabilizando-se a massa de raízes (M-raiz) presentes nas amostras de solo deformadas coletadas. O cálculo dos valores de densidade de raízes (Ds raiz) foi estimado a partir dos valores de densidade do solo.

As frações particulada (matéria orgânica particulada, mop) e associada aos minerais (matéria orgânica associada aos minerais, mam) da matéria orgânica do solo foram obtidas conforme Cambardella e Elliott (1992). As análises dos teores totais de C, N nas frações mop e mam foram realizadas em espectrômetro de massa de razão isotópica - IRMS (ANCA GSL 20-20, Sercon, Crewe, UK), sendo posteriormente calculadas as relações C/N da fração mop (C/Nmop) e da fração mam (C/Nmam).

Extração dos esporos de fungos micorrízicos arbusculares foi realizada por decantação e peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) seguido por centrifugação em sacarose 50 % (Jenkins, 1964). Amostras de 60 g de solo TFSA foram agitadas em 2 L de água por um minuto e passadas em um jogo de duas peneiras de 0,84 e 0,044 mm. Os esporos e partículas finas de solo retidos na peneira de 0,44 mm foram centrifugados em água por 5 minutos a 1750 rpm, posteriormente o sobrenadante foi descartado e adicionou-se solução de sacarose 50 % ao material remanescente. Procedeu-se então nova centrifugação por um minuto na mesma velocidade para separação dos esporos. O sobrenadante foi passado na peneira de 0,044 mm onde os esporos ficaram retidos para contagem em placa canaletada com auxílio de lupa com aumento de 20 vezes. O número de esporos (Nº esporos) foi expresso por grama de solo.

Os parâmetros relativos à biomassa microbiana foram obtidos conforme método da fumigação-extração, pelo método da irradiação em micro-ondas descrito por Islam e Weil (1998). O carbono (Cbio) e nitrogênio (Nbio) da biomassa microbiana foram determinados de acordo com Vance et al. (1987). Com os dados de Cbio e Nbio foi calculada a relação C/N da biomassa microbiana (C/Nbio).

Na avaliação da respiração basal (RB) dos microorganismos, amostras de solo (20 g massa seca) foram incubadas a aproximadamente 80% da capacidade de campo em frascos de 0,6 dm³. Nestes frascos foram coletadas amostras gasosas sequenciais (4, 24, 72, 144, 288, 456 e 600 h) com o auxílio de uma seringa (60 mL) equipada com válvula de chaveamento. Em seguida, utilizando-se o equipamento Cavity ring-down spectrometer (CRDS, G2131-i, Picarro, Sunnyvale, CA) foram determinadas as quantidades acumuladas de CO₂ e C respirados pela biomassa microbiana. Após cada coleta os frascos foram abertos e tiveram suas atmosferas homogeneizadas.

O quociente metabólico (qCO_2), entendido como a quantidade de C proveniente do CO₂ emitida pelos microrganismos por unidade de C da biomassa microbiana (C_{bio}), foi calculado conforme a equação $qCO_2 = C-CO_2 (RB)/C_{bio}$ (Anderson e Domsch, 1993).

Os teores de proteína relacionada a glomalina total (Gt) e facilmente extraível (Gfe) do solo foram determinados conforme Wright e Upadhyaya (1996). Para essa análise utilizou-se extrator citrato de sódio nas concentrações 0,05 e 0,02 M respectivamente para as frações Gt e Gfe, na proporção extrator:solo igual 8:1. As amostras foram autoclavadas uma vez por 30 min para Gfe e quatro vezes para Gt até que se obteve coloração amarelo claro no extrato. A determinação dos teores de Gt e Gfe foi realizada por colorimetria em espectrofotômetro com uso do reagente de proteína de Bradford (Bradford, 1976).

As características físicas avaliadas conforme (Embrapa, 2011) foram: granulometria; argila dispersa em água (ADA); condutividade hidráulica (CH) em meio saturado; densidade do solo (Ds) e de partículas (Dp); macro (Pma), micro (Pmi) e porosidade total (Pt); e estabilidade de agregados por via úmida, com posterior cálculo do diâmetro médio ponderado (DMP). Nas análises físicas foram utilizadas amostras deformadas e amostras com estrutura preservadas coletadas em anel volumétrico de dimensões aproximadas 5 x 5 cm de altura e diâmetro.

Procedimentos estatísticos

Para realização da análise estatística procedeu-se o uso de técnicas multivariadas a fim de se buscar reduzir o número de variáveis explicativas sem perda de informação. Para isso foi adotado a análise de componentes principais (ACP) conforme método proposto por Pereira e Pereira (2004) com adaptações. Para a realização da ACP utilizou-se os dados de cada repetição e variáveis não redundantes. Desta maneira, iniciou-se o procedimento da ACP com 29 variáveis (C_{bio}, N_{bio}, C/N bio, C_{mop}, C/N mop, C_{mam}, C/N mam, Gt, Gfe, qCO_2 , RB, pH, P, K, Ca, Mg, Al, H+Al, Ds, Pma, Dp, Ko, DMP,

ADA, argila, areia, silte, Ds-raiz e N° esporos), sendo selecionados somente os componentes principais com autovalores $\geq 1,0$ (Kaiser, 1958).

Cada componente principal apresenta um autovalor e um coeficiente de carga (*loading*) relacionado a cada variável. Uma vez selecionados os componentes principais (autovalores $\geq 1,0$), elevou-se ao quadrado os *loadings*, obtendo-se dessa forma as comunalidades que representam o grau de explicação de cada variável dentro de cada componente principal. Na sequência obteve-se produto das comunalidades pelos autovalores de cada componente principal e em seguida calculou-se o somatório desses produtórios para cada variável (A_i) e o somatório de A_i . Por fim, obteve-se o peso de cada variável dentro do modelo multivariado pela relação entre $A_i/\Sigma(A_i)$. A variável que apresentou o menor peso dentro do modelo multivariado foi eliminada e uma nova análise foi realizada com as variáveis remanescentes. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de expressiva variância acumulada nos dois primeiros componentes principais, onde é frequente a utilização do valor $\geq 70\%$ para a finalização desse procedimento (Hair et al., 2005). A eliminação de uma variável por vez permite ao modelo analisar somente variáveis de maior importância na explicação da variância. As variáveis mais explicativas foram aquelas constantes do modelo adequado obtido ao final dos procedimentos e que apresentaram *loadings* $\leq -0,65$ ou $\geq 0,65$.

A partir dos dados das variáveis obtidas no modelo final após procedimento da ACP promoveu-se a análise de agrupamento hierárquico das forrageiras. Essas mesmas variáveis foram submetidas à análise de variância e ao teste de agrupamento de médias Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando-se o software Statistica® (StaSoft, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise multivariada

Um modelo multivariado compreendendo dois componentes principais explicou 73,78% da variância dos dados (42,66 % para CP1 e 31,12% para CP2). A ACP selecionou oito das 29 variáveis analisadas, cujas contribuições percentuais para o modelo obtido foram: Gt (16,37%), Gfe (13,56%), Cmam (13,17%), Ca (12,60%), Cmop (11,77%), Mg (11,57%), Ds (10,65%), Pmi (10,32%) (Tabela 1). As variáveis selecionadas pela ACP incluem variáveis físicas e químicas orgânicas e inorgânicas. A interpretação da contribuição das variáveis selecionadas no modelo obtido indica que o CP1 é explicado, predominantemente, pelas variáveis químicas orgânicas (Cmop, Cmam, Gt

e Gfe) e inorgânicas (Ca e Mg). Por sua vez o CP2 é explicado, predominantemente, pelas variáveis físicas (Ds e Pmi). A contribuição total das variáveis no modelo segundo a sua natureza foi de 54,86 % para aquelas associadas às características químicas orgânicas, 21,16 % para as de natureza química inorgânica e 20,98 % para as físicas. Analisando-se cada variável e, com base na comparação dos valores das respectivas comunalidades de CP1 e CP2 (Tabela 1), observa-se que o Ca apresenta importância de magnitude semelhante nos dois componentes principais. Isto sugere que essa característica seja influenciada tanto pelas variáveis de natureza química (CP1), como pelas variáveis de natureza físicas (CP2).

Tabela 1 – Características das variáveis selecionadas em análise de componentes principais utilizada na análise de efeito do cultivo de diferentes espécies de forrageiras sobre a qualidade do solo

Variáveis	Loadings		Comunalidades		Contribuição (%)
	CP1	CP2	CP1	CP2	
Cmop	-0,72	-0,37	1,77	0,33	11,77
Cmam	-0,73	-0,46	1,83	0,52	13,17
Gt	-0,91	-0,20	2,82	0,10	16,37
Gfe	-0,73	-0,48	1,84	0,58	13,56
Ca	-0,60	0,65	1,23	1,02	12,60
Mg	-0,68	0,43	1,59	0,47	11,57
Ds	-0,33	0,79	0,36	1,54	10,65
Pmi	0,24	-0,81	0,20	1,64	10,32
Autovalor	3,41	2,49			
Var. explicada (%)	42,66	31,12			
Var. explicada acumulada (%)	42,66	73,78			

CP1 e CP2: componentes principais 1 e 2; Cmop: carbono na matéria orgânica particulada; Cmam: carbono na matéria orgânica associada aos minerais; Gt: proteína relacionada à glomalina total; Gfe: proteína relacionada à glomalina facilmente extraível; Ca: cálcio trocável; Mg: magnésio trocável; Al: alumínio trocável; Ds: densidade do solo e Pmi: microporosidade.

A capacidade de interação do Ca tanto com a fração orgânica do solo quanto com a mineral pode explicar o destaque para esse cátion nos dois componentes principais, embora fosse menos relevante no CP1. Além de ser um dos macronutrientes mais requeridos pelas plantas e fator indutor do crescimento de raízes, o Ca é considerado

cátion flocculante dos coloides e importante componente do complexo sortivo. O Ca pode ainda contribuir para o incremento da MOS ao neutralizar cargas expostas em grupamentos funcionais orgânicos, interação que gera um efeito condensador dessas partículas que naturalmente tornam-se menos expostas à degradação (Silva e Mendonça, 2007). Dessa forma, o Ca pode formar pontes “organo-metálicas” entre a matéria orgânica e coloides minerais no solo, sendo assim um agente importante para a dinâmica dessas duas frações (Muneer e Oades, 1989; Six et al., 2004).

Os resultados da ACP apresentam potencial de utilização na seleção de variáveis com capacidade de refletir efeitos do cultivo de diferentes espécies de forrageiras sobre a qualidade do solo. Além disso, os *loadings* gerados podem ser utilizados como base para a ponderação de cada indicador em modelos de avaliação da qualidade do solo.

A análise dos *loadings* entre as variáveis selecionadas e os componentes principais (Tabela 1) indica correlações positivas e negativas. Disto resulta que as variáveis que apresentam mesmo sinal em um ou mais componentes principais associam-se entre si e, por outro lado, variáveis que apresentam sinais opostos são antagônicas. Desta forma e considerando-se as características mais explicativas (*loadings* $\leq -0,65$ ou $\geq 0,65$), no CP1 (mais relevante) tem-se que as características químicas relacionadas ao C e ao Mg estão associadas entre si. No CP2, verificou-se que o Ca se associou com a Ds, mas foi antagônico em relação a Pmi (Tabela 1).

A associação observada entre as variáveis químicas orgânicas é reflexo da relação que existe entre elas. Neste sentido, as variáveis C_{mop} e C_{mam} compõem praticamente toda a matéria orgânica do solo. O C_{mop} (carbono da matéria orgânica particulada) é um carbono mais lábil, sensível ao manejo e que está presente principalmente em resíduos vegetais mais propensos à decomposição e ciclagem (Bayer et al., 2002). Entretanto, existem evidências de sua permanência no solo por longo prazo, tendo em vista a proteção contra a degradação quando alocadas no interior de microagregados, onde a difusão de O₂ e o acesso da microbiota são limitados (Elliott e Coleman, 1988; Six et al., 2004). Por sua vez, o C_{mam} (carbono da matéria orgânica associada aos minerais) é um carbono recalcitrante e que encontra-se em grau mais avançado de decomposição que o C_{mop} (Bayer et al., 2004). Essa fração desempenha importantes funções no solo, associadas às características químicas como poder tampão, como à capacidade de troca catiônica e complexação de metais, além de influenciarem do ponto de vista físico a agregação e a retenção de água no solo (Silva e Mendonça, 2007).

As associações observadas entre as frações da proteína relacionada à glomalina Gt e Gfe com as frações C_{mop} e C_{mam} são explicadas a partir de outros estudos que

indicam similaridade desses componentes quanto à composição, função e dinâmica de acúmulo no solo (Hontoria et al., 2009; Fokom et al., 2012; Saidi et al., 2015; Zhang et al., 2015; Ferrero et al., 2016; Singh et al., 2016). A proteína relacionada à glomalina tem sido utilizada como indicadora da ocorrência de importantes processos relacionados à qualidade do solo (Sousa et al., 2012; Sandeep et al., 2016; Vasconcellos et al., 2016; Bhattacharjya et al., 2017). A fração facilmente extraível é tida como mais responsiva ao manejo, pois representa uma porção liberada no solo em um período mais curto. Por outro lado, a fração total é mais estável no solo e apresenta maior recalcitrância (Wright et al., 1996). De modo geral, as duas frações dessa glicoproteína atuam como agentes cimentantes das partículas do solo, desempenhando importante papel na agregação. Adicionalmente a proteína relacionada à glomalina sinaliza a existência de um habitat viável ao desenvolvimento da microbiota edáfica, principalmente de fungos micorrízicos arbusculares.

Normalmente as relações entre as características Ds e Pmi ocorrem de duas maneiras no solo. Uma relação direta é frequentemente observada em função da transformação de macroporos em microporos com a compactação, com consequentes incrementos de Ds e Pmi. Outra relação é inversa, como observada no presente estudo, e associada com a redução da Ds a partir de incrementos na porosidade total do solo (Araújo et al., 2010; Schiavo e Colodro, 2012), que também inclui os microporos. Esse incremento de microporosidade no solo das forrageiras avaliadas também pode ser decorrente dos bioporos produzidos a partir das raízes finas das forrageiras.

Na análise de agrupamento hierárquico das forrageiras adotou-se o valor 10 para a distância euclidiana na divisão de grupos mais semelhantes (Figura 2). Desta forma, as forrageiras foram divididas em quatro grupos: Amendoim, Decumbens, Humidícola e Gordura (Grupo G1); Estilosantes, Ruzizinsis, Tifton e Mulato (Grupo G2); Mombaça e Colonião (Grupo G3); e Cameroom, Marandu, Xaraés, Massai, Mata, Tanzânia, Puerária e Andropogom (Grupo G4).

Os agrupamentos obtidos não seguiram tendência filogenética, ou seja, espécies diferentes de forrageiras apresentaram alta similaridade. Um exemplo é o caso das leguminosas, distribuídas em três diferentes grupos. A simples visualização da análise de agrupamento hierárquico não permitiu considerações que pudessem estabelecer razões ou critérios que definissem a distribuição das forrageiras em cada grupo, o que de certa forma foi melhor explicitado na análise univariada discutida a seguir.

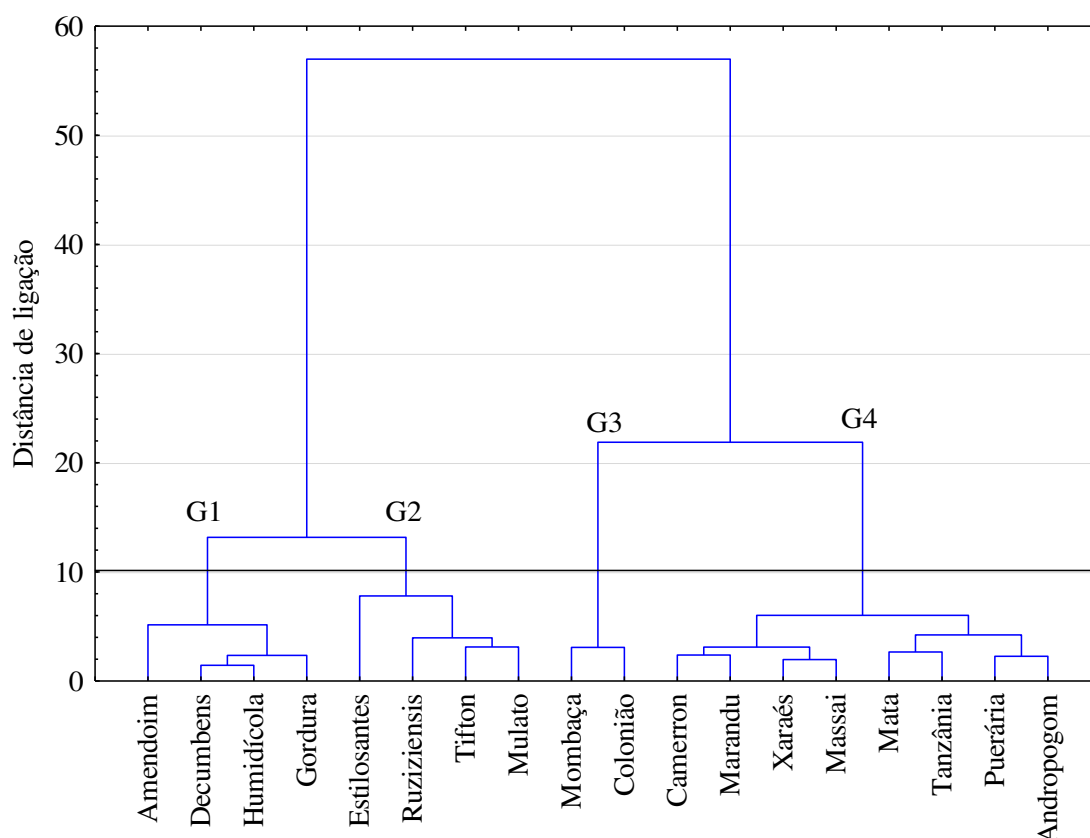


Figura 2 - Agrupamento hierárquico das forrageiras e Mata correspondentes ao cultivo de longo prazo de diferentes forrageiras a partir de características químicas orgânicas e inorgânicas e físicas.

Análise univariada

Os dados do teste de Scott-Knott revelam um destaque para as forrageiras Mombaça e Colônia (Tabela 2), que formam um dos grupos (G3) do agrupamento hierárquico (Figura 2). Para essas forrageiras foram verificados os maiores teores de proteína relacionada à glomalina total (Gt), que coincidentemente foi a variável de maior contribuição no modelo multivariado final obtido (Tabela 1). As duas forrageiras também apresentaram maiores teores da fração facilmente extraível (Gfe) e de matéria orgânica associada aos minerais (Cmam), características com a segunda e terceira maior contribuição para o mesmo modelo obtido. Essas duas variáveis aparentemente determinaram o grupo G4 do agrupamento hierárquico (Figura 2), uma vez que as forrageiras Cameron, Marandu, Xaraés, Massai, Tanzânia, Puerária, Andropogom, além da mata, foram as que se observou altos teores de Gfe e Cmam. Do exposto nota-se que, enquanto G3 foi determinado por forrageiras com maiores teores em Gt e o G4 foi composto por aquelas de maiores teores de Cmam e/ou Gfe. Este resultado sugere que as características químicas orgânicas, responsáveis por 54,86 % da informação do modelo

multivariado, foram decisivas para a formação destes dois grupos, que apresentam maior similaridade entre si do que com os demais.

Tabela 2 – Características físicas, químicas orgânicas e inorgânicas em solo cultivado com forrageiras por mais de dez anos e em Mata

Forrageiras	Cmop	Cmam	Gt	Gfe	Ca	Mg	Ds	Pmi
	(mg g solo ⁻¹)				(cmol _c dm ⁻³)		(g cm ⁻³)	(m ³ m ⁻³)
Andropogon ^{An}	3,8	19,2 a	49,8 b	18,7 a	2,5 c	0,7 b	1,20 b	0,31 b
Tanzânia ^{Pa}	5,4	20,5 a	47,4 b	18,7 a	3,3 b	1,1 a	1,24 a	0,30 b
Massai ^{Pa}	3,4	18,7 a	46,7 b	18,1 a	2,7 c	1,0 a	1,27 a	0,30 b
Mombaça ^{Pa}	5,1	21,3 a	54,1 a	21,4 a	2,5 c	1,0 a	1,24 a	0,33 a
Colonião ^{Pa}	6,0	20,2 a	56,7 a	20,6 a	2,8 c	1,3 a	1,19 b	0,33 a
Cameroon ^{Pa}	4,6	19,0 a	45,1 b	17,5 a	2,5 c	0,6 b	1,11 b	0,35 a
Tifton ^{Cy}	3,0	15,4 b	43,1 c	16,6 b	2,0 d	0,7 b	1,30 a	0,30 b
Marandu ^{Br}	4,6	19,4 a	47,2 b	16,6 b	2,0 d	0,7 b	1,26 a	0,34 a
Mulato ^{Br}	4,3	16,3 b	41,8 c	14,7 b	3,2 b	1,4 a	1,24 a	0,33 a
Xaraés ^{Br}	4,2	17,1 b	46,1 b	18,7 a	3,1 b	1,1 a	1,29 a	0,32 a
Humidícola ^{Br}	2,9	17,1 b	39,0 c	14,9 b	1,8 d	0,6 b	1,13 b	0,35 a
Ruziziensis ^{Br}	4,0	18,0 b	40,2 c	15,7 b	1,3 d	0,5 b	1,08 b	0,38 a
Decumbens ^{Br}	3,1	16,6 b	37,6 c	14,7 b	1,7 d	0,7 b	1,15 b	0,34 a
Gordura ^{Me}	1,5	16,9 b	37,6 c	13,7 c	1,9 d	0,9 a	1,27 a	0,31 b
Amendoim ^{Ar}	3,7	17,5 b	34,7 c	13,1 c	2,4 c	0,5 b	1,13 b	0,33 a
Puerária ^{Pu}	4,0	17,7 b	49,2 b	18,6 a	4,0 a	1,5 a	1,33 a	0,29 b
Estilosantes St	3,1	17,1 b	45,4 b	11,2 c	4,0 a	1,2 a	1,34 a	0,24 c
Mata	3,5	19,7 a	47,4 b	20,1 a	2,2 c	1,1 a	1,10 b	0,33 b
Média	3,9	18,2	45,0	16,9	2,5	0,9	1,22	0,32
CV (%)	33,0	6,0	10,3	11,1	18,1	25,4	5,60	8,78

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (p<0,05). Cmop: matéria orgânica particulada, Cmam: matéria orgânica associada aos minerais, Gt: proteína relacionada à glomalina total, Gfe: proteína relacionada à glomalina facilmente extraível, Ca: cálcio, Mg: magnésio; Ds: densidade do solo, Pmi: microporosidade.

Em forrageiras é conhecida a alta correlação entre a produção de massa e o teor de carbono acumulado no solo (Silva et al., 2004). A maior parte das forrageiras agrupadas nos grupos G3 e G4 apresentam em comum características como porte alto, raízes profundas e alta capacidade de produção de massa (Pereira et al., 2010), fatores que provavelmente foram decisivos no agrupamento mais próximo dessas espécies. Para se ter uma ideia do potencial dessas forrageiras, à alta produção de massa e de densidade

de raízes do capim Marandu é associada sua ampla utilização na agricultura brasileira em sistemas integrados de produção (Cunha et al., 2010). Da mesma forma, as forrageiras *Andropogom*, *Cameron* e *Colonião* podem atingir até 4 m de altura e produzir até 30 t ha⁻¹ ano⁻¹ (Fonseca et al., 2010; Pereira et al., 2010).

Os teores das frações de proteína relacionada à glomalina foram as variáveis de maior contribuição no modelo obtido e, a explicação para isto pode ser a associação que existe entre a produção dessas glicoproteínas e a produção de massa de forrageiras, como observada por Walley et al. (2014). Esses autores verificaram que plantas com maior acúmulo de carbono possuem maior capacidade de induzir a produção dessa glicoproteína em suas rizosferas.

As características físicas foram as que menos contribuíram com a variância do modelo obtido (Tabela 1). Os resultados do teste de Scott-Knott para estas características demonstraram que as forrageiras *Ruziziensis*, *Andropogom*, *Colonião*, *Amendoim*, *Humidícola*, *Cameron*, *Decumbens*, além da *Mata*, reduziram os valores de densidade do solo (10,65 % de contribuição) em relação às demais. Na avaliação da microporosidade (10,32 % de contribuição), as forrageiras *Ruziziensis*, *Colonião*, *Amendoim*, *Humidícola* e *Decumbens* juntamente com *Marandu*, *Mulato*, *Xaraés*, *Mombaça* e *Cameron* aumentaram o volume desse tipo de poros.

De maneira geral, as gramíneas são apontadas como boas estruturadoras do solo por terem sistemas radiculares vigorosos, profundos e com boa capacidade de aproximação de partículas (Oades, 1984). Exemplo deste potencial melhorador da estrutura do solo é a braquiária *Ruziziensis* (Brandão e Silva, 2012) e a cultivar *Brizantha*, esta última empregada no sistema “Barreirão” (Magalhães et al., 2001).

As características físicas selecionadas foram relacionadas com a formação do grupo G1 do agrupamento hierárquico (Figura 2). Das quatro forrageiras de G1, três (*Amendoim*, *Decumbens* e *Humidícola*) coincidiram com as de menor densidade do solo e maior microporosidade (Tabela 2).

As características químicas inorgânicas selecionadas contribuíram em parte para a constituição do Grupo G2 do agrupamento hierárquico (Figura 2), entretanto, com menos evidências que as químicas orgânicas para os grupos G3 e G4, e as físicas com G1. Apenas uma (*Estilosantes*), das quatro forrageiras do G2, apresentou destaque com maiores teores de Ca e Mg.

Na avaliação entre forrageiras na análise univariada, *Puerária* e *Estilosantes* proporcionaram maiores teores de Ca e Mg no solo. Leguminosas possuem grande capacidade de absorção e ciclagem de Ca (Andrew e Norris, 1961), o que é favorecido

pelo N proveniente da fixação biológica, nutriente que contribui para com a solubilização de Ca de reservatórios não trocáveis (Santos, 2016). Maiores teores de Mg também foram verificados nos solos das forrageiras Tanzânia, Massai, Mulato, Xaraés, Colômbio, Mombaça e Gordura.

Os maiores teores de Ca nos solos cultivados com leguminosas ajudam a explicar a relação direta entre esse elemento e a Ds observada no CP2. Essas plantas, em relação às demais gramíneas estudadas, apresentam sistema radicular menos volumoso, o que pode ter contribuído para a não redução dos valores de Ds. Isso indica que, embora o Ca seja um elemento capaz de influenciar a estrutura do solo, neste estudo essa característica aparentemente foi condicionada por outros fatores, como o volume de raízes e os teores de matéria orgânica.

Ao final das considerações acerca da análise dos resultados associados às características de diferentes naturezas (associados à matéria orgânica, químicos e físicos) nota-se, no geral, houve certo grau de associação entre os resultados do agrupamento hierárquico e da análise univariada efetuada.

Considerações finais

Diferenças entre os gêneros estudados em relação às características evolutivas e exigências nutricionais não foram identificadas nos resultados das análises químicas e pelo agrupamento hierárquico. Apenas para as leguminosas verificou-se maiores teores associados de Ca e Mg, resultado de certo modo esperado para essas plantas. As diferentes exigências de nutrientes e tolerância ao Al entre os gêneros mais exigentes (*Panicum*, *Penisetum*, *Cynodon* e *Andropogon*) e mais rústicos (*Brachiaria* e *Melinis*) aparentemente não influenciaram os padrões de ciclagem de nutrientes, uma vez que os grupos formados no agrupamento hierárquico e os resultados das características químicas avaliadas não indicaram qualquer tendência de maior eficiência de um grupo em relação a outro (Tabela 2 e Figura 1).

Os relatos na literatura sobre os efeitos benéficos das forrageiras sobre as características do solo são, de modo geral, generalistas e não apontam efeitos diferenciados em função das espécies. Essa generalização em parte ocorre pelo fato de essas plantas apresentarem boa produção de raízes e de parte aérea.

Entretanto, os resultados das análises multivariada e univariada obtidas no presente estudo indicam que as forrageiras apresentam potencial diferenciado de alteração nas propriedades do solo. Disto resulta que forrageiras podem ser selecionadas em função

de objetivos específicos almejados com sua utilização, visando melhorar essa ou aquela característica do solo.

A análise de componentes principais mostrou-se ferramenta útil para embasar a seleção de variáveis capazes de refletir os diferentes efeitos das forrageiras sobre o solo, o que permite dar subsídios para o estabelecimento de coeficientes de ponderação em modelos de qualidade do solo.

CONCLUSÕES

As características que mais discriminam os efeitos de forrageiras na qualidade do solo são os teores de proteína relacionada à glomalina total e de Ca trocável, e a densidade do solo.

As forrageiras apresentam diferentes potenciais de alteração da qualidade do solo, o que pode ser explorado em função de objetivos específicos quando da sua utilização. Enquanto o uso de capins Mombaça, Colonião, Cameron, Marandu, Xaraés, Massai, Tanzânia, Puerária e Andropogom são associados a melhorias dos teores de carbono orgânico no solo, as forrageiras Amendoim, Decumbens e Humidícola apresentam maior potencial para a recuperação física de solos. Por sua vez, o estilosante apresenta potencial de melhorias no status de nutrientes do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson T, Domsch K. The metabolic quotient for CO₂ (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol Biochem.* 1993;25:393–395.
- Andrew C, Norris D. Comparative responses to calcium of five tropical and four temperate pasture legume species. *Aust J Agric Res.* CSIRO PUBLISHING; 1961;12:40.
- Araujo FS, Cavalcante Salviano AA, Carvalho Leite LF, de Souza ZM, Mendes de Sousa AC. Physical Quality of a Yellow Latossol Under Integrated Crop-Livestock System. *Rev Bras Cienc Do Solo.* Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; 2010;34:717–723.
- Bayer C, Martin-Neto L, Mielniczuk J, Pavinato EA. Armazenamento de carbono em frações lábeis da matéria orgânica de um Latossolo Vermelho sob plantio direto. *Pesqui Agropecu Bras.* Embrapa Informação Tecnológica; 2004;39:677–683.
- Bayer C, Mielniczuk J, Martin-Neto L, Ernani PR. Stocks and humification degree of organic matter fractions as affected by no-tillage on a subtropical soil. *Plant Soil.* Kluwer Academic Publishers; 2002;238:133–140.
- Bhattacharjya S, Bhaduri D, Chauhan S, Chandra R, Raverkar KP, Pareek N. Comparative evaluation of three contrasting land use systems for soil carbon, microbial and biochemical indicators in North-Western Himalaya. *Ecol Eng.* 2017;103:21–30.

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. Academic Press; 1976;72:248–254.
- Brandão ED, Silva I de F da. Formação e estabilização de agregados pelo sistema radicular de braquiária em um Nitossolo Vermelho. *Ciência Rural*. Universidade Federal de Santa Maria; 2012;42:1193–1199.
- Cambardella CA, Elliott ET. Particulate soil organic-matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Sci Soc Am J*. Soil Science Society of America; 1992;56:777–783.
- Costa N de L, Magalhães JA, Townsend CR, Paulino VT. Fisiologia e manejo de plantas forrageiras. Doc 85, Embrapa Rondônia. 2004;27p.
- Costa NR, Andreotti M, Mascarenhas Lopes KS, Yokobatake KL, Ferreira JP, Pariz CM, Dos Batista Bonini CS, Longhini EVZ. Atributos do solo e acúmulo de carbono na integração lavoura-pecuária em sistema plantio direto. *Rev Bras Cienc do Solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; 2015;39:852–863.
- Cunha FF da, Ramos MM, Alencar CAB de, Martins CE, Cóser AC, Oliveira RA de. Sistema radicular de seis gramíneas irrigadas em diferentes adubações nitrogenadas e manejos. *Acta Sci Agron*. 2010;32:351–357.
- Defilippo BV, Ribeiro AC. Análise química do solo. 2º ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1997.
- Elliott ET, Coleman DC. Let the Soil Work for Us. *Ecol Bull*. Oikos Editorial Office; 1988;23–32.
- Embrapa. Manual de Métodos de Análise de Solo. 2 Revisada. Embrapa; 2011.
- Embrapa. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3º ed. Brasília; 2013.
- Ferrero EW, Mirta H, Gonzalez G, Giuffré L, Ciarlo E. Glomalins and Their Relationship with Soil Carbon. *Int J Appl Sci Technol*. 2016;6.
- Fokom R, Adamou S, Teugwa MC, Begoude Boyogueno AD, Nana WL, Ngonkeu MEL, Tchameni NS, Nwaga D, Tsala Ndzomo G, Amvam Zollo PH. Glomalin related soil protein, carbon, nitrogen and soil aggregate stability as affected by land use variation in the humid forest zone of south Cameroon. *Soil Tillage Res*. 2012;120:69–75.
- Fonseca DM, Martuscello JA. Plantas forrageiras. 1º ed. Viçosa: Ed. UFV; 2010.
- Fonseca DM, Martuscello JA, Santos MR, Faria DJG. Outras gramíneas forrageiras de importância econômica para pecuária brasileira. In: Fonseca DM, Martuscello JA, organizadores. *Plantas Forrageiras*. 1º ed Viçosa: Editora UFV; 2010. p. 220–248.
- Freddi OS, Ferraudo AS, Centurion JF. Análise multivariada na compactação de um latossolo vermelho cultivado com milho. *Rev Bras Cienc do Solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; 2008;32:953–961.
- Freitas L De, Casagrande JC, Oliveira IA de, Souza Júnior PR de, Campos MCC. Análises multivariadas de atributos químicos do solo para caracterização de ambientes. *Rev AGRO@MBIENTE ON-LINE*. 2014;8:155.
- Gerdemann JW, Nicolson TH. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc*. 1963;46:235–244.
- Hair JF, Anderson RE, Tatham RL. Análise multivariada de dados. 5º ed. Porto Alegre: Bookman; 2005.
- Hontoria C, Velásquez R, Benito M, Almorox J, Moliner A. Bradford-reactive soil proteins and aggregate stability under abandoned versus tilled olive groves in a semi-arid calcisol. *Soil Biol Biochem*. 2009;41:1583–1585.

- IBGE. Área Territorial Oficial 2015. Resolução Nº PR-02, de 21 de junho de 2016 [Internet]. Diário Of. da União. 2016. p. 87.
- Islam KR, Weil RR. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. *Biol Fertil Soils*. Springer-Verlag; 1998;27:408–416.
- Jenkins WR. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis Report*. 1964;48:692.
- Kaiser HF. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika*. Springer-Verlag; 1958;23:187–200.
- Magalhães R, Kliemann HJ, Oliveira IP. Evolução das propriedades físicas de solos submetidos ao manejo do sistema Barreirão. *Pesqui Agropecuária Trop*. 2001;31:7–13.
- Moraes MT, Debiasi H, Franchini JC, Silva RV. Benefícios das plantas de cobertura sobre as propriedades físicas do solo. In: Tiecher T, organizador. *Manejo e Conserv do solo e da água em pequenas propriedades rurais no sul do Bras práticas Altern manejo visando a Conserv do solo e da água*. 1º ed Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2016. p. 186.
- Muneer M, Oades JM. The Role of Ca-Organic Interactions in Soil Aggregate Stability. I. Laboratory Studies with ^{14}C -glucose, CaCO_3 and $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Aust J Soil Res*. 1989;27:389–399.
- Oades JM. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Biol Process Soil Fertil*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1984. p. 319–337.
- Pereira EBB, Pereira MB. Um critério para o descarte de variáveis na análise de componentes principais. *Rev Univ Rural*. 2004;23:1–7.
- Pereira A Vander, Auad AM, Léo FJS, Barbosa S. *Pennisetum purpureum*. In: Fonseca DM, Martuscello JA, organizadores. *Plantas Forrageiras*. 1º ed Viçosa: Editora UFV; 2010. p. 198–219.
- Saidi A, Farda Husin E, Rasyidin A, Eddiwal E, Ismon L IL. Effect of Arbuscular Mycorrhiza Fungi (AMF) and The Organic Material to The Glomalin Production and The Soil Physical Properties of Ultisols. *Int J Adv Sci Eng Inf Technol*. 2015;5:361.
- Sandeep S, Manjaiah KM, Pal S, Singh AK. Soil carbon fractions under maize–wheat system: effect of tillage and nutrient management. *Environ Monit Assess*. Springer International Publishing; 2016;188:14.
- Santos MA. Oxalato de cálcio e nitrogênio na mobilização de reservatórios de cálcio no solo pelo eucalipto [Internet]. Universidade Federal de Viçosa; 2016.
- Schiavo JA, Colodro G. Agregação e resistência à penetração de um Latossolo Vermelho sob sistema de integração lavoura-pecuária. 2012;71:406–412.
- Silva IR, Mendonça ES. Matéria orgânica do solo. In: Novais RF, Alvarez V. VH, Barros NF, Fontes RL, Cantarutti RB, Neves JCL, organizadores. *Fertil do Solo*. 1º ed Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; 2007. p. 275–374.
- Silva JE, Resck DVS, Corazza EJ, Vivaldi L. Carbon storage in clayey Oxisol cultivated pastures in the “cerrado” region, Brazil. *Agric Ecosyst Environ*. 2004;103:357–363.
- Singh AK, Rai A, Singh N. Effect of long term land use systems on fractions of glomalin and soil organic carbon in the Indo-Gangetic plain. *Geoderma*. 2016;277:41–50.
- Six J, Bossuyt H, Degryze S, Denef K. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Tillage Res*.

2004;79:7–31.

- Sousa S, Simões R, Menezes C, Valadares E, Barretto DS, Lima FDS. Glomalina : características , produção , limitações e contribuição nos solos. *Semin Ciências Agrárias*. 2012;33:3033–3044.
- Spera ST, Santos HP, Fontaneli RS, Tomm GO. Efeitos de sistemas de produção de grãos envolvendo pastagens sob plantio direto nos atributos físicos de solo e na produtividade. *Rev Bras Ciência do Solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; 2004;28:533–542.
- Stasoft. Statistica for Windows version 6.0 (Computer Program Manual). 2000.
- Tisdall JM, Oades JM. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J Soil Sci*. Blackwell Publishing Ltd; 1982;33:141–163.
- Toledo LO., Anjos LHC., Couto WH., Correia JR., Pereira MG., Correia MEF. Análise multivariada de atributos pedológicos e fitossociológicos aplicada na caracterização de ambientes de cerrado no norte de Minas Gerais [Internet]. *R. Árvore*. Sociedade de Investigações Florestais; 2009. p. 957–968.
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem*. 1987;19:703–707.
- Vasconcellos RLF, Bonfim JA, Baretta D, Cardoso EJBN. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Glomalin-Related Soil Protein as Potential Indicators of Soil Quality in a Recuperation Gradient of the Atlantic Forest in Brazil. *L Degrad Dev*. 2016;27:325–334.
- Walley FL, Gillespie AW, Adetona AB, Germida JJ, Farrell RE. Manipulation of rhizosphere organisms to enhance glomalin production and C sequestration: Pitfalls and promises. *Can J Plant Sci*. 2014;94:1025–1032.
- Wright SF, Franke-Snyder M, Morton JB, Upadhyaya A. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant Soil*. Kluwer Academic Publishers; 1996;181:193–203.
- Wright SF, Upadhyaya A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci*. 1996;61:575–586.
- Zhang J, Tang X, He X, Liu J. Glomalin-related soil protein responses to elevated CO₂ and nitrogen addition in a subtropical forest: Potential consequences for soil carbon accumulation. *Soil Biol Biochem*. 2015;83:142–149.

CAPÍTULO 2

DIFERENTES ESPÉCIES DE FORRAGEIRAS DETERMINAM A DIVERSIDADE DE FUNGOS NO SOLO?

CAPÍTULO 2: DIFERENTES ESPÉCIES DE FORRAGEIRAS DETERMINAM A DIVERSIDADE DE FUNGOS NO SOLO?

Resumo: As forrageiras estão entre as principais culturas utilizadas no Brasil. Caracterizadas pela sua rusticidade. Essas plantas prestam diversos serviços ambientais e interagem com vários fatores ecológicos do solo, dentre os quais destacam-se a microbiota fúngica. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar efeito de espécies de forrageiras cultivadas por longo prazo sobre a diversidade da microbiota fúngica do solo e identificar os grupos de fungos mais relevantes. Para isso, extraiu-se o DNA total de amostras de solo coletadas na profundidade de 0,0 – 0,15 m, que foi submetido ao sequenciamento de nova geração (Illumina MiSeq) para se avaliar a diversidade dos fungos. Os dados foram trabalhados em análises de bioinformática para melhorar a qualidade das sequências encontradas no sequenciamento e em redes neurais para identificar as principais relações entre os grupos de fungos e as forrageiras avaliadas. Não houve grande efeito das forrageiras quanto aos índices de diversidade, indicando que o manejo e não a espécie de forrageira, deve possuir maior influência sobre os grupos de fungos do solo. Ainda assim observou-se que as forrageiras abrigaram grupos de fungos com diferentes relevâncias. A estrutura da rede neural artificial permitiu identificar os grupos mais importantes associados a cada forrageira e indicou que os fungos mais interativos, ou seja, mais importantes dentre todos observados, pertencem a ordem Mortierellales e a família Nectriaceae. A análise dos grupos de fungos identificados mais relevantes indica que são majoritariamente saprófitos, embora alguns potencialmente patogênicos estejam presentes.

Palavras chave: Mortierellales, redes neurais artificiais, sequenciamento de DNA.

INTRODUÇÃO

As forrageiras estão entre as principais culturas utilizadas no Brasil. Em cultivo manejado, estas plantas ocupam cerca de 20% do território nacional (IBGE, 2007) e são as principais responsáveis pela expansão da pecuária brasileira. Majoritariamente de origem africana, o sucesso no cultivo dessas plantas está relacionado à sua rusticidade e boa adaptação às condições edafoclimáticas brasileiras. As forrageiras apresentam ainda bom desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular, características que as tornam prestadoras de diversos serviços ambientais relacionados à melhorias na estrutura, fixação de carbono e na ciclagem de nutrientes no solo (Liu et al., 2012; Russell e Bisinger, 2015).

Para a realização desses serviços ambientais é fundamental a existência de interações com grupos de microrganismos do solo, dentre os quais destacam-se os fungos. Frequentemente os fungos são apontados como promotores do crescimento vegetal devido ao papel que desempenham no solo, em especial na degradação da matéria orgânica, ciclagem e solubilização de nutrientes, agregação do solo e controle de patógenos (Tedersoo et al., 2014). O sucesso na realização dessas funções estão, muitas das vezes, diretamente relacionadas à diversidade desses microrganismos no solo (Maherali e Klironomos, 2007) que, por sua vez, é afetada principalmente pelas espécies de plantas e pelo manejo adotado no solo (Philippot et al., 2013; Prober et al., 2015).

O aprimoramento das análises de sequenciamento de DNA tem se mostrado uma ferramenta cada vez mais útil em trabalhos objetivando avaliar a diversidade da microbiota, uma vez que fornece informações quantitativas e qualitativas detalhadas a respeito dos grupos de microrganismos presentes no solo (Oja 2014).

Os dados produzidos nas análises de sequenciamento de DNA exigem um processamento aprimorado, que é fundamental para a compreensão dos resultados obtidos. Neste sentido, o uso de técnicas computacionais avançadas, como as redes neurais, apresenta-se como alternativa inovadora de grande potencial para a identificação das relações existentes entre os grupos de microrganismos e os ambientes estudados. Redes Neurais Artificiais (Artificial Neura Network – ANN) representam o que há de mais atual no tratamento de dados em análises de bioinformática (Silva, 2013). Esta tecnologia consiste de análises de “aprendizado de máquina” (inteligência artificial), processo no qual uma rede de correlação de alta fidelidade e sensibilidade é montada utilizando-se um algoritmo e uma matriz de entrada de dados, na qual as características analisadas receberam diferentes pesos em função de sua importância.

Este trabalho parte da hipótese que o cultivo de diferentes espécies de forrageiras sob mesmo manejo, condicionam a diversidade de fungos do solo. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar se o cultivo por longo prazo de diferentes espécies de forrageiras sob mesmo manejo determina a diversidade da microbiota fúngica do solo, buscando evidenciar os possíveis grupos de fungos mais relevantes.

MATERIAL E MÉTODOS

A área experimental pertence ao setor de Agrostologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil, estando localizada nas coordenadas 20° 46' 26'' S e 42° 51' 30'' O. O clima da região é do tipo Cwa subtropical,

segundo a classificação de Köppen, e o solo é um Argissolo Amarelo Distrófico (Embrapa, 2013).

A diversidade de fungos foi avaliada em solo cultivado e sem pastejo por um período superior a dez anos com 17 espécies de forrageiras. As espécies de forrageiras possuíam diferentes características quanto a exigência nutricional, hábito de crescimento e rusticidade. Todas as plantas foram cultivadas em parcelas individuais de 16 m² e dispostas em delineamento inteiramente casualizados. Embora fossem avaliadas de forma individual, espécies podem ser divididas em três grupos de acordo com suas características. O primeiro grupo é composto por plantas com maior exigência nutricional compreendendo as espécies e híbrido: *Andropogom gayanus* (Andropogon); *Panicum maximum* (variedades Tanzânia, Massai e Mombaça); *Cynodon dactylon* (Tifton); *Pennisetum purpureum* (Cameroon) e um híbrido de seu cruzamento com *Pennisetum americanum* (Colonião). O segundo grupo é composto por plantas mais tolerantes à acidez e à baixa fertilidade do solo, sendo, portanto, mais rústicas. Esse grupo é composto pelos capins *Brachiaria brizantha* (cultivares Marandu e Xaraés); *Brachiaria decumbens* na parcela (Decumbens) e também avaliado sob condições de pastoreio (D. pastoreado); *Brachiaria ruzizienses* (Ruzizienses), um cruzamento entre as duas últimas espécies (Mulato); *Brachiaria humidicola* (Humidícola) e *Melinis minutiflora* (Gordura). Por fim, o terceiro grupo foi composto por forrageiras leguminosas: *Arachis pintoi* (Amendoim Forrageiro); *Pueraria phaseoloides* (Puerária) e *Stylosanthes guianensis* (Estilosantes). Uma área de mata secundária adjacente ao experimento também foi avaliada como referência.

A exceção da *B. decumbens* em pastoreio e da área de Mata, o manejo das forrageiras durante o período de cultivo consistiu de adubações (18, 62 e 35 kg ha ano⁻¹ de N, P e K respectivamente) e podas anuais com retirada de parte dos resíduos para simular o pastejo. Três amostras de solo foram coletadas em cada parcela na profundidade de 0,0-0,15 m, sendo imediatamente colocadas em sacos plásticos esterilizados e resfriadas até a extração do DNA total do solo, realizada até 24 horas após as coletas em campo. Sub amostras de 250 mg de solo foram submetidos à extração do DNA com o kit Power Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), seguindo-se as instruções do fabricante. Durante a extração e na etapa do processo de lise celular para a liberação do DNA utilizou-se o equipamento Precellys® 24, no qual as amostras foram submetidas à agitação por 2 min, em ciclos com velocidade de 5500 rpm durante 20 s, alternados com agitação lenta durante 5 s. O DNA extraído foi quantificado por espectrometria com uso do equipamento NanoDrop 2000c e, posteriormente liofilizado.

O sequenciamento de nova geração (New Generation Sequencing) foi realizado com o uso da plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc.). A região ITS1 foi amplificada por PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando-se os *primers* ITS1F *forward* e ITS2 *reverse*, com adaptações específicas para a plataforma Illumina, como proposto por Smith e Peay (2014).

As análises de bioinformática dos dados do sequenciamento de DNA foram realizadas seguindo-se os procedimentos descritos no protocolo do Projeto do Microbioma Brasileiro (Pylro et al., 2014), utilizando-se o software Quantitative Insights Into Microbial Ecology - QIIME 1.8.0 (Caporaso et al., 2010; Bokulich et al., 2012). Inicialmente as sequências foram agrupadas no QIIME (Join) e avaliadas quanto à sua qualidade com uso do software FastQC (Andrews Simon, 2015), sendo removidas as sequências de baixa qualidade que, neste estudo, foram consideradas aquelas de comprimento menor que 250 pares de base e com qualidade menor que 25 na escala Phred. No passo seguinte foram eliminados trechos das sequências com códigos não relativos aos fungos (quimeras) e, por fim, as sequências remanescentes foram agrupadas em OTUs (operational taxonomic units) (Edgar, 2013) e identificadas em grupos taxonômicos (similaridade $\geq 97\%$) utilizando-se o banco de dados UNITE (Kõljalg et al., 2013) disponível no software QIIME. Seguidamente foram gerados índices de dissimilaridade de Bray-Curtis e curvas de rarefação utilizando scripts no próprio software QIIME. Os índices de diversidade de Simpson e Shannon foram calculados no software Past versão 3.0 (Hammer et al., 2009). Posteriormente os índices foram comparados pelo teste de Bonferroni ($p \leq 0,05$) utilizando o software Statistica® (Stasoft, 2000). Este teste foi escolhido pois desconsidera a distribuição normal dos resíduos, uma vez que essa premissa é previamente atendida na geração dos índices.

Os dados oriundos do processamento foram também submetidos à análise UniFrac para a ponderação da importância de cada grupo de fungos (família) associado ao solo de cada forrageira. Essa análise utiliza informações filogenéticas para comparar amostras ambientais. A informação é gerada levando-se em consideração a ocorrência de cada grupo em relação aos demais em todo o conjunto de dados, sendo então expressa em um valor de peso de cada grupo em cada amostra.

Uma vez discriminada a importância de cada grupo associado a cada forrageira torna-se possível que os dados taxonômicos possam ser trabalhados com o uso de redes neurais artificiais (Artificial Neural Network – ANN). Essa ferramenta matemática permite observar na forma de grafos e a partir de conexões estabelecidas com base nos pesos relativos de cada grupo de microrganismo em cada amostra (dados obtidos na

análise taxonômica), as relações existentes entre os fatores estudados (amostras de solo de cada forrageira e microrganismos observados). Para a construção da rede foi criada uma matriz contendo os dados da análise UniFrac considerando-se o nível taxonômico de família. A estrutura da rede foi formada por pontos que representam as amostras e os grupos de fungos encontrados, e por linhas que conectam estes pontos e representam os pesos taxonômicos relativos de cada grupo em cada amostra. Deste modo, linhas mais espessas simbolizam pesos maiores e linhas mais finas, pesos menores. Logo, pontos ligados por linhas espessas representam relações fortes, ao passo que pontos ligados por linhas finas representam relações fracas. Para a construção da ANN foi utilizado o software Gephi versão 0.9.1 (Bastian et al., 2009).

Para expressar a importância de cada grupo de fungo identificado foi proposto o índice de relevância taxonômica (IRT), uma vez que os dados utilizados na construção da estrutura da ANN apresentam o peso de cada grupo de fungo em cada amostra. O cálculo desse índice é explicitado, para cada família e forrageira, conforme as equações 1 e 2:

$$IRT_f = \frac{\sum(f)}{\sum(T)} \cdot 100 \quad (1),$$

onde: IRT_f : índice de relevância taxonômica do grupo de fungo considerado; $\sum(f)$: somatório dos pesos do respectivo grupo de fungo em todas amostras e $\sum(T)$: somatório dos pesos de todos os grupos de fungos em todas as amostras. Este índice informa a importância (peso) que cada grupo acumulou em relação aos demais grupos observados em todas as amostras, ou seja, quanto cada grupo de fungo foi relevante em relação aos demais; e

$$IRT_t = \frac{\sum(t)}{\sum(T)} \cdot 100 \quad (2),$$

onde: IRT_t : índice de relevância taxonômica da forrageira considerada; $\sum(t)$: somatório dos pesos de todos grupos de fungos no solo da respectiva forrageira e $\sum(T)$: somatório dos pesos de todos os grupos de fungos nas amostras de solos de todas as forrageiras. Esse índice informa a importância (peso) que os fungos associados a cada forrageira acumularam em relação às demais forrageiras e mata, ou seja, quanto os grupos de cada forrageira foram relevantes em relação aos demais. Uma vez que os dados de ambos os índices são valores relativos, os resultados foram expressos em porcentagem para facilitar sua compreensão.

RESULTADOS

Taxonomia

A análise taxonômica não identificou 44% das OTUs presentes, por não apresentarem similaridade mínima de 97% com os códigos armazenados no banco de dados UNITE. Tais microrganismos não foram ainda descritos ou possuem código genético ainda não presente no referido banco de dados.

Dentre as OTUs identificadas, o filo Ascomycota foi o mais abundante (23%), seguido dos filios Zygomycota (18%) e Basidiomycota (8%) (Figura 1). Também se verificaram OTUs que não apresentaram identidade com algum filo, sendo neste caso, identificadas apenas como do Reino Fungi (5,1%), e também OTUs com assinaturas ambíguas, ou seja, com sequências muito similares e que não permitiram a discriminação do filo (1,1%).

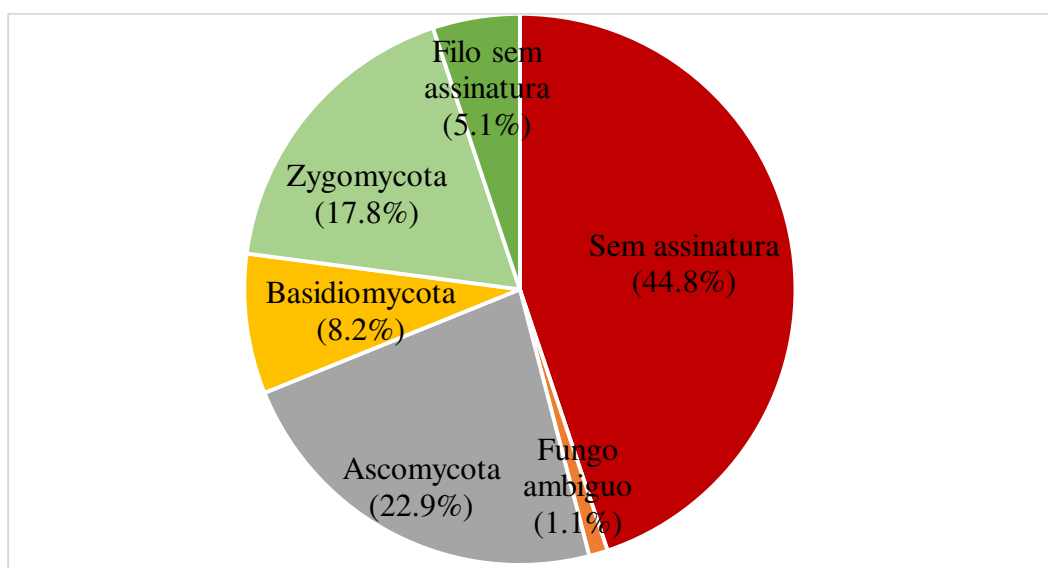


Figura 1 – Abundância dos grupos taxonômicos de fungos encontrados em solos cultivados com 17 espécies de forrageira e mata.

Considerando somente os grupos de fungos identificados, o sequenciamento de DNA gerou o total de 983.847 OTUs de alta qualidade (identidade mínima de 97%, 250 pb e 25 na escala Phred). A maior quantidade de OTUs por forrageira foi observada no capim Colonião (68.503) e, a menor, na braquiária Decumbens (35.400) (Tabela 1). As curvas de rarefação pelo índice de diversidade de Chao 1 indicam que a amostragem realizada foi satisfatória para estimar a diversidade de fungos nas amostras de solo (Figura 2). Este resultado foi confirmado pela formação de um platô nas curvas e pela análise de

variância da regressão realizada com os quatro últimos pontos das curvas, quando o coeficiente angular foi estatisticamente igual a zero ($\beta_1 = 0$, $p \geq 0,05$).

Tabela 1 – Descrição das unidades taxonômicas operacionais (Operational Taxonomic Unit – OTUs) e índices de diversidade de fungos observados em solos cultivados por mais de uma década com 17 forrageiras e em mata

Forrageiras	Número de OTUs ⁽¹⁾		Simpson 1-D ⁽³⁾		Shannon H ⁽⁴⁾	
	Média	DP ⁽²⁾				
Andropogom ^{An}	13931	2806	0,81	ab	2,49	a
Tanzânia ^{Pa}	17147	4231	0,56	ab	1,69	ab
Massai ^{Pa}	19398	2916	0,63	ab	1,66	ab
Mombaça ^{Pa}	20497	7749	0,62	ab	1,70	ab
Colonião ^{Pe}	22834	8025	0,63	ab	1,63	ab
Cameroon ^{Pe}	19938	10023	0,40	b	1,13	b
Tifton ^{Cy}	15955	2263	0,81	ab	2,38	ab
Marandu ^{Br}	16683	9890	0,68	ab	1,78	ab
Mulato ^{Br}	21136	9365	0,56	ab	1,50	ab
Xaraés ^{Br}	16080	7758	0,78	ab	2,18	ab
Humidícola ^{Br}	15344	6383	0,45	ab	1,31	ab
Ruziensis ^{Br}	17096	4658	0,67	ab	2,00	ab
Decumbens ^{Br}	11800	2925	0,81	ab	2,37	ab
D. Pastoreado ^{Br}	18152	4215	0,74	ab	2,26	ab
Gordura ^{Me}	14216	4090	0,80	ab	2,44	a
Amendoim ^{Ar}	14241	1032	0,78	ab	2,13	ab
Puerária ^{Pu}	18652	7592	0,78	ab	2,12	ab
Estilosantes St	16438	4285	0,84	a	2,42	ab
Mata	18412	2767	0,73	ab	1,91	ab
Total	983.847					

⁽¹⁾ número de OTUs de alta qualidade. ⁽²⁾desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Bonferroni ao nível de 5% de significância. ⁽³⁾Simpson 1-D: índice de diversidade de Simpson, que expressa a diversidade pela probabilidade de dois indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencerem à mesma espécie. Índice que prioriza espécies mais raras. Valores próximos a 1,0 indicam maior diversidade. ⁽⁴⁾Shannon H: índice de diversidade de Shannon, que expressa a diversidade considerando a riqueza e equitabilidade de espécies. Valores mais altos indicam maior diversidade. ^{Pa} gênero Panicum; ^{Pe} gênero Penisetum; ^{Cy} gênero Cynodon; ^{Br} gênero Brachiaria; ^{Me} gênero Melinis; ^{Ar} gênero Arachis; ^{Pu} gênero Puerária e St gênero Stilosantes.

Não houve grandes variações nos índices de diversidade de fungos do solo nas diferentes espécies de forrageiras avaliadas. Considerando-se o índice de Simpson, que prioriza espécies mais raras, foram observadas diferenças somente entre a forrageira Estilosantes ($0,84 \pm 0,02$), de maior diversidade de fungos, e o capim Cameroon ($0,40 \pm$

0,31), de menor diversidade (Tabela 1). Por sua vez, com o índice de Shannon, as diferenças foram entre as forrageiras Gordura ($2,44 \pm 0,29$) e Andropogon ($2,49 \pm 0,14$), com maior diversidade, e novamente o capim Cameroon ($1,13 \pm 0,78$), com menor diversidade.

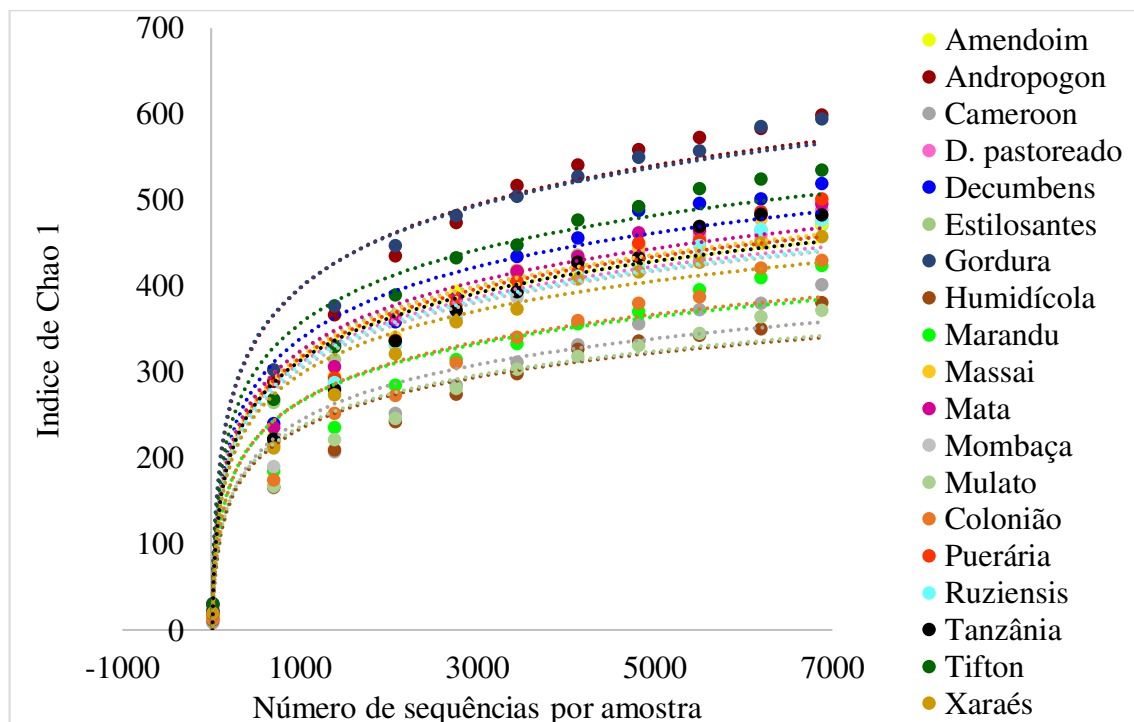


Figura 2 – Curvas de rarefação pelo índice de Chao 1 para grupos de fungos do solo, com análise de variância da regressão para $\beta I = 0$ ($p \geq 0,05$) nos últimos quatro pontos da curva, objetivando indicar se a amostragem foi satisfatória.

Índice de Relevância Taxonômica

A análise taxonômica nos solos das 17 forrageiras e Mata indicou a ocorrência de 48 famílias de fungos, das quais 20 não tiveram assinaturas correspondentes a este nível taxonômico, sendo então identificadas em níveis superiores. Para esses 20 grupos procurou-se identificar o nível taxonômico segundo os seguintes códigos: k = reino, p = filo, o = ordem, c = classe e f = família. Desta forma, por exemplo, o grupo o_Mortierellales representa uma família de fungos não identificada, mas pertencente a ordem (o) dos Mortierellales. Houve também grupos com posição taxonômica incerta, a esses foram adicionadas as letras ^{IS} (sinônimo de incertae sedis) após o nome (p.e. f_Agaricomycetes^{IS}, família pertencente à classe do Agaricomycetes mas com posição taxonômica indefinida).

Os valores do Índice de Relevância Taxonômica (IRT_t) permitiram o ranqueamento das forrageiras, em função da maior ou menor presença de grupamentos de fungos mais relevantes (Figura 3). A classificação das forrageiras segundo este critério indicou melhor desempenho associado com as leguminosas Estilosantes (7,0%) e Amendoim forrageiro (6,7%) que, juntamente a Mata (6,9%) apresentaram os três maiores IRT_t . Por outro lado, os capins de menor índice de relevância taxonômica foram Tanzânia (3,3%), Cameroon (2,5%) e Humidicola (2,4%).

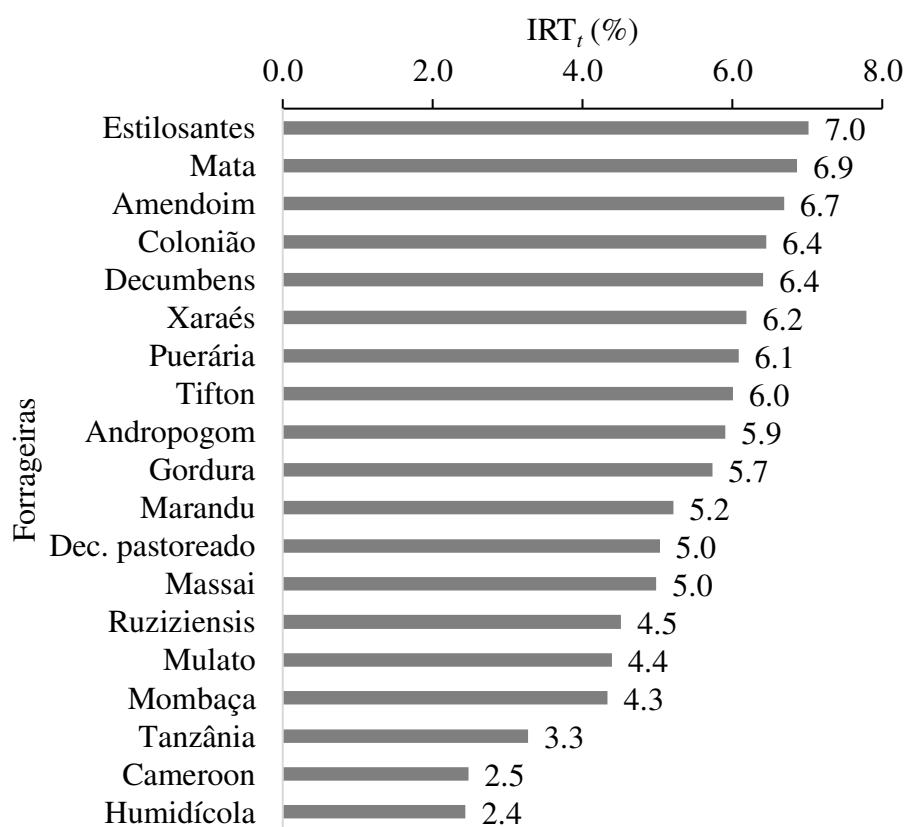


Figura 3 – Ranqueamento das forrageiras com base nos valores de IRT_t (índice de relevância taxonômica para forrageiras) dos grupos de fungos observados em cada forrageira e Mata.

O ranqueamento realizado pelo ITR_t aparentemente não foi influenciado pelas características de rusticidade das forrageiras, exceto em relação às leguminosas, uma vez que tratamentos com diferentes exigências nutricionais apresentaram grupos de fungos com importância relativa similares, como foi o caso das forrageiras Decumbens e Colonião com elevados valores de ITR_t , e Cameroon e Humidicola com os menores valores de ITR_t .

A relevância dos grupos de fungos identificados também foi avaliada a partir dos valores de Índice de Relevância Taxonômica (IRT_f). Em função do elevado número de famílias de fungos identificado, optou-se por apresentar apenas os com $IRT_f > 1,0 \%$ (Figura 4). Com esse critério, as famílias mais relevantes observados nas amostras de solo das 17 diferentes forrageiras e Mata avaliados foram o_Mortierellales (16,4%) e f_Mortierellaceae (15,3%), e as de menor relevância a c_Mortierellomycotina^{IS} (1,0%) e f_Sporormiaceae (1,0%). Outros grupos com $IRT_f < 1,0\%$ foram identificados como Outros, cujo grupo apresentou IRT_f de 11,9%.

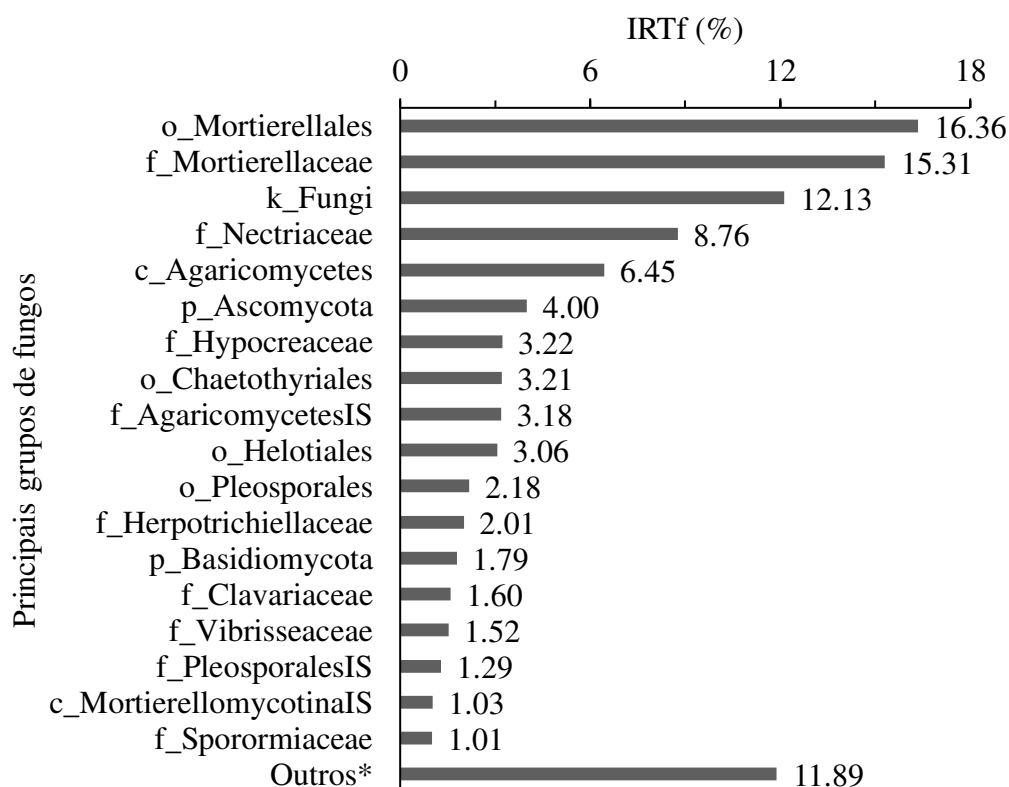


Figura 4 – Ranqueamento das forrageiras com base nos valores de IRT_f dos principais grupos de fungos observados nas forrageiras e Mata avaliadas.

*inclui: f_Pleosporaceae, c_Sordariomycetes, f_Trichocomaceae, f_Bionectriaceae, f_Chaetosphaeriaceae, f_Hydodontaceae, f_Dipodascaceae, c_Dothideomycetes, f_Montagnulaceae, f_Leotiomyces^{IS}, c_Eurotiomycetes, f_Clavicipitaceae, f_Annulatascaceae, o_Capnodiales, o_Auriculariales, f_Xylariaceae, c_Leotiomyces, o_Onygenales, f_Magnaporthaceae, f_Helotiales^{IS}, f_Ganodermataceae, f_Didymosphaeriaceae, f_Mycosphaerellaceae, o_Sordariales, f_Orbiliaceae, f_Thelephoraceae, o_Xylariales e o_Agaricales.

Rede Neural Artificial

Na análise visual da estrutura da rede neural artificial (Artificial Neural Network - ANN), os fatores (grupos de microrganismos e forrageiras) mais centralizados tem maior grau de importância uma vez que apresentam maior interação com os demais (maior número de conexões) (Figura 5). Como neste estudo um grande número de famílias de fungos foi identificado e muitas forrageiras foram estudadas, a arquitetura da rede resultante foi formada por um número elevado de conexões. Por esse motivo, na discussão dos resultados optou-se por abordar apenas as mais relevantes, ou seja, as representadas por linhas mais espessas.

Os principais grupos de fungos observados na estrutura da rede, ou seja, que apresentaram pelo menos uma conexão de maior relevância foram: o_Mortierellales, f_Mortierellaceae, k_Fungi, f_Nectriaceae, c_Agaricomycetes, p_Ascomycota, f_Clavariaceae, f_Agaricomycetes^{IS}, o_Chaetothyriales, o_Helotiales, f_Herpotrichiellaceae, f_Pleosporales^{IS}, c_Mortierellomycotina^{IS}, p_Basidiomycota e o_Pleosporales (Figura 5, Tabela 2).

Na estrutura da rede neural obtida observou-se tendência de separação das forrageiras. Espécies de forrageiras consideradas mais exigentes e leguminosas, foram alocadas na parte inferior, enquanto que espécies mais rústicas foram posicionadas na parte central e superior da rede neural. A Tabela 2 apresenta um resumo das principais conexões verificadas na ANN. À maioria das forrageiras foram associados três ou quatro grupos de fungos mais importantes. Por outro lado, quando analisado em quais forrageiras esses grupos foram mais relevantes, observa-se que algumas delas foram generalistas, ou seja, estão presentes e são importantes para várias forrageiras. Este é o caso, por exemplo, dos fungos da ordem Mortierellales e da família Nectriaceae, que foram relevantes para 13 e nove diferentes forrageiras respectivamente. Outras famílias de fungos foram mais específicas e relevantes em poucas forrageiras, como é o caso dos grupos p_Basidiomycota, c_Mortierellomycotina^{IS}, f_Clavariaceae, f_Herpotrichiellaceae, o_Helotiales e o_Pleosporales, que apresentaram relevância para apenas uma forrageira (Tabela 2).

A análise taxonômica indicou quais os gêneros mais abundantes em algumas famílias de fungos. Estes gêneros obtidos foram apresentados apenas para as famílias de fungos mais relevantes (Tabela 2), destacando-se o gênero *Fusarium* na família Nectriaceae, o *Mortierella* na família Mortierellaceae, o *Pyrenochaeta* na família Pleosporales e o *Clavinópsis* na família Claviraceae.

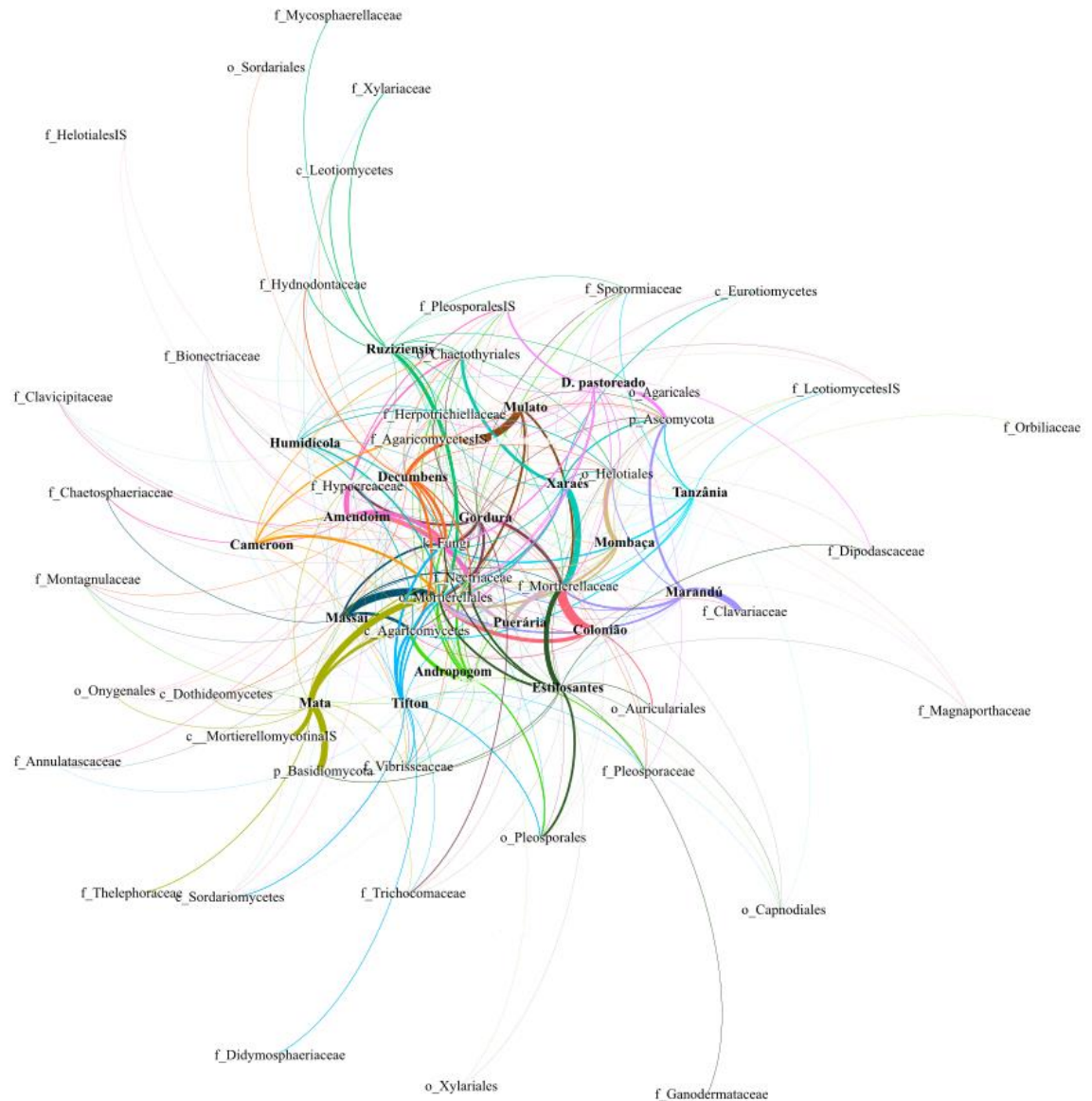


Figura 5 – Rede Neural Artificial com famílias de fungos do solo observadas em amostras de solo de 17 forrageiras e Mata. As forrageiras, Mata e famílias de fungos são representadas por pontos. O grau de importância (peso pela análise UniFrac) das relações entre os pontos é representado pela espessura das linhas que os conectam. Linhas mais espessas representam relações mais relevantes e menos espessas, menos relevantes.

Tabela 2 – Principais grupos de fungos observados em diferentes espécies de forrageiras cultivadas e Mata

Forrageira/Mata	Grupo de fungos mais relevantes	Famílias de fungos de ocorrência relevante		
		Grupo de fungos*	Gênero mais abundante	Forrageiras
Andropogom ^{An}	c_Agaricomycetes	o_Mortierellales	Não identificado	Andropogom
	f_Nectriaceae			Massai
	o_Mortierellales			Marandu
Tanzânia ^{Pa}	c_Agaricomycetes			Colonião
	k_Fungi			Mombaça
	p_Ascomycota			Ruziziensis
Massai ^{Pa}	k_Fungi			Humidícola
	c_Agaricomycetes			Cameroon
	o_Mortierellales			Decumbens
Mombaça ^{Pa}	f_Mortierellaceae			Tifton
	o_Helotiales			Mata
	o_Mortierellales			Puerária
Colonião ^{Pe}	f_Mortierellaceae			Estilosantes
	o_Mortierellales	f_Nectriaceae	Fusarium	Andropogon
Cameroon ^{Pe}	f_Agaricomycetes ^{IS}			Mulato
	o_Chaetothyriales			Gordura
	o_Mortierellales			Amendoim
Tifton ^{Cy}	c_Agaricomycetes			Decumbens
	f_Nectriaceae			D. Pastoreado
	k_Fungi			Tifton
Marandu ^{Br}	o_Mortierellales			Puerária
	f_Clavariaceae			Estilosantes
	f_Mortierellaceae	k_Fungi	Não identificado	Tanzânia
Mulato ^{Br}	o_Mortierellales			Massai
	p_Ascomycota			Gordura
	f_Agaricomycetes ^{IS}			Amendoim
Xaraés ^{Br}	f_Mortierellaceae			Humidícola
	o_Chaetothyriales			Decumbens
	p_Ascomycota			D. Pastoreado
Humidícola ^{Br}	c_Agaricomycetes			Tifton
	k_Fungi			Puerária
	o_Mortierellales	f_Mortierellaceae	Mortierella	Marandu
Ruziziensis ^{Br}	o_Mortierellales			Mulato
	f_Agaricomycetes ^{IS}			Xaraés
Decumbens ^{Br}	f_Nectriaceae			Colonião
	k_Fungi			Mombaça
	o_Mortierellales			Gordura
D. Pastoreado ^{Br}	f_Nectriaceae			Puerária
	f_Pleosporales ^{IS}			Estilosantes
	k_Fungi	c_Agaricomycetes	Não identificado	Humidícola
Gordura ^{Me}	p_Ascomycota			Tifton
	k_Fungi			Mata
	f_Nectriaceae			Andropogon
Amendoim ^{Ar}	f_Mortierellaceae			Tanzânia
	f_Pleosporales ^{IS}			Massai
	k_Fungi			Marandu
Puerária ^{Pu}	f_Mortierellaceae			Xaraés
	f_Nectriaceae	f_Agaricomycetes ^{IS}	Resinicium	D. Pastoreado
	o_Mortierellales			Mulato
Estilosantes St	f_Mortierellaceae			Cameroon
	f_Nectriaceae			Decumbens
	o_Mortierellales			Amendoim
Mata	o_Pleosporales			D. Pastoreado
	c_Agaricomycetes			Xaraés
	c_Mortierellomycotina ^{IS}			Cameroon
	o_Mortierellales	p_Ascomycota	Não identificado	Mata
	p_Basidiomycota			Marandu
	f_Clavariaceae			Gordura
	f_Herpotrichiellaceae			Mombaça
	o_Helotiales			Estilosantes
	o_Pleosporales			

DISCUSSÃO

Diversidade de Fungos

Parte expressiva das OTUs encontradas nas amostras no sequenciamento do DNA não foram identificadas. Este é um resultado frequentemente observado para amostras de solo, uma vez que boa parte dos microrganismos do solo ainda não está depositado no banco utilizado (Oja et al., 2015). Por outro lado, cerca de 50% das OTUs foram identificadas e o filo Ascomycota foi o que apresentou maior abundância. Este filo é frequentemente referenciado na literatura como o mais abundante no solo, seguido pelo filo Basidiomycota (Lim et al., 2010; Soares, 2015; Wang et al., 2017), que neste estudo foi superado pelo Zigomycota, ficando como o terceiro mais presente nas amostras avaliadas.

As diferentes forrageiras cultivadas por mais de uma década não proporcionaram grande diferenciação nos índices de diversidade avaliados. Considerando-se o índice de Simpson que valoriza espécies mais raras, diferenças foram apenas verificadas entre a maior diversidade na forrageira Estilosantes e menor no capim Cameroon. Em relação ao índice de Shannon, diferenças foram registradas entre a maior diversidade nos capins Andropogom e Gordura em comparação com a menor no capim Cameroon.

A maior diversidade no Estilosantes em um dos índices pode ser relacionada com a qualidade dos seus resíduos, que se espera ser mais acessível a uma ampla gama de espécies de fungos, muito embora tal efeito não tenha sido verificado nas leguminosas Puerária e Amendoim forrageiro. Por sua vez, tanto o Estilosantes quanto o capim Gordura, este de maior diversidade no segundo índice, são plantas secretoras de óleos (Prates et al., 1993), o que permite inferir que tal característica possa favorecer a diversidade dos fungos do solo. Isto decorre da percepção de que a presença de um substrato diferenciado pode oferecer condições para o desenvolvimento de maior número de espécies, embora na literatura não tenha se encontrado trabalhos relacionando o efeito dessas secreções sobre a diversidade ou qualquer outra característica dos solos. No caso do Andropogom, foram encontradas algumas poucas referências sobre seu efeito na diversidade fúngica do solo. Alguns dados indicam que, em consórcio com leguminosas, essa forrageira foi mais eficiente em elevar a riqueza de espécies de fungos micorrízicos arbusculares do que em cultivo solteiro (Miranda et al., 2010), entretanto, neste trabalho foram avaliadas apenas micorrizas arbusculares e se utilizou de técnicas mais tradicionais de avaliação da diversidade.

Em ambos os índices de diversidade avaliados, o solo cultivado com capim Cameroon foi o de menor diversidade de fungos. Este resultado pode estar associado à alta relação C:N dos resíduos dessa planta decorrente do seu rápido crescimento. Como o manejo de simulação do pastejo era efetuado ao mesmo tempo em todas as forrageiras, quando esta prática era realizada, cortava o capim Cameroon mais desenvolvido e, portanto, com material mais rico em carbono.

As demais forrageiras não apresentaram diferenças quanto aos índices de diversidade avaliados, indicando que, após um período considerável de cultivo, essas espécies proporcionam níveis similares de diversidade. Este resultado diverge da hipótese inicial deste estudo, pois esperava-se que forrageiras com diferentes hábitos de crescimento e exigências nutricionais apresentassem, após período prolongado de cultivo, variações nos níveis de biodiversidade fúngica no solo. Também divergem de outros estudos que apontam efeito preponderante das plantas sobre a diversidade de fungos do solo, como o caso de trabalhos que indicam que solos cultivados com leguminosas apresentam diversidade de fungos superior à cultivados com outras plantas (Tedersoo et al., 2016; Zuo et al., 2016; Yang et al., 2017). Por outro lado, essa homogeneidade pode ser percebida positivamente, uma vez que não se verificou diferenças entre as forrageiras e a Mata. Também deve ser considerado que o período relativamente longo de cultivo das forrageiras pode ter sido suficiente para que a diversidade de fungos do solo atingisse um limite, estabilizando-se em um patamar e, desta forma, reduzindo as diferenças entre as forrageiras. Essa tendência de estabilização da diversidade ao longo do tempo foi verificada por Gomide et al. (2009) em estudo com fungos micorrízicos arbusculares. Do exposto, tem-se que os resultados dos índices de diversidade indicam que mudanças mais profundas nos níveis de diversidade de fungos em solos cultivados com forrageiras sejam mais associadas ao manejo adotado, do que à espécie cultivada.

Dentre as famílias de fungos identificadas destacam-se, por um lado, algumas que foram consideradas generalistas e relevantes para várias forrageiras (o_Mortierellales, f_Nectriaceae, f_Mortierellaceae e c_Agaricomycetes) enquanto outras foram consideradas mais específicas e relevantes para poucas forrageiras, como foi o caso do p_Basidiomycota e c_Mortierellomycotina^{IS} na Mata; f_Clavariaceae no Marandu; e f_Ascomycota no Decumbes pastoreado e Marandu. Embora não se tenha certeza do papel que as famílias mais específicas possuem nas forrageiras onde foram observadas, presume-se que a maior relevância desses grupos esteja associada à alguma característica específica da planta. Esta observação pode nortear futuros estudos sobre o papel e relação desses fungos no solo cultivado com essas forrageiras.

Os resultados sugerem não haver efeito preponderante do pastoreio sobre os níveis de diversidade de fungos do solo, uma vez que a forrageira *Decumbens* manejada com animais foi similar às demais forrageiras não pastejadas quanto aos índices de diversidade. Essa observação deve ser tomada com restrições, uma vez que o pastejo não foi analisado como uma fonte de variação, tendo em vista que apenas essa forrageira foi submetida as duas condições de manejo.

Ainda que os índices de diversidade para fungos tenham sido homogêneos entre as forrageiras avaliadas, o índice de relevância taxonômica para cada forrageira (IRT_i) mostrou diferenças em relação a importância dos grupos identificados em cada planta no sequenciamento de DNA. O ranqueamento realizado a partir do índice proposto neste estudo permitiu observar que as forrageiras *Tanzânia* e *Humidícola*, que não diferiram das demais nos índices de Simpson e Shannon, agruparam grupos de fungos de menor relevância. De forma semelhante, nota-se que a *Mata* e o *Amendoim* forrageiro, que também não diferiram das demais forrageiras em relação à diversidade pelos índices avaliados, destacaram-se por apresentar mais grupos de maior relevância. Por sua vez, o IRT_i obtido para as forrageiras *Estilosantes* e *Cameroon* foram coerentes com os índices de diversidade avaliados.

A maior quantidade de grupos com alta relevância na *Mata*, *Estilosantes* e *Amendoim* pelo ranqueamento via IRT_i pode estar associado com o fato de as leguminosas disponibilizarem um substrato com melhor qualidade à microbiota do solo, com formas de carbono mais lábeis e mais rico em nutrientes, principalmente, N e Ca (Loneragan e Snowball, 1969; Palm e Sanchez, 1991). Para a área de mata, a justificativa poderia ser esse um ambiente natural, onde as relações ecológicas são estáveis.

Um dos focos deste estudo foi analisar a distribuição e o perfil da microbiota fúngica do solo associada a diferentes espécies de forrageiras. Neste sentido, a rede neural artificial utilizada foi capaz de discriminar com sucesso estas interações, indicando as mais significativas para cada espécie de forrageira. Adicionalmente, o índice IRT_f apresentou de forma consolidada o nível de interação de cada grupo de fungo em cada forrageira. Desta forma, a combinação de ambas ferramentas possibilitou identificar os grupos chave presentes nas diferentes forrageiras avaliadas.

A rede neural também permitiu observar que as forrageiras apresentaram uma segregação na distribuição espacial. Forrageiras mais rústicas foram alocadas na parte central e superior da rede, enquanto leguminosas e forrageiras mais exigentes em nutrientes foram alocadas na parte inferior. Isso sugere que o perfil da microbiota fúngica do solo pode responder à certas mudanças promovidas no solo com o cultivo das

forrageiras. Essas mudanças podem ser produto de variações na liberação de exudados radiculares e na ciclagem de nutrientes, características diretamente relacionadas com a rusticidade das forrageiras. Desse modo, solos com maiores teores de Al e mais ácidos podem abrigar determinados tipos de espécies de fungos mais adaptadas, ao passo que solos com fertilidade condicionada por forrageiras de melhor capacidade de ciclagem de nutrientes podem oferecer condições mais adequadas para outros grupos fúngicos. Contudo, estudos mais aprofundados, principalmente relacionados ao efeito dos exudados radiculares, da capacidade de ciclagem de nutrientes e da alteração do pH na rizosfera promovidas pelas forrageiras, podem elucidar o quanto essas plantas podem afetar os grupos de fungos presentes no solo.

Papel dos principais grupos

O sequenciamento de DNA tem sido amplamente utilizado para a descrição e identificação de microrganismos em diversas áreas de estudo, contudo, uma de suas limitações é o não oferecimento de informações que permitam avaliar a real função dos microrganismos no solo. Desta forma, somente seria possível inferir sobre o papel deles a partir de dados da literatura e outras variáveis analisadas. Como em alguns casos os grupos de maior importância não foram identificados ao nível de família (k_Fungi, p_Ascomycota, p_Basidiomycota, o_Helotiales e o_Pleosporales), uma discussão mais aprofundada da possível função destes grupos no solo torna-se essencialmente especulatória, dado o número de espécies abrigadas dentro de cada clã e a diversidade de funções que podem ser desempenhadas no solo. Neste sentido, na sequência procurou-se abordar as funções apenas dos grupos identificados por suas famílias ou ordens.

De acordo com a arquitetura da ANN e os dados do IRT_f, os grupos de fungos mais interativos, ou seja, mais importantes, pertencem à ordem Mortierellales e à família Mortierellaceae que pertence a àquela ordem. Juntos estes dois grupos representam quase um terço do total dos pesos relativos à importância taxonômica e foram relevantes para a quase totalidade das forrageiras avaliadas. Atualmente, apenas a família Mortierellaceae é descrita na ordem Mortierellales (Hoffmann et al., 2011), assim o grupo não identificado é formado por famílias ainda não descritas ou não presentes no banco de dados.

A família Mortierellaceae pertence ao filo Zigomycota, e possui apenas o gênero *Mortierella*. Os relatos da ocorrência de espécies desse gênero em diversos ambientes incluem plantações de cacau, forrageiras, pântanos, florestas plantadas, vegetação nativas e até Terras Pretas antropogênicas (Turner e Pugh, 1961; Jackson, 1965; He et al., 2005; Fracetto et al., 2013; Lucheta et al., 2016). Essas informações indicam que essas espécies

são bastante generalistas quanto ao habitat. Em relação às características e funções, as espécies dessa família são majoritariamente saprófitas e oportunistas pioneiras ou secundárias (Deacon, 1997), sendo frequentemente associadas a solos orgânicos ou com boa disponibilidade de resíduos orgânicos para a degradação, tal como ocorreu na maioria das forrageiras estudadas neste trabalho (Jackson, 1965; Kjoller et al., 2000; Osono e Takeda, 2001; Thormann, 2006; Štursová et al., 2012). Existem relatos ainda de espécies patogênicas para animais e humanos (Austwick, 1976; Wada et al., 2011; Layios et al., 2014), produtores de ácidos graxos importantes para a alimentação humana (Zhu et al., 2004), e ainda espécies endofíticas e capazes de aumentar a resistência das plantas à herbivoria por insetos (Gan et al., 2017). Algumas espécies são conhecidas por emitir um odor similar ao do alho (Shimizu e Jareonkitmongkol, 1995). Um relato interessante indica que algumas espécies dessa família possuem a capacidade de volatilizar selênio pelo processo de metilação, sendo possíveis agentes cicladores deste elemento no solo (Zieve et al., 1985).

A família Nectriaceae foi outra de destaque com maior relevância. Essa família pertence ao filo Ascomycota e, atualmente, possui mais de 90 gêneros, dos quais os observados neste estudo foram: *Cosmopora*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Nectria*, *Septofusidium*, *Thelonectria* e *Voluntella*, além de um gênero não identificado (dados não apresentados). Com relevância destacada em nove forrageiras avaliadas, o gênero mais abundante foi o *Fusarium*, um dos mais importantes da família. Dispersas em praticamente todo o planeta, as espécies de *Fusarium* são majoritariamente saprófitas, parasitas facultativa e, algumas delas, parasitas obrigatórias (Khandelwal, 2017), das quais destacam-se as fitopatógenas (Gullino et al., 2015; Jiménez-Díaz et al., 2015; Carrer Filho et al., 2016). Esse gênero é comum em pastagens (Burgess et al., 1988), onde os relatos indicam ser, em sua maioria, espécies saprófitas, muito embora muitas delas sejam produtoras de micotoxinas que, quando consumidas pelos animais, podem provocar problemas ao sistema reprodutor e digestivo (Abbas et al., 1991; Bonish e Dienna, 1993; Tan et al., 2011).

Poucos estudos buscam compreender o papel que as espécies de *Fusarium* possuem na ciclagem de nutrientes e carbono no solo, uma vez que a maioria das pesquisas é dedicada às doenças causadas por estes fungos tanto em plantas como em animais. Ainda assim, Soares (2013) observou que algumas espécies de *Fusarium* são eficientes decompositores, com boa capacidade de degradação de celulose e de outros compostos aromáticos. Uma vez que não se têm indícios de doenças nas plantas avaliadas e nem histórico de problemas em animais por intoxicação com essas micotoxinas na

região, acredita-se que as espécies de *Fusarium* encontradas neste estudo sejam majoritariamente saprófitas.

Outro grupo relevante observado nas forrageiras pertence à classe dos Agaricomycetes, sendo uma família sem posição taxonômica definida, identificada como f_Agaricomycetes^{IS} e que foi relevante em cinco forrageiras e na Mata; e outro pertencente à família Clavariaceae, que foi relevante na forrageira Marandu. Os Agaricomycetes são facilmente identificados pela estrutura de frutificação que formam cogumelos. São dispersos em todos os tipos de habitat e representam cerca de 50% da diversidade de fungos do solo (Tedersoo et al., 2014). Recentemente 18 espécies ainda não descritas no Brasil foram encontradas no Mato Grosso, sendo uma delas possivelmente endêmica (Bononi et al., 2017). As principais estratégias de sobrevivência destes fungos são o saprofitismo, parasitismo e mutualismo (Hibbett, 2007) e suas atividades no solo têm relação direta com a ciclagem de nutrientes e carbono, e com a atividade de outras comunidades de fungos (Hibbett et al., 2014).

Dentre os gêneros mais abundantes, destacam-se o *Resinicium* em família com posição taxonômica incerta e o *Clavulinopsis* da família Clavariaceae. Estudos indicam que algumas espécies do gênero *Resinicium* são lignolíticas (degradam lignina), sendo encontradas em restos de madeira em decomposição, e apresentam baixos níveis de patogenicidade (Kirby et al., 1990). Alguns relatos indicam que espécies de *Resinicium* podem ser microfagiadas por pequenos insetos (Tordoff et al., 2006). Além disso, tais fungos são associados a potencial de biorremediação de solos contaminados com derivados de petróleo (Nicholas, 2015).

O gênero *Clavulinopsis* é formado por espécies saprófitas, normalmente encontradas em solo ou em resíduos mortos de pastagens e madeira em decomposição. Algumas são sensíveis ao manejo do solo e, portanto, consideradas indicadoras de qualidade do ambiente, uma vez que sua permanência depende de boas condições de sobrevivência (Wong, 2012). Embora sensíveis ao manejo, as espécies desse gênero aparentemente não são muito seletivas quanto ao habitat, sendo encontradas associadas à diferentes tipos de vegetação (Zhang et al., 2010). Diante do exposto, a relevância desse grupo de fungo no solo cultivado com a forrageira Marandu sugere que essa forrageira é capaz de proporcionar boa qualidade do solo.

Um grupo de fungos pertencente à uma família sem posição taxonômica definida dentro da ordem dos Pleosporales também teve destaque (f_Pleosporales^{IS}). Esse grupo foi relevante nas forrageiras Amendoim e Decumbens pastoreado, sendo o gênero mais abundante o *Pyrenochaeta*. A maioria dos relatos na literatura indicam que esse gênero

abriga espécies patogênicas, que provocam doenças em raízes, infectando principalmente as culturas do tomate, pimenta, melão, berinjela, pepino e espinafre (Grove e Campbell, 1980; Pohronezny e Volin, 1991; Infantino et al., 2000; Aragona et al., 2014). Outros relatos indicam espécies de *Pyrenochaeta* em pastagens, neste caso, sem menção à possível associação com doenças (You et al., 2000).

Considerações finais

O estudo foi capaz de identificar diversos grupos de fungos associados às forrageiras no solo. Contudo, percebeu-se que fungos do filo Glomeromycota, formado pelos fungos micorrízicos arbusculares não foram identificados. Contudo, sua inexistência no solo é pouco provável, tendo em vista sua ampla distribuição e o papel que desempenham. A não identificação desse filo decorreu, provavelmente, da não especificidade dos *primers* ITS1 e ITS2 para estes fungos, problema que poderia ter sido solucionado com a utilização de *primers* específicos para a exploração mais aprofundada destes grupos no solo (Krüger et al., 2009; Lindahl et al., 2013).

Embora seja um estudo exploratório de identificação da diversidade de fungos, o presente estudo oferece uma base para estudos futuros relacionados à função dos grupos desses microrganismos em solos cultivados com forrageiras. Neste sentido, os resultados apresentados pela estrutura da ANN podem subsidiar avaliações de grupos específicos de fungos no solo e suas respectivas funções em diferentes espécies de forrageiras.

CONCLUSÕES

Os níveis de diversidade de fungos do solo não são determinados pela espécie de forrageira cultivada. Mudanças mais marcantes nesta característica devem estar mais associadas ao manejo do que com a espécie utilizada.

Em condições de igualdade nos níveis de diversidade, a relevância dos grupos de fungos é dependente da forrageira cultivada.

Os grupos de fungos do solo identificados como mais importantes na associação com as forrageiras são pertencentes à ordem Mortierellales e à família Nectriaceae. A rede neural artificial é capaz de identificar grupos de fungos do solo mais relevantes e associados a cada forrageira.

Os fungos associados às forrageiras com maior relevância são espécies majoritariamente saprófitas, ainda que com a presença de alguns potencialmente patogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas HK, Mirocha CJ, Gunther R. Production of zearalenone, nivalenol, moniliformin, and wortmannin from toxigenic cultures of *Fusarium* obtained from pasture soil samples collected in New Zealand. *Mycotoxin Res.* Springer-Verlag; 1991;7:53–60.
- Andrews Simon. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Internet]. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. 2015.
- Aragona M, Minio A, Ferrarini A, Valente MT, Bagnaresi P, Orrù L, Tononi P, Zamperin G, Infantino A, Valè G, Cattivelli L, Delledonne M. De novo genome assembly of the soil-borne fungus and tomato pathogen *Pyrenochaeta lycopersici*. *BMC Genomics.* BioMed Central; 2014;15:313.
- Austwick PKC. Environmental aspects of *Mortierella wolfii* infection in cattle. *New Zeal J Agric Res.* Taylor & Francis Group; 1976;19:25–33.
- Bastian M, Heymann S, Jacomy M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks [Internet]. *Proc. the Third Int. AAAI Conf. Weblogs Soc. Media.* 2009. p. 361–362.
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods.* 2012;10:57–59.
- Bonish PM, Dienna ME. A comparison of 2 methods for isolating *Fusarium* spp from pasture herbage. *Mycol Res.* Elsevier Ltd.; 1993;97:91–94.
- Bononi VLR, Oliveira AKM de, Gugliotta A de M, Quevedo JR de, Bononi VLR, Oliveira AKM de, Gugliotta A de M, Quevedo JR de. Agaricomycetes (Basidiomycota, Fungi) diversity in a protected area in the Maracaju Mountains, in the Brazilian central region. *Hoehnea.* Instituto de Botânica; 2017;44:361–377.
- Burgess LW, Nelson PE, Toussoun TA, Forbes GA. Distribution of *Fusarium* Species in Sections Roseum, Arthrosporiella, Gibbosum and Discolor Recovered from Grassland, Pasture and Pine Nursery Soils of Eastern Australia. *Mycologia.* Taylor & Francis, Ltd.; 1988;80:815.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [Internet]. *Nat. Methods.* 2010. p. 335–336.
- Carrer Filho R, Dias VD, Oliveira RM de, Dianese É de C, Boiteux LS, Cunha MG da, Filho RC, Dias VD, Oliveira RM de, Dianese É de C, Boiteux LS, Cunha MG da. Detecção simultânea de fatores de resistência à murcha de fusário do tomateiro por meio de PCR multiplex. *Pesqui Agropecuária Bras.* Embrapa Informação Tecnológica; 2016;51:925–932.
- Deacon JW. *Modern mycology.* 3^o ed. Boston: Blackwell Sci.Publ.; 1997.
- Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods.* 2013;10:996–998.
- Embrapa. *Sistema brasileiro de classificação de solos.* 3^o ed. Brasília; 2013.
- Fracetto GGM, Azevedo LCB, Fracetto FJC, Andreote FD, Lambais MR, Pfenning LH. Impact of Amazon land use on the community of soil fungi. *Sci Agric. Scientia Agricola;* 2013;70:59–67.
- Gan H, Churchill ACL, Wickings K. Invisible but consequential: root endophytic fungi

- have variable effects on belowground plant-insect interactions. *Ecosphere*. 2017;8:e01710.
- Gomide PHO, Santos JGD dos, Siqueira JO, Soares CRFS. Diversidade e função de fungos micorrízicos arbusculares em sucessão de espécies hospedeiras. *Pesqui Agropecuária Bras*. 2009;44:1483–1490.
- Grove GG, Campbell RN. Host range and survival in soil of *Pyrenochaeta lycopersici*. *Plant Dis. American Phytopathological Society*; 1980;71:806–809.
- Gullino ML, Daughtrey ML, Garibaldi A, Elmer WH. *Fusarium* wilts of ornamental crops and their management. *Crop Prot. Elsevier*; 2015;73:50–59.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. *PAST-Palaeontological Statistics*, ver. 1.89. Oslo; 2009.
- He J, Xu Z, Hughes J. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. *FEMS Microbiol Lett. Oxford University Press*; 2005;247:91–100.
- Hibbett DD, Bauer R, Binder M, Giachini AJ, Hosaka K, Justo A, Larsson E, Larsson KH, Lawrey JD, Miettinen O, Nagy L, Nilsson RH, Weiss M, Thorn RG. Agaricomycetes. In: McLaughlin DJ, Spatafora JW, organizadores. *The Mycot*. 2º ed Springer-Verlag; 2014. p. 373–429.
- Hibbett DS. Agaricomycetes. Mushroom-Forming Fungi [Internet]. 2007.
- Hoffmann K, Voigt K, Kirk PM. <I>Mortierellomycotina</I> subphyl. nov., based on multi-gene genealogies. *Mycotaxon*. 2011;115:353–363.
- IBGE. IBGE | Séries Estatísticas & Séries Históricas [Internet]. 2007.
- Infantino A, Di Giambattista G, Porta-Puglia A. First report of *Pyrenochaeta lycopersici* on melon in Italy. *Petria*. 2000;10:195–198.
- Jackson RM. Studies of Fungi in Pasture Soils:III. Physiological studies on some fungal isolates from the root surface and from organic debris. *New Zeal J Agric Res. Taylor & Francis Group*; 1965;8:878–888.
- Jiménez-Díaz RM, Castillo P, Jiménez-Gasco M del M, Landa BB, Navas-Cortés JA. *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Prot. Elsevier*; 2015;73:16–27.
- Khandelwal S. *Fusarium: Habitat, Reproduction and Economic Importance* [Internet]. 2017.
- Kirby JJH, Stenlid J, Holdenrieder O. Population structure and responses to disturbance of the basidiomycete *Resinicium bicolor*. *Oecologia*. 1990;85:178–184.
- Kjoller A, Miller M, Struwe S, Wolters V, Pflug A. Diversity and role of Microorganisms. In: Schulze ED, organizador. *Carbon Nitrogen Cycl Eur For Ecosyst*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2000. p. 382–402.
- Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lücking R, Martín MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Põldmaa K, Saag L, Saar I, Schüßler A, Scott JA, Senés C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiss M, Larsson K-H. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol*. 2013;22:5271–5277.
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A. DNA-based species level detection of Glomeromycota: One PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New*

- Phytol. 2009;183:212–223.
- Layios N, Canivet J-L, Baron F, Moutschen M, Hayette M-P. *Mortierella wolffii*-associated invasive disease. *Emerg Infect Dis. Centers for Disease Control and Prevention*; 2014;20:1591–2.
- Lim YW, Kim BK, Kim C, Jung HS, Kim B-S, Lee J-H, Chun J. Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *J Microbiol. The Microbiological Society of Korea*; 2010;48:284–289.
- Lindahl BD, Nilsson RH, Tedersoo L, Abarenkov K, Carlsen T, Kjølter R, Kõljalg U, Pennanen T, Rosendahl S, Stenlid J, Kauserud H. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers--a user's guide. *New Phytol. Wiley-Blackwell*; 2013;199:288–99.
- Liu N, Zhang Y, Chang S, Kan H, Lin L. Impact of Grazing on Soil Carbon and Microbial Biomass in Typical Steppe and Desert Steppe of Inner Mongolia. Neyrolles O, organizador. *PLoS One. Public Library of Science*; 2012;7:e36434.
- Loneragan J, Snowball K. Calcium requirements of plants. *Aust J Agric Res. CSIRO PUBLISHING*; 1969;20:465.
- Lucheta AR, de Souza Cannavan F, Roesch LFW, Tsai SM, Kuramae EE. Fungal Community Assembly in the Amazonian Dark Earth. *Microb Ecol. Springer US*; 2016;71:962–973.
- Maherali H, Klironomos JN. Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Functioning. *Science (80-)*. 2007;316:1746 LP-1748.
- Miranda EM de, Silva EMR da, Sagin Júnior OJ. Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares associados ao amendoim forrageiro em pastagens consorciadas no Estado do Acre, Brasil. *Acta Amaz. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia*; 2010;40:13–22.
- Nicholas O. Bioremediation Potentials of *Heterobasidion annosum* 13.12B and *Resinicium bicolor* in Diesel Oil Contaminated Soil Microcosms. *J Appl Sci Environ Manag*. 2015;19:513.
- Oja J, Kohout P, Tedersoo L, Kull T, Kõljalg U. Temporal patterns of orchid mycorrhizal fungi in meadows and forests as revealed by 454 pyrosequencing. *New Phytol*. 2015;205:1608–1618.
- Osono T, Takeda H. Organic chemical and nutrient dynamics in decomposing beech leaf litter in relation to fungal ingrowth and succession during 3-year decomposition processes in a cool temperate deciduous forest in Japan. *Ecol Res. Blackwell Science Pty*; 2001;16:649–670.
- Palm CA, Sanchez PA. Nitrogen release from the leaves of some tropical legumes as affected by their lignin and polyphenolic contents. *Soil Biol Biochem. Pergamon*; 1991;23:83–88.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:789–799.
- Pohronezny K, Volin R. Corky Root Rot. In: Jones J, Jones J, Stal R, Zitter T, organizadores. *Compend Tomato Dis. Minnesota: The American Phytopathological Society*; 1991. p. 12–13.
- Prates HT, Oliveira AB, Leite RC, Craveiro AA. Atividade carrapaticida e composição química do óleo essencial do capim-gordura. *Pesqui Agropecuária Bras. Embrapa Informação Tecnológica*; 1993;28:621–625.
- Prober SM, Leff JW, Bates ST, Borer ET, Firn J, Harpole WS, Lind EM, Seabloom EW, Adler PB, Bakker JD, Cleland EE, DeCrappeo NM, DeLorenze E, Hagenah N,

- Hautier Y, Hofmockel KS, Kirkman KP, Knops JMH, La Pierre KJ, MacDougall AS, McCulley RL, Mitchell CE, Risch AC, Schuetz M, Stevens CJ, Williams RJ, Fierer N. Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. Klironomos J, organizador. *Ecol Lett*. 2015;18:85–95.
- Pylro VS, Roesch LFW, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol Methods*. 2014;107:30–37.
- Russell JR, Bisinger JJ. Forages and pastures symposium: Improving soil health and productivity on grasslands using managed grazing of livestock. *J Anim Sci*. American Society of Animal Science; 2015;93:2626.
- Shimizu S, Jareonkitmongkol S. *Mortierella Species (Fungi): Production of C20 Polyunsaturated Fatty Acids*. Springer, Berlin, Heidelberg; 1995. p. 308–325.
- Silva BZ. Filtragem robusta de SNPs utilizando redes neurais em DNA genômico completo. Universidade Federal de Juiz de Fora; 2013.
- Smith DP, Peay KG. Sequence Depth, Not PCR Replication, Improves Ecological Inference from Next Generation DNA Sequencing. Kellogg CA, organizador. *PLoS One*. Public Library of Science; 2014;9:e90234.
- Soares ÂM. Saprotrophic fungi *Hypholoma fasciculare* effect on the fungal community associated to *Castanea sativa* [Internet]. Universidade do Milho; 2015.
- Soares BM. Diversidade de fungos decompositores de madeira presentes em ecossistemas brasileiros : bioprospecção de espécies úteis em processo de biodegradação de poluentes aromáticos [Internet]. UFMG; 2013.
- Stasoft. *Statistica for Windows version 6.0 (Computer Program Manual)*. 2000.
- Štursová M, Žifčáková L, Leigh MB, Burgess R, Baldrian P. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiol Ecol*. Oxford University Press; 2012;80:735–746.
- Tan DC, Flematti GR, Ghisalberti EL, Sivasithamparam K, Chakraborty S, Obanor F, Barbeti MJ. Mycotoxins produced by *Fusarium* species associated with annual legume pastures and “sheep feed refusal disorders” in Western Australia. *Mycotoxin Res*. Springer-Verlag; 2011;27:123–135.
- Tedersoo L, Bahram M, Cajthaml T, Põlme S, Hiiesalu I, Anslan S, Harend H, Buegger F, Pritsch K, Koricheva J, Abarenkov K. Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. *ISME J*. Nature Publishing Group; 2016;10:346–362.
- Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* (80-). 2014;346:1078–1088.
- Thormann MN. Diversity and function of fungi in peatlands: A carbon cycling perspective. *Can J Soil Sci*. NRC Research Press Ottawa, Canada ; 2006;86:281–293.
- Tordoff GM, Boddy L, Jones TH. Grazing by *Folsomia candida* (Collembola) differentially affects mycelial morphology of the cord-forming basidiomycetes *Hypholoma fasciculare*, *Phanerochaete velutina* and *Resinicium bicolor*. *Mycol Res*. 2006;110:335–345.
- Turner M, Pugh GJF. Species of *Mortierella* from a salt marsh. *Trans Br Mycol Soc*. Elsevier; 1961;44:243–IN9.
- Wada S, Ode H, Hobo S, Niwa H, Katayama Y, Takatori K. *Mortierella wolfii* keratomycosis in a horse. *Vet Ophthalmol*. 2011;14:267–270.

- Wang J, Zhang T, Li L, Li J, Feng Y, Lu Q. The Patterns and Drivers of Bacterial and Fungal β -Diversity in a Typical Dryland Ecosystem of Northwest China. *Front Microbiol. Frontiers Media SA*; 2017;8:2126.
- Wong J. Impacts of agricultural disturbance on communities of selected soil fungi (Agaricomycetes) [Internet]. Electron. Thesis Diss. Repos. The University of Western Ontario; 2012.
- Yang Y, Dou Y, Huang Y, An S. Links between Soil Fungal Diversity and Plant and Soil Properties on the Loess Plateau. *Front Microbiol. Frontiers Media SA*; 2017;8:2198.
- You MP, Sivasithamparam K, Riley IT, Barbetti MJ. The occurrence of root-infecting fungi and parasitic nematodes in annual *Medicago* spp. in Western Australian pastures. *Aust J Agric Res. CSIRO PUBLISHING*; 2000;51:435.
- Zhang Y, Zhou DQ, Zhao Q, Zhou TX, Hyde KD. Diversity and ecological distribution of macrofungi in the Laojun Mountain region, southwestern China. *Biodivers Conserv. Springer Netherlands*; 2010;19:3545–3563.
- Zhu M, Yu LJ, Liu Z, Xu HB. Isolating *Mortierella alpina* strains of high yield of arachidonic acid. *Lett Appl Microbiol. Blackwell Science Ltd*; 2004;39:332–335.
- Zieve R, Ansell PJ, Young TWK, Peterson PJ. Selenium volatilization by *Mortierella* species. *Trans Br Mycol Soc.* 1985;84:177–179.
- Zuo X, Wang S, Lv P, Zhou X, Zhao X, Zhang T, Zhang J. Plant functional diversity enhances associations of soil fungal diversity with vegetation and soil in the restoration of semiarid sandy grassland. *Ecol Evol.* 2016;6:318–328.

CAPÍTULO 3

ALTERAÇÃO DA ESTRUTURA DE SOLOS E RESÍDUO DE MINERAÇÃO POR PLANTAS E FUNGOS

CAPITULO 3: ALTERAÇÃO DA ESTRUTURA DE SOLOS E RESÍDUO DE MINERAÇÃO POR PLANTAS E FUNGOS

Resumo: A qualidade física do solo é resultado da interação de diferentes fatores. A ação de plantas e microrganismos é frequentemente mencionada como contribuintes no processo de estruturação do solo, muito embora persistam limitações no entendimento do papel que cada um destes componentes desempenha. Neste sentido, ensaios foram conduzidos com dois solos e um resíduo de mineração de ferro buscando avaliar o efeito de plantas (braquiária e amendoim forrageiro) e inóculos (fungo *Piroformospora indica* e mix com três espécies de fungos micorrízicos arbusculares) sobre a alteração da estrutura dos substratos avaliados, por meio de características físicas e microbiológicas do solo bem como de desenvolvimento das plantas. As alterações na meso e macroestrutura do solo ocorreram predominantemente por ação das plantas, com destaque para a braquiária e foram associadas com a maior produção de biomassa, em especial de raízes. Os inóculos influenciaram mais as características microbiológicas associadas à qualidade dos solos, especialmente na presença do amendoim. Na ausência de plantas, microrganismos autotróficos nativos melhoraram a floculação de argilas. Os dados obtidos sugerem que o processo de alteração da estrutura dos solos e resíduo de mineração é dependente da ação das raízes de plantas, especialmente aquelas de sistema radicular mais agressivo como das gramíneas; enquanto que, na ausência de plantas, a presença de microrganismos, principalmente autotróficos, alteram a micro e nanoestrutura do solo.

Palavras-chave: qualidade do solo, micorrizas, braquiária, raízes, agregados

INTRODUÇÃO

A qualidade do solo, tema frequente de pesquisas, é definida como “a capacidade de um tipo específico de solo de funcionar dentro de seus limites naturais ou manejados, para sustentar a produtividade vegetal e animal, manter ou melhorar a qualidade da água e do ar e suportar a saúde humana e habitação” (Karlen et al., 1997).

Este estado de qualidade pode ser avaliado sob diferentes aspectos e peculiaridades, e um dos principais enfoques desses estudos tem sido as características físicas do solo (Vitória et al., 2012; Lima et al., 2014; Ghiberto et al., 2015). A qualidade física do solo tem relação direta com vários fatores ambientais e antrópicos decisivos para o manejo, visando à sustentabilidade de um sistema natural, agrícola ou em recuperação. A recuperação da qualidade física, passa pela alteração da estrutura do solo que é fundamental na recomposição das funções ambientais, econômicas e sociais de qualquer

ambiente degradado, seja ele uma pastagem, áreas desertificadas, áreas impactadas pela mineração, e outras.

Entre os aspectos envolvidos na avaliação da qualidade física do solo, a estrutura tem sido frequentemente monitorada, por ser dinâmica, responsiva ao manejo e por comandar vários processos importantes na manutenção das funções do solo tais como: infiltração, condução e armazenamento de água, trocas gasosas, agregação e estabilidade de agregados, proteção da matéria orgânica, dentre outros (Hunke et al., 2015). Portanto, a estrutura é fundamental para a manutenção e melhoria da sustentabilidade de um agroecossistema, pois se relaciona com o fornecimento de água para as plantas, o desenvolvimento das raízes e a resistência do solo à erosão.

Um dos principais agentes promotores da melhoria da estrutura do solo são as raízes. Elas atuam basicamente de duas maneiras: fisicamente formando um emaranhado que envolve as partículas do solo, promovendo a aproximação de partículas minerais que se unem por processos físico-químicos formando os agregados e, quimicamente liberando substâncias químicas com capacidade ligante dentre as quais se destacam diversos polissacarídeos presentes na matéria orgânica (Oades, 1984, 1993).

Os microorganismos são outros importantes agentes capazes de alterar a estrutura do solo. Dentre eles, destacam-se os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) que, em associação com as plantas, promovem o crescimento vegetal e liberam substâncias cimentantes no solo, que auxiliam no processo de formação e estabilização da estrutura (Wright e Upadhyaya, 1996; Peng et al., 2013). Além dos FMAs, outra espécie frequentemente estudada é a *Piriformospora indica*. Este fungo é um endossimbionte biotrófico mutualista pertencente à ordem Sebaciales (Basidiomycota) que, de forma semelhante aos FMAs tem sido relatada como importante para o desenvolvimento vegetal. Outras características relacionadas à *P. indica* são sua alta versatilidade para colonização vegetal, melhorias no desenvolvimento radicular, maior absorção de nutrientes e aumento da resistência das plantas à doenças fúngicas e virais (Gill et al., 2016). Apesar dos estudos, poucos trabalhos buscaram avaliar o efeito dessa espécie sobre as características físicas do solo.

A hipótese deste estudo é que a estrutura do solo pode ser alterada positivamente com o uso de plantas associadas a fungos. Desta forma, objetivou-se avaliar o papel destes microrganismos em associação com plantas na alteração da estrutura de solos e de resíduo de mineração de ferro.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. Três experimentos foram conduzidos simultaneamente, utilizando-se como substrato dois solos de textura argilosa e textura arenosa, e um resíduo de mineração de ferro de textura siltosa (Tabela 1). Os solos argiloso e arenoso foram provenientes do horizonte B de um Latossolo Vermelho-Amarelo, de Viçosa – MG, e de um Latossolo Vermelho-Amarelo, de Três Marias – MG, respectivamente. O resíduo de beneficiamento de minério de ferro foi coletado na barragem Forquilha III, Unidade Fábrica da Companhia Vale S.A., situada em Congonhas – MG.

Os três experimentos foram conduzidos em delineamento em bloco casualizados com cinco repetições, seguindo-se esquema fatorial $3 \times 3 + 1$, correspondendo a três condições de vegetação (braquiária, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu; amendoim forrageiro, *Arachis pintoi* e ausência de plantas), três condições de inóculos (fungo *Piriformospora indica*, mix com as espécies de FMA *Rizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum* e *Gigaspora albida*, todos obtidos junto ao Departamento de Microbiologia da UFV, e ausência de inoculação) e um tratamento controle com ausência e plantas e inóculo e sem adubação e correção.

Como os três substratos eram naturalmente pobres quimicamente (Tabela 1), foi necessário realizar correções e adubações. À exceção do controle, todos os demais tratamentos foram corrigidos e adubados com fontes minerais. As doses de nutrientes foram calculadas conforme recomendações de Waugh e Fitts (1966) e Alvarez V. e Ribeiro (1999). Para minimizar o efeito supressivo dos nutrientes sobre a colonização das plantas pelos fungos micorrízicos arbusculares (Moreira e Siqueira, 2006), as doses prévias à instalação e em cobertura foram reduzidas respectivamente, a 33 e 50% da dose recomendada. Adubações em cobertura foram realizadas com ureia em sempre que as plantas apresentassem sintomas de deficiência de N.

Antes da instalação do experimento, os substratos foram secos ao ar e passados em peneira de malha de 2 mm para homogeneização dos agregados. Vasos plásticos de 7 dm³ foram preenchidos com 5,2 dm³ de substrato. Após a aplicação inicial de nutrientes e corretivos, os substratos foram umedecidos e ficaram incubados por 20 dias até a inoculação dos microrganismos e plantio das espécies vegetais. A inoculação foi efetuada em orifícios de 1 cm de profundidade. A espécie *P. indica* foi inoculada utilizando-se 12 discos de 1 cm de diâmetro de meio KM contendo estruturas do fungo e a inoculação do mix com as espécies de FMA foi realizada adicionando-se 25 cm³ por vaso de areia colonizada (aproximadamente 200 esporos totais/cm³).

Tabela 1 – Características naturais dos solos e substrato de mineração utilizado no experimento

Substrato	pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	t	T	V	m	P-rem
	(H ₂ O)	mg dm ⁻³									(%)		mg L ⁻¹
Argiloso	5,1	0,5	13,6	0,5	0,0	0,7	4,8	0,6	1,2	5,3	11	54	13,9
Arenoso	5,1	0,3	28,8	0,4	0,1	0,4	2,7	0,5	0,9	3,3	16	42	32,8
Resíduo de mineração	5,0	9,1	13,6	0,8	0,0	0,0	0,4	0,8	0,8	1,3	67	0	30,6

A semeadura das plantas foi realizada no mesmo e nos mesmos orifícios utilizados para a inoculação, no intuito de maximizar as chances de colonização das plantas. No plantio foram utilizadas 30 sementes da gramínea ou 12 da leguminosa por vaso e, após o desbaste, manteve-se três plantas de cada espécie. Nos tratamentos com a leguminosa, além da inoculação com fungos, também foi realizada a inoculação de rizóbio (bactérias isoladas a partir de plantas da própria espécie retiradas no campo) para garantir a associação com bactérias fixadoras de nitrogênio.

Os experimentos foram conduzidos por 16 meses. Durante o cultivo, a umidade dos substratos foi mantida em torno de 80% da capacidade de campo para se minimizar o efeito dos ciclos de umedecimento e secagem sobre a estrutura dos substratos. Podas frequentes na altura de 10 cm foram promovidas com o intuito de renovar o sistema radicular das plantas, sempre que a gramínea atingisse 50 cm e a leguminosa 30 cm de altura, que representam aproximadamente 50% da altura máxima estimada. No caso do amendoim forrageiro a altura de manejo foi calculada pelo comprimento dos ramos, uma vez que a leguminosa tem habito de crescimento prostrado. Após cada poda, o material vegetal foi seco em estufa a 65 °C, pesado e armazenado.

Ao final do experimento, as plantas foram cortadas rente a superfície dos substratos e a parte aérea seca em estufa para a estimativa da massa seca. A densidade de raízes (DSR) foi quantificada a partir de uma amostra indeformada coletada no centro do vaso em anel cilíndrico de aproximadamente 100 cm³. A produção de massa seca da parte aérea (MSP) foi determinada pelo somatório do material coletado durante as podas e ao final do experimento.

A estimativa dos esporos totais (ESPT) foi realizada conforme Gerdemann e Nicolson (1963) e Jenkins (1964). Amostras de 60 g do substrato foram agitadas em 2 L de água por 1 min e passadas por peneiras de malha de 0,84 e 0,044 mm. O material retido na menor peneira foi centrifugado a 1750 rpm por 5 min, ressuspendido com solução de sacarose 50% e novamente centrifugado para a separação dos esporos, que foram recolhidos no sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para placas canaletadas para

serem quantificado com o auxílio de lupa. Os valores foram expressos em número de esporos por grama de solo.

Para avaliação da percentagem de colonização de raízes por micorrizas (COL), amostras de raízes foram clareadas em solução de KOH 10% a 90°C por 30 min e acidificadas em HCl 2% por 10 min. Posteriormente, essas amostras foram aquecidas a 70 °C por 60 minutos em solução de azul de tripano em lactoglicerol 0,05% para coloração das estruturas fungicas (Kormanik et al., 1980). Após estes procedimentos, fragmentos das raízes foram dispostos aleatoriamente sobre placas de Petri com linhas quadriculadas (1 x 1 cm) onde as estruturas fúngicas presentes nas interseções das linhas foram contabilizadas e determinaram a percentagem de colonização de raízes (Giovannetti e Mosse, 1980).

O carbono (CBM) e nitrogênio (NBM) da biomassa microbiana foram obtidos pelo método da fumigação-extração, utilizando-se a irradiação em micro-ondas como descrito por Islam e Weil (1998). A determinação dos teores foi realizada de acordo com Vance et al. (1987) e os dados foram expressos em $\mu\text{g g solo}^{-1}$.

A respiração basal foi obtida incubando-se amostras dos substratos (30, 45 e 60 g de solo base seca para os substratos argiloso, arenoso e estéril, respectivamente) umedecidas em aproximadamente 80% da capacidade de campo em frascos de 0,6 dm³ lacrados. Nos frascos foram coletadas amostras gasosas sequenciais (24, 48, 72 e 96 h) com o auxílio de uma seringa (60 mL) equipada com válvula de chaveamento. Após cada coleta as atmosferas dos frascos foram homogeneizadas. Nas amostras gasosas foram determinadas as concentrações de CO₂ e C respirados pela biomassa microbiana, com o equipamento Cavity Ring-down Spectrometer (CRDS, G2131-i, Picarro, Sunnyvale, CA).

O quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) que é a quantidade de C proveniente do CO₂ emitido pelo microrganismos por unidade de C da biomassa microbiana (CBM) foi determinada conforme Anderson e Domsch (1993):

$$q\text{CO}_2 = \frac{RB}{CBM} \quad (1),$$

onde: $q\text{CO}_2$ é o quociente metabólico ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ mg CBM g solo h}^{-1}$), RB é a respiração basal ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e CBM o carbono da biomassa microbiana ($\text{mg CBM g solo}^{-1}$).

A determinação das características físicas foi realizada a partir de amostras dos substratos coletadas no centro de cada vaso. A determinação de argila dispersa em água (ADA), índice de dispersão (ID), densidade do solo (DS), porosidade total (PT),

macroporosidade (PMA) e microporosidade (PMI) seguiram os procedimentos descritos em Embrapa (2011).

A estabilidade de agregados foi avaliada pelo método do impacto da gota, que consiste em determinar a energia necessária para romper um agregado submetido ao impacto de gotas de água que caem com mesma energia e frequência (McCalla, 1944). Para isso agregados de tamanho entre 4,00 e 4,75 mm foram inicialmente pré-umedecidos em mesa de tensão a 10 kPa para eliminar variações na resistência decorrentes do potencial mátrico (Imeson e Vis, 1984). Posteriormente estes agregados foram colocados em peneiras de malha de 2 mm e submetidos ao impacto de gotas de 5,9 mm de diâmetro que caíam na frequência de 1 s^{-1} . Para se otimizar o tempo de análise, a altura de queda da gota foi de 0,75 m para o solo argiloso e de 0,30 m para os dois outros substratos. A energia requerida para quebra de um agregado foi calculada como produto da frequência e energia da gota pelo tempo:

$$E = (FG). (EG). t \quad (2)$$

$$EG = \frac{1}{2} . mv^2 \quad (3),$$

onde: E energia total gasta para quebra do agregado (J), FG é a frequência de queda da gota (gotas s^{-1}), EG é a energia, m é a massa (kg) e v a velocidade (m s^{-1}) de cada gota e t o tempo que cada agregado resistiu. A alta variabilidade observada em testes preliminares exigiu o uso de dez agregados por amostra e a elaboração de um índice que contemplasse a resistência do conjunto de agregados sendo definido o limite de energia de 10 J (Angulo et al., 1984):

$$IEA = \frac{\sum e}{10et} \quad (4),$$

onde: IEA é o índice de estabilidade de agregados, e é a energia que cada agregado resistiu e et a energia total limite estabelecida do teste (10 J).

Todos os dados foram submetidos à análise de variância considerando o fatorial duplo para estudo do efeito das plantas e inóculos avaliados. Em uma primeira avaliação utilizou-se teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) para a comparar as médias dos tratamentos com o controle. Posteriormente em uma segunda avaliação excluiu-se os controles e procedeu-se a análise somente com os tratamentos. Neste caso, analisou-se o efeito da interação de planta e inóculo, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparações com o tratamento controle

Nesta análise o objetivo foi avaliar, dentro de cada substrato, o efeito do uso de plantas e inóculos sobre as características analisadas em comparação ao tratamento controle que não recebeu planta, inóculo e nem nutrientes (Tabela 2). No experimento com resíduo de mineração, o amendoim forrageiro desenvolveu-se apenas nos cinco meses iniciais, ainda assim, os respectivos vasos foram conduzidos até o final dos experimentos e avaliados conforme os demais. Por este motivo, características fitotécnicas ou dependentes de material vegetal, não foram avaliadas para o amendoim forrageiro no experimento com resíduo de mineração.

Efeitos dos tratamentos sobre os teores de carbono da biomassa microbiana (CBM) foram mais expressivos no substrato argiloso, não se verificando efeito na presença de plantas inoculadas com mix-FMA e sem inoculação (Tabela 2). No substrato arenoso, houve incrementos dessa variável quando da utilização do amendoim e ausência de plantas associada com a inoculação de mix-FMA (P2_IN2 e S/P_IN2), bem como na ausência de plantas e inoculação (S/P_S/IN). No resíduo de mineração, variações em relação ao controle foram associadas à redução de CBM na ausência de plantas com mix-FMA (S/P_IN2) e incremento de CBM na ausência de plantas e inoculação (S/P_S/IN). Os teores de nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) praticamente não foram afetados pelos tratamentos nos substratos arenoso e no resíduo de mineração. Aumento dos valores de NBM foram verificados com os tratamentos no substrato argiloso, salvo quando da utilização das duas plantas avaliadas com o mix-FMA (P1_IN2 e P2_IN2).

No geral, o teor de CBM foi incrementado na ausência de plantas nos três substratos. A expectativa era houvesse um aumento dessa variável na presença de plantas e, ou de aporte de material vegetal, como normalmente verificado na literatura (Araújo e Melo, 2010; Silva et al., 2010). Contudo, dois fatores podem explicar o ocorrido. O primeiro é desenvolvimento de microrganismos autotróficos (algas e cianobactérias) na ausência de plantas, em função da maior disponibilidade de luz e nutrientes. A presença destes microrganismos foi constatada visualmente e por análises de sequenciamento de DNA (dados não apresentados) e pode ter contribuído para a elevação dos teores CBM na ausência de plantas. O segundo é a competição entre plantas e microrganismos por nutrientes, especialmente P, nos tratamentos com plantas. Como o P pode ser o nutriente mais limitante para o desenvolvimento da biomassa microbiana (Fanin et al. 2015), a referida competição nesses tratamentos pode ter prejudicado a atividade microbiana, dada

Tabela 2 – Características físicas e microbiológicas em resposta ao uso de diferentes plantas e inóculos em substratos com diferentes texturas

Tratamentos	CBM	NBM	ESPT	qCO_2	ADA a	PT	IEA
	($\mu\text{g g solo}^{-1}$)		(esporos g solo^{-1})	($\mu\text{g C-CO}_2$ mg CBM g solo h^{-1})	(%)	$\text{m}^3 \text{ m}^{-3}$	—
Substrato argiloso							
Controle	57,45	4,9	20,7	2,22	0,14	0,55	0,159
P1_IN1	208,52*	28,95*	3733,6*	1,87	18,3*	0,57	0,543*
P1_IN2	150,35	13,64	7676,8*	2,12	22,7*	0,60	0,461*
P1_S/IN	144,12	31,48*	5252,8*	2,34	23,2*	0,57	0,299
P2_IN1	388,12*	27,21*	1082,4	0,48	23*	0,57	0,241
P2_IN2	115,66	10,7	841,9	1,96	19,8*	0,57	0,29
P2_S/IN	124,61	21,22*	584,8	1,55	21,5*	0,58	0,211
S/P_IN1	310,25*	25,56*	105,2	0,96	14,9*	0,59	0,186
S/P_IN2	492,20*	30,76*	78,8	0,33*	5,84	0,58	0,266
S/P_S/IN	256,38*	34,46*	55,2	0,66*	14,6*	0,60	0,192
DMS	145,45	13,24	1583,1	1,39	7,51	—	0,237
Substrato Arenoso							
Controle	49,37	7,76	41,6	2,08	3,12	0,47	0,144
P1_IN1	108,06	8,95	3598,4	1,38	2,28	0,45	0,224
P1_IN2	138,1	8,16	6190,0*	0,9	2,64	0,47	0,330
P1_S/IN	137,95	8,65	11949,6*	1,27	2,62	0,48	0,299
P2_IN1	78,28	4,61	903,2	1,75	2,61	0,43	0,242
P2_IN2	299,13*	8,25	1097,6	0,41	2,88	0,47	0,215
P2_S/IN	46,59	10,17	825,9	2,68	2,48	0,43	0,228
S/P_IN1	112,34	11,10	122,4	0,90*	2,86	0,45	0,117
S/P_IN2	185,81*	9,89	66,4	0,51*	2,57	0,47	0,106
S/P_S/IN	197,48*	10,17	52,0	0,56*	2,33	0,46	0,125
DMS	103,7	—	4675,0	1,39	—	—	—

Tratamentos	CBM	NBM	ESPT	qCO_2	ADA a	PT	IEA
	($\mu\text{g g solo}^{-1}$)		(esporos g solo^{-1})	($\mu\text{g C-CO}_2$ mg CBM g solo h^{-1})	(%)	$\text{m}^3 \text{m}^{-3}$	—
Resíduo de mineração							
Controle	84,04	3,85	1305,6	1,10	0,37	0,42	0,127
P1_IN1	84,35	4,38	923,2	0,12	0,45	0,46	0,210
P1_IN2	78,82	3,36	963,2	0,18	0,58	0,47	0,452*
P1_S/IN	69,20	3,74	1848,8*	0,10	0,56	0,52*	0,321
P2_IN1	79,61	7,15	139,2*	0,35	1,56*	0,49*	0,133
P2_IN2	119,23	6,37	58,4*	0,21	1,45*	0,50*	0,113
P2_S/IN	80,79	14,03*	72,4*	0,43	1,51*	0,48*	0,105
S/P_IN1	48,01	4,29	120,0*	0,30	1,01	0,49*	0,121
S/P_IN2	34,78*	3,93	41,4*	1,13	0,74	0,46	0,180
S/P_S/IN	147,88*	8,71*	116,8*	0,21	0,66	0,50*	0,058
DMS	45,91	3,86	461,5	—	0,78	0,07	0,198

(*) contrastes em relação ao controle com diferenças mínimas significativas (DMS) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Redução em relação ao controle são indicadas por valores de médias sublinhadas. Controle: tratamento sem plantas, inóculos e adição de nutrientes. Efeito de plantas: P1: braquiária; P2: amendoim forrageiro e S/P: ausência de plantas. Efeito de inóculos: IN1: *Piriformospora indica*; IN2: mix com fungos micorrízicos arbusculares (mix-FMA) e S/IN: ausência de inóculos. CBM: carbono da biomassa microbiana; NBM: nitrogênio da biomassa microbiana; ESPT: número de esporos totais; qCO_2 : quociente metabólico; ADA: argila dispersa em água; ID: índice de dispersão; IEA: índice de estabilidade de agregados e PT: porosidade total.

a redução das doses e acúmulo de nutrientes nos tecidos vegetais, que inclusive foram retirados após as podas. Incrementos dos teores de NBM também foram verificados no solo argiloso na ausência de plantas pelos mesmos possíveis motivos apresentados para CBM. Outros incrementos de NBM nesse mesmo solo foram verificados com o uso de ambas as plantas sem inoculação ou inoculadas com *P. indica*.

O quociente metabólico (qCO_2) foi reduzido na ausência de plantas nos substratos argiloso e arenoso, não sendo afetado no resíduo de mineração. A única exceção foi o tratamento sem plantas com inoculação com *P. indica* no substrato argiloso (S/P_IN1), que não diferiu do controle quanto aos valores de qCO_2 . Os resultados obtidos sugerem que a microbiota presente nos tratamentos sem plantas possuía melhor eficiência na metabolização do C (Gomez et al., 2009; García-Orenes et al., 2010; Hu et al., 2011) e

corroboram a indicação da presença de microrganismos autotróficos nesses tratamentos que são os mais capazes de se desenvolver adequadamente nesse tipo de situação.

O número de esporos totais (ESPT) foi incrementado na presença da braquiária nos substratos argiloso e arenoso, salvo quando se inoculou com *P. indica* no solo arenoso. Por outro lado, no resíduo de mineração predominou a redução de ESPT nos tratamentos com amendoim e sem plantas, com número de esporos estatisticamente igual ao controle na presença da braquiária. Embora ambas as plantas utilizadas sejam consideradas micotróficas (Angelini et al., 2012), os resultados indicam melhor desempenho da braquiária na produção de esporos. Além disso, o fato de o amendoim não ter se desenvolvido durante todo o experimento, pode ter contribuído para a redução do número de esporos neste substrato. O maior valor de ESPT no controle do resíduo de mineração pode estar relacionado com esporos oriundos das áreas adjacentes à bacia de deposição e que permaneceram dormentes pela falta condições químicas adequadas à germinação (Moreira e Siqueira, 2006).

Os tratamentos afetaram a dispersão de argila no substrato argiloso. Os valores de argila dispersa em água (ADA) foram incrementados em relação ao controle nesse solo, à exceção do tratamento sem planta e inoculação com mix-FMA (S/P_IN2) e *P. indica* (S/P_IN1). Os incrementos de ADA podem estar mais associados aos efeitos dispersivos de corretivos e nutrientes (Spera et al., 2008; Auler et al., 2017) do que às alterações na estrutura promovidas pelos tratamentos. Adicionalmente, os baixos teores ADA no controle desse substrato revelam seu alto estado de floculação natural, coerente com o horizonte subsuperficial que naturalmente possui pequena quantidade de cargas, baixa atividade da argila e predomínio do Al no complexo de troca (Ferreira, 2010). No substrato arenoso, os tratamentos não afetaram a dispersão de argilas. Por outro lado, no resíduo de mineração foram verificados incrementos de ADA na presença do amendoim. Entretanto, os baixos teores de argila total desse substrato, variando entre 0,37 a 1,56 %, indicam baixa relevância prática nos valores de ADA.

A porosidade total (PT) não foi afetada nos solos arenoso e argiloso. No resíduo de mineração verificou-se elevação do volume de poros na maioria dos tratamentos, a exceção da braquiária inoculada (P1_IN1 e P1_IN2), bem como na ausência de plantas e inoculação com mix-FMA (S/P_IN2). As variações observadas na porosidade total são de difícil explicação, pois não possuem uma relação coerente com o efeito de plantas e, ou inóculos.

Os tratamentos afetaram pouco a estabilidade de agregados nos três substratos utilizados. No solo argiloso, a agregação foi incrementada apenas com o uso de braquiária

inoculada (P1_IN1 e P1_IN2) e, no resíduo de mineração, o mesmo efeito foi observado somente com braquiária inoculada com mix-FMA (P1_IN2). No substrato arenoso o índice de estabilidade de agregados (IEA) não foi afetado. Esses efeitos mais limitados foram todos associados à braquiária inoculada, indicando a importância da ação conjunta dos fatores planta e microrganismo sobre a estrutura do solo. O papel desses fatores dá-se pela ação mecânica sobre as partículas minerais que são deslocadas pelo crescimento e absorção de água e nutrientes efetuado por raízes, hifas fúngicas e até mesmo bactérias e, pela ação química deste agente, via liberação de polímeros com propriedades ligantes (Dorioz et al., 1993; Leifheit et al., 2014; Wu et al., 2014)

Comparação entre tratamentos: efeito de planta

Não se verificou efeito da interação entre as fontes de variação planta e inóculo nas características percentagem de colonização de raízes (COL), densidade de raízes (DSR), quociente metabólico (qCO_2), massa seca de plantas (MSP), volume de macroporos (PMA), argila dispersa em água (ADA) e índice de estabilidade de agregados (IEA). Por outro lado, e, para essas mesmas variáveis, verificou-se efeito das plantas utilizadas dentro de cada substrato (Figuras 1 e 2).

A percentagem de colonização de raízes no solo arenoso foi maior com o uso de braquiária (COL = 66,7 %) do que com amendoim (COL = 41,9 %), não se verificando diferenças no solo argiloso (Figura 1A). A gramínea também apresentou vantagens em termos das características fitotécnicas produção de massa seca e densidade de raízes nos dois solos. Na comparação com o amendoim, o uso da braquiária proporcionou incrementos de 44,6 e 55,3 % nos valores de DSR (Figura 1B) e de 38,5 e 52,5 % nos valores de MSP (Figura 1C) para os substratos argiloso e arenoso, respectivamente. As plantas de amendoim não se desenvolveram no resíduo de mineração, onde apenas a braquiária foi capaz de se estabelecer, dessa forma e como mencionado anteriormente, não há dados relacionados às características fitotécnicas.

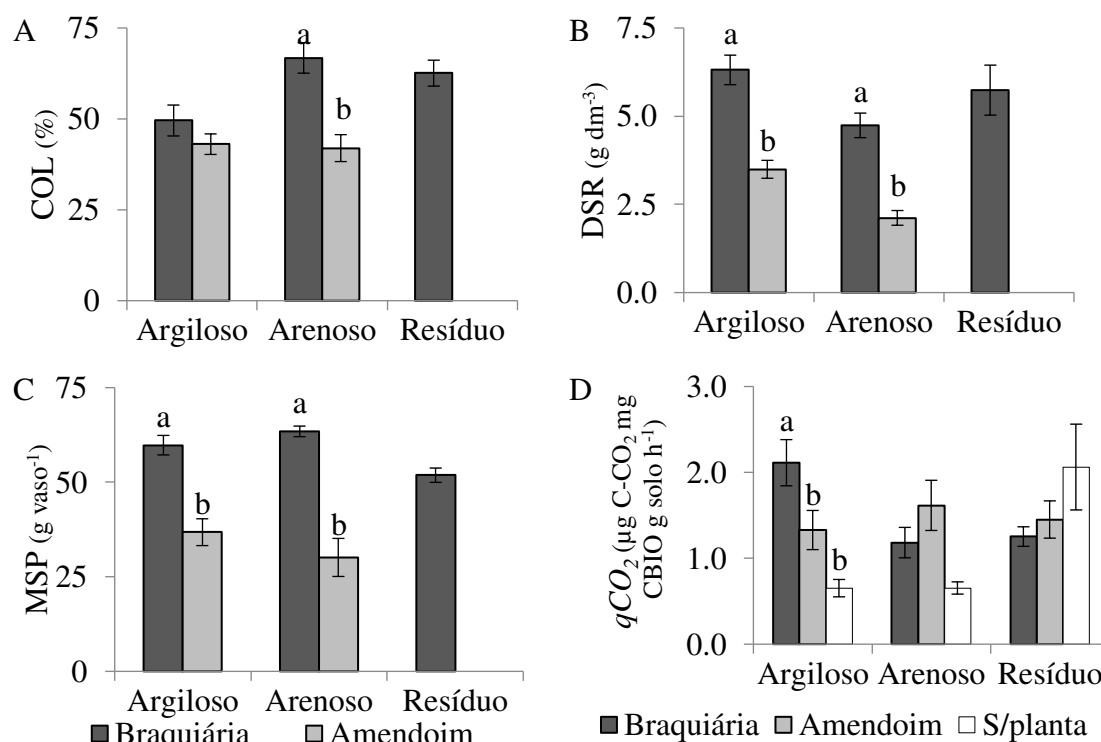


Figura 1 – Efeito do uso de diferentes plantas sobre as características microbiológicas e fitotécnicas em diferentes substratos (argiloso, arenoso e resíduo): COL: percentagem de colonização (A), DSR: densidade de raízes (B), MSP: massa seca de plantas (C), qCO_2 : quociente metabólico microbiano (D). Médias seguidas por mesma letra dentro de cada substrato não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os resultados de colonização de raízes não corroboram outros estudos que indicam maior micotrofia para leguminosas em relação às gramíneas (Miranda et al., 2010, 2016). Dois fatores podem ser considerados para explicar esses resultados. Por um lado, o melhor desenvolvimento da braquiária nos vasos, como indicado pelos valores de MSP e DSR, podem ter contribuído para a maior colonização da gramínea. Contudo, não pode ser descartada a importância da colonização para o desenvolvimento das plantas e, desta forma, uma maior colonização pode ter contribuído para um melhor desenvolvimento da gramínea.

Diferenças em termos de quociente metabólico (qCO_2) foram verificadas apenas no substrato argiloso, no qual o uso da braquiária incrementou os valores de qCO_2 em 37,0 e 69,2% em relação ao uso do amendoim e da ausência de plantas, respectivamente (Figura 1D). Essa variável é associada ao estresse da microbiota total do solo, que foi incrementado com a presença da braquiária. No caso do uso do amendoim e na ausência de plantas, o estresse foi menor possivelmente e respectivamente, pelas melhores

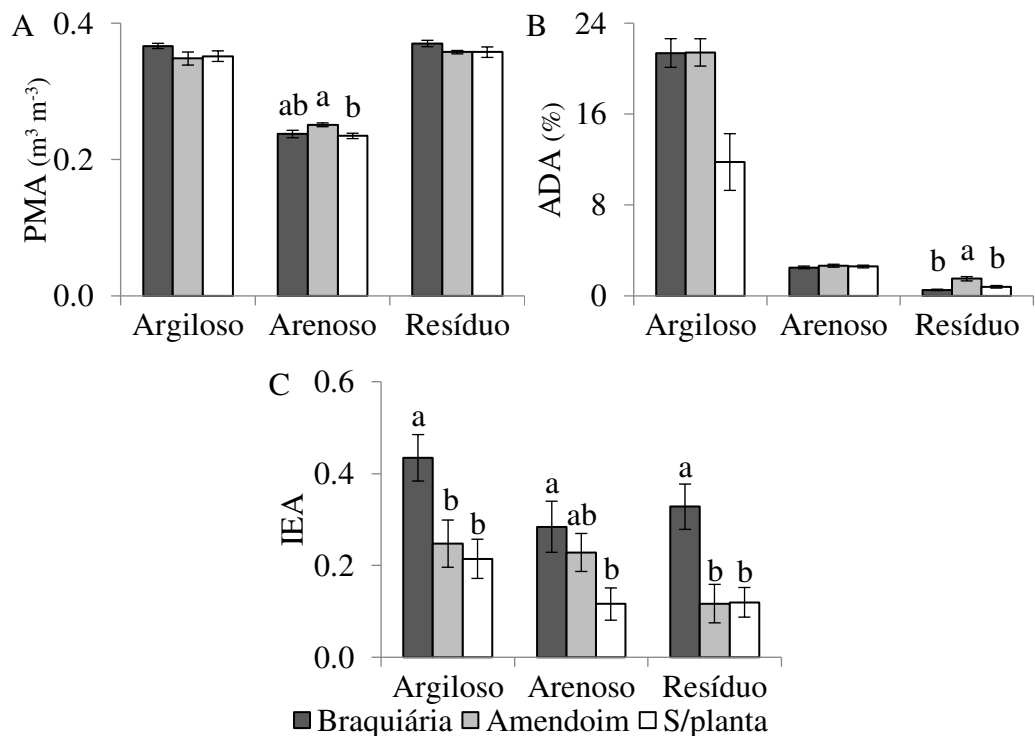


Figura 2 – Características físicas de diferentes substratos (argiloso, arenoso e resíduo): PMA: macroporosidade (A), ADA: argila dispersa em água (B), IEA: índice de estabilidade de agregados (C). Médias seguidas por mesma letra dentro de cada substrato não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

condições em função da presença de uma planta fixadora de nitrogênio e pelo desenvolvimento de grupos autotróficos. O menor estresse nos vasos sem plantas pode ser associado à boas condições para o desenvolvimento de algas e cianobactérias proporcionadas pela maior disponibilidade de nutrientes e luz. Vale ressaltar que os valores de qCO_2 indicam as condições enfrentadas por toda a microbiota do solo e não necessariamente refletem a situação enfrentada pelo grupo dos microrganismos inoculados.

As características físicas foram pouco influenciadas pelos tratamentos depois dos 16 meses de cultivo. O processo de peneiramento e a homogeneização do tamanho dos agregados para o preenchimento dos vasos (≥ 2 mm) pode ter dado certa uniformidade ao substrato onde as plantas se desenvolveram. Algumas diferenças foram verificadas nas variáveis macroporosidade (PMA), argila dispersa em água (ADA) e índice de estabilidade de agregados (Figura 2).

Os valores de PMA e ADA foram apenas e pouco afetados no substrato arenoso e no resíduo, respectivamente. Por sua vez, o índice de estabilidade de agregados (IEA) foi

incrementado pela braquiária nos três substratos (Figura 2C). Os incrementos de agregação com a braquiária superaram o obtido com o amendoim e ausência de plantas em 43,1 e 50,7% no substrato argiloso, respectivamente. No caso do resíduo, esse incremento superou em mais de 63 % a agregação obtida com os demais tratamentos, sendo que o amendoim foi cultivado por cerca de cinco meses. Esse resultado indica o efeito estruturador das raízes da braquiária (Pérès et al., 2013), sendo também reflexo da maior produção de raízes dessa gramínea, como indicado pelos valores de DSR (Figura 1B). Uma interessante observação verificada por ocasião da análise da estabilidade de agregados foi a presença de raízes dentro dos agregados dos substratos cultivado com a braquiária, indicando a contribuição da região da rizosfera no processo de agregação do solo. Essa é uma característica que deveria ser melhor explorada em processos de recuperação de áreas alteradas, sendo importante a reavaliação da restrição de uso de plantas exóticas em práticas de remediação adotada por órgãos ambientais.

Comparação entre tratamentos: efeito de inóculo

A fonte de variação inóculo afetou as variáveis percentagem de colonização de raízes (COL) e massa seca de plantas (MSP) nos substratos arenoso e resíduo, respectivamente (Figura 3). O inóculo mix-FMA incrementou a COL e MSP em 28,4 e 18% em relação ao *P. indica*, mas não diferiu da ausência de inóculo. Os resultados observados demonstram que a simbiose de maior eficiência ocorreu com as micorrizas arbusculares, embora a espécie *P. indica* seja considerada promotora de crescimento vegetal (Qiang et al., 2012; Varma et al., 2012; Gill et al., 2016).

A capacidade de estímulo ao crescimento vegetal por fungos micorrízicos arbusculares está relacionada diretamente ao sucesso da simbiose que, consequentemente, depende do microbionte (fungo) e do hospedeiro (planta). Em relação ao fungo, os principais fatores relacionados a este processo são taxa de germinação, colonização, crescimento, capacidade de absorção de água e nutrientes pelas hifas além de outros fatores como dormência e capacidade de esporulação. Com relação às plantas, dentre os fatores destacam-se, susceptibilidade a colonização, taxa de crescimento, tipo e área de superfície radicular, pelos radiculares, demanda e taxa de absorção de nutrientes, suscetibilidade a estresse e doenças dentre outros (Moreira e Siqueira, 2006).

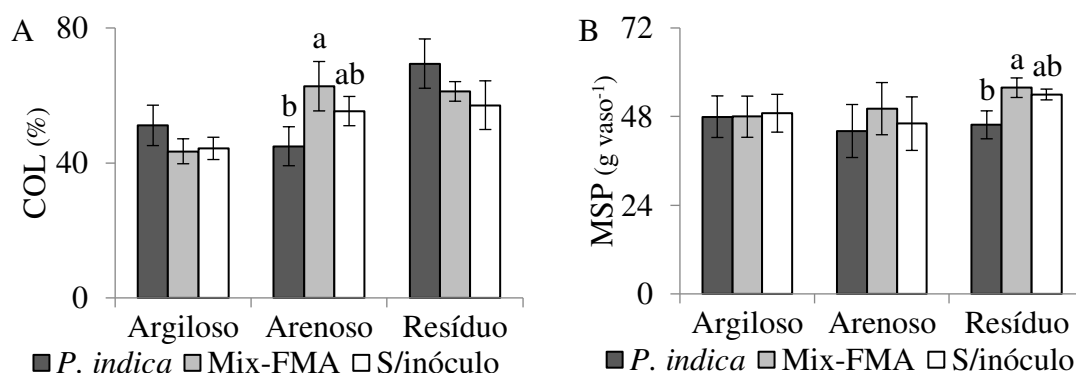


Figura 3 – Efeito da inoculação sobre percentagem de colonização de raízes (A) e massa seca de plantas (B). Comparações entre inóculos efetuada por teste de Tukey ($p < 0,05$).

Uma vez estabelecida a simbiose, dentre as vantagens adquiridas pelas plantas destacam-se: maior absorção de água e nutrientes, em especial P e micronutrientes; melhor balanço nutricional; alterações bioquímicas e fenológicas; tolerância à estresses bióticos e abióticos; além de fatores indiretos como melhoria na agregação do solo (Costa et al., 2010; Folli-Pereira et al., 2012; Lehmann et al., 2014; Leifheit et al., 2014; Augé et al., 2015; Rillig et al., 2015; Bennett et al., 2017)

Comparação entre tratamentos: interação inóculo x planta

Para as variáveis C e N da biomassa microbiana (CBM e NBM), quociente metabólico (qCO_2), número de esporos totais (ESPT) e argila dispersa em água (ADA) verificou-se efeito da interação planta vs inóculo (Tabela 3).

Não se verificou efeito das plantas no teor de CBM na ausência de inóculo no substrato argiloso e na presença do *P. indica* e nos demais substratos. Incrementos de CBM proporcionados pelo amendoim ocorreram quando se inoculou *P. indica* no substrato argiloso, embora não tenha diferido da ausência de plantas. Incrementos da mesma variável também foram verificados quando se utilizou amendoim associado com mix-FMA nos demais substratos, sendo que no resíduo não diferiu do tratamento com braquiária. Por outro lado, a ausência de plantas elevou os teores de CBM na presença do mix-FMA no substrato argiloso e na ausência de inóculo nos demais substratos, indicando que nestes casos, o uso de plantas não foi eficiente em promover o desenvolvimento da microbiota do solo. Não houve efeito de inóculos na presença da braquiária. Os incrementos de CBM proporcionados pelos inóculos foram associados: à aplicação de *P. indica* na presença do amendoim no substrato argiloso e com o uso do mix-FMA tanto na ausência de plantas no substrato argiloso como associado ao amendoim no substrato

Tabela 3 – Características microbiológicas e físicas avaliados em diferentes substratos em resposta ao efeito do uso de plantas e inóculos

	Braquiária	Amendoim	S/planta
CBM ($\mu\text{g g solo}^{-1}$)			
Argiloso			
<i>P. indica</i>	208,52(51,2) b	388,12(68,7) Aa	310,25(26,91) Bab
Mix – FMA	150,35(10,8) b	115,66(26,8) Bb	492,20(39,31) Aa
S/inóculo	144,12(39,4)	124,61(24,5) B	256,38(53,01) B
Arenoso			
<i>P. indica</i>	108,06(18,0)	78,28(6,66) B	112,34(17,11)
Mix – FMA	138,1(14,4) b	299,13(57,39) Aa	185,81(38,28) b
S/inóculo	137,95(30,9) ab	46,59(4,55) Bb	197,48(37,31) a
Resíduo			
<i>P. indica</i>	84,35(2,3)	79,61(4,68)	48,01(5,44) B
Mix – FMA	78,82(6,6) ab	119,23(10,97) a	34,78(10,04) Bb
S/inóculo	69,2(2,2) b	80,79(10,27) b	147,88(29,80) Aa
NBM ($\mu\text{g g solo}^{-1}$)			
Argiloso			
<i>P. indica</i>	28,95(4,9) A	27,21(5,7) A	25,56(3,11)
Mix – FMA	13,64(2,4) Bb	10,70(1,7) Bb	30,76(7,17) a
S/inóculo	31,48(2,5) Aab	21,22(3,6) ABb	34,46(3,97) a
Resíduo			
<i>P. indica</i>	4,38(0,4)	7,15(0,68) B	4,29(0,97) B
Mix – FMA	3,36(0,8)	6,37(0,96) B	3,93(0,94) B
S/inóculo	3,74(0,7) c	14,03(2,01) Aa	8,71(1,01) Ab
qCO₂ ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ mg CBM g solo h}^{-1}$)			
Arenoso			
<i>P. indica</i>	1,38(0,4) ab	1,75(0,35) Ba	0,89(0,16) b
Mix – FMA	0,90(0,2)	0,41(0,14) C	0,51(0,05)
S/inóculo	1,27(0,3) b	2,68(0,32) Aa	0,56(0,06) b

	Braquiária	Amendoim	S/planta
qCO₂ (µg C-CO₂ mg CBM g solo h⁻¹)			
Resíduo			
<i>P. indica</i>	0,79(0,1)	1,71(0,10)	1,54(0,06) B
Mix – FMA	1,48(0,1) b	0,84(0,07) b	3,82(0,07) Ba
S/inóculo	1,48(0,1)	1,80(0,06)	8,26(0,03) A
ESPT (esporos g solo⁻¹)			
Argiloso			
<i>P. indica</i>	3733,6(1074,8) Ba	1082,4(291,5) b	105,2(46,1) b
Mix – FMA	7676,8(565,0) Aa	841,9(138,2) b	78,8(20,5) b
S/inóculo	5252,8(824,2) Ba	584,8(177,8) b	55,2(7,4) b
Arenoso			
<i>P. indica</i>	3598,4(997,9) B	903,2(211,2)	122,4(35,9)
Mix – FMA	6190(646,2) Ba	1097,6(248,4) b	66,4(20,7) b
S/inóculo	11950(3932,6) Aa	825,9(197,7) b	52,0(6,6) b
Resíduo			
<i>P. indica</i>	923,2(132,6) Ba	139,2(26,67) b	120,0(12,07) b
Mix – FMA	963,2(218,4) Ba	58,4(19,12) b	41,4(57,72) b
S/inóculo	1848,8(306,7) Aa	72,4(8,45) b	116,8(20,45) b
ADA (%)			
Argiloso			
<i>P. indica</i>	18,25(2,7) ab	23,02(1,5) a	14,89(4,99) Ab
Mix – FMA	22,72(2,0) a	19,81(2,8) a	5,84(2,61) Bb
S/inóculo	23,16(1,4) a	21,45(1,9) ab	14,62(4,52) Ab

Letras maiúsculas comparam a fonte de variação inóculo na coluna e minúsculas, planta na linha pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores entre parêntesis representam o erro padrão da média. CBM: carbono da biomassa microbiana; NBM: nitrogênio da biomassa microbiana; ESPT: número de esporos totais; qCO₂: quociente metabólico microbiano; ADA: argila dispersa em água.

arenoso. Uma observação interessante no resíduo de mineração foi o maior teor de CBM associado à ausência de plantas, resultado que somente pode ser explicado pela contribuição da microbiota nativa, principalmente a autotrófica.

As plantas afetaram os teores de NBM apenas nos substratos argiloso e no resíduo. Não se verificou efeito de plantas quando da inoculação com *P. indica*. no substrato

argiloso e dos dois inóculos no resíduo de mineração. Os maiores teores de NBM no substrato argiloso foram observados na ausência de plantas associada à microbiota nativa e à inoculação com mix-FMA. No resíduo, os maiores teores de NBM foram observados com onde houve a leguminosa na ausência de inóculo. A não adição de inóculos proporcionou maiores teores de NBM no substrato argiloso em ambas as plantas, e quando associado à leguminosa ou à ausência de plantas no resíduo (condições de certo modo similares pelo tempo de cultivo da leguminosa). Maiores teores dessa variável também foram verificados com o uso de *P. indica* no substrato argiloso na presença de plantas.

O quociente metabólico (qCO_2) foi influenciado pelos tratamentos nos substratos arenoso e resíduo. No substrato arenoso não se verificou efeito de plantas quando o inóculo mix-FMA foi utilizado e os maiores teores de qCO_2 foram associados ao uso do amendoim e da braquiária com inoculação de *P. indica*. Por outro lado, no resíduo efeito das plantas foi observando apenas na presença do mix-FMA, havendo redução de qCO_2 com uso das plantas. Efeitos de inóculos foram observados apenas na presença do amendoim no substrato arenoso e na ausência de plantas no resíduo. Nos dois casos, os inóculos reduziram o qCO_2 nos dois substratos.

O número de esporos totais (ESPT) foi afetado pelos tratamentos nos três substratos avaliados. Maiores valores de ESPT foram associados ao uso da braquiária independentemente do inóculo utilizado, salvo com a inoculação de *P. indica* no substrato arenoso. Efeito de inóculos somente foram verificados com o uso da braquiária, com maiores valores associados à inoculação com mix-FMA no substrato argiloso e com a microbiota nativa nos demais substratos.

Efeito dos tratamentos na característica argila dispersa em água (ADA) somente foi verificado no substrato argiloso. A presença de plantas aumentou a dispersão de argila independentemente do uso ou não de inóculos. Por outro lado, efeito de inóculos foi restrito à ausência de plantas, onde a inoculação com mix-FMA reduziu os valores de ADA.

Os resultados apresentados previamente indicam melhor qualidade do solo associado às características CBM, NBM e qCO_2 com o uso de amendoim em comparação com a braquiária, mesmo que melhores valores dessas variáveis tenham sido também observados na ausência de plantas, especialmente para CBM e o qCO_2 . Neste caso e também como já discutido previamente, a presença de microrganismos autotróficos na ausência de plantas durante a condução do experimento pode ter contribuído para com a elevação dos valores de CBM e redução do qCO_2 . Apesar de não ter sido foco principal

do estudo, o efeito destes microrganismos deve ser considerado uma vez que eles apresentam importante papel na fixação de C no solo, especialmente na ausência ou restrição de vegetação (Guo et al., 2015). Essa microbiota foi favorecida, uma vez que a ausência de plantas permite maior incidência de luz e maior disponibilidade de água e nutrientes (Davies et al., 2017). Por sua vez, os benefícios do uso do amendoim em relação à gramínea podem ser associados à sua capacidade de fixação de N, o que permite aporte ao solo de compostos mais ricos em N e de mais fácil decomposição (Breulmann et al., 2012).

Os resultados observados sugerem viabilidade de uso dos inóculos avaliados nos substratos argiloso e arenoso, como indicado pelas respostas positivas nas características CBM, NBM e qCO_2 . Por outro lado, é verdade que, em alguns casos, a ausência de inóculos também proporcionou bons resultados dessas mesmas variáveis. Por sua vez, o uso de inóculos não resultou em melhorias nas características microbiológicas quando do uso de resíduo de mineração, exceto para o qCO_2 , que foi reduzido com a inoculação com *P. indica* e mix-FMA. Os dados coletados demonstram não ter havido boa adaptação dos microrganismos inoculados em relação à microbiota nativa neste resíduo, tendo em vista se tratar de um meio inóspito, onde o desenvolvimento de microrganismos é restringido.

Uma das possibilidades de comprometimento do desenvolvimento de FMAs em áreas perturbadas por mineração pode ser a presença de metais pesados (Yang et al., 2017). Além disso, a própria natureza do substrato, pobre em nutrientes e carente de boa estrutura, dificulta o crescimento de microrganismos, sendo verificada frequentemente vantagem da microbiota nativa (que muitas vezes coloniza naturalmente áreas de deposição de resíduo) sobre a exótica nestas situações. Quando da ocorrência de metais pesados, essa vantagem decorre da maior eficiência e, ou capacidade dos grupos nativos promoverem a bioissorção, bioprecipitação, sequestro, transporte e, ou quelatação, o que ameniza ou anula o efeito de elementos tóxicos (Haferburg e Kothe, 2007).

Por outro lado, e considerando ainda as características microbiológicas, o número de esporos totais aumentou com o uso da braquiária, resultado corroborado pela percentagem de colonização (Figura 1A), o que indica preferência ou maior sucesso de colonização na gramínea, muito embora ambas as plantas avaliadas sejam consideradas micotróficas. Em relação aos inóculos, maior eficiência somente foi verificada com a utilização do mix-FMA no substrato argiloso, enquanto nos demais substratos, as espécies nativas de FMA promoveram maior produção de esporos.

No geral, maior resposta dos inóculos quanto às características microbiológicas avaliadas foram obtidas no substrato argiloso, o que pode ser associado ao efeito da

textura no desenvolvimento dos microrganismos. Esse efeito, já observada em outros estudos, tem relação com outras propriedades do solo comandadas pela textura, tais como disponibilidade de água, nutrientes e ar; acúmulo de matéria orgânica, dentre outros (Kaiser et al., 1992; Bach et al., 2010; Chau et al., 2011). Assim, o melhor desenvolvimento da microbiota nativa nos substratos arenoso e resíduo pode ser associado às condições adversas ao crescimento microbiano impostas pela textura para grupos exóticos, que neste caso favoreceram os microrganismos nativos.

A associação inversa entre os teores de argila dispersa em água e carbono da biomassa microbiana ($r = -0,70$, $p < 0,05$) no substrato argiloso (Tabela 3) sugere que microrganismos podem desempenhar um papel importante na melhoria das características físicas do solo. Os menores valores de ADA estiveram associados aos tratamentos sem plantas, indicando ter sido esse efeito decorrente da ação exclusiva dos microrganismos presentes, uma vez que eram os únicos agentes com potencial de alteração da estrutura. Dentre esses microrganismos destacam-se, como já indicado previamente, os grupos autotróficos, que elevaram os teores de CBM. Nossos resultados corroboram o estudo de Maqubela et al. (2009), que verificaram que a inoculação de cianobactérias em solos promoveu o incremento dos teores de C e N e maior estabilidade de agregados, especialmente na ausência de plantas.

A comparação entre os resultados de IEA (Figura 2C) e ADA (Tabela 3) do substrato argiloso indica que os incrementos na estabilidade de agregados foram promovidos com o uso da braquiária, enquanto que as reduções nos teores de argila natural ocorreram na ausência de plantas provavelmente associada com os microrganismos autotróficos que se desenvolveram nestes tratamentos. Esta constatação sugere a atuação duas vias de alteração da estrutura do solo. Uma na presença de plantas nos três substratos avaliados, promovida essencialmente pelas raízes da gramínea, que apresentaram atuação marcante na formação de meso e macro agregados, e outra na ausência de plantas e em substrato argiloso, promovida por grupos de microrganismos autotróficos que, embora não inoculados, desenvolveram-se bem em função das condições ambientais oferecidas e atuaram sobre nano e micro agregados reduzindo a argila dispersa em água.

CONCLUSÕES

Melhoria na qualidade do solo com o uso dos inóculos *Piriformospora indica* e o mix de espécies de FMA estão associados às características microbiológicas principalmente na presença do amendoim forrageiro.

Incrementos na estabilidade de meso e macro agregados dos substratos utilizados são proporcionados pela ação de raízes de plantas, em especial braquiária.

Na ausência de plantas, melhorias na floculação de argilas podem ser promovidas por microrganismos autotróficos nativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez V. VH, Ribeiro AC. Calagem. In: Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez V. VH, organizadores. Recom para uso corretivos e Fertil em Minas Gerais 5ª aproximação. 5º ed Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais; 1999. p. 44–72.
- Anderson TH, Domsch KH. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as ph, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol Biochem*. 1993;25:393–395.
- Angelini GAR, Loss A, Pereira MG, Torres JLR, Saggin OJ. Colonização micorrízica, densidade de esporos e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em solo de Cerrado sob plantio direto e convencional. *Semin Agrar*. 2012;33:115–130.
- Angulo RJ, Roloff G, Souza MLP. Correlações entre diferentes formas de determinação e representação da estabilidade de agregados dos solos. *Rev Bras Ciência do Solo*. 1984;8:7–12.
- Araújo ASF de, Melo WJ de. Soil microbial biomass in organic farming system. *Ciência Rural*. Universidade Federal de Santa Maria; 2010;40:2419–2426.
- Augé RM, Toler HD, Saxton AM. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza*. Springer Berlin Heidelberg; 2015;25:13–24.
- Auler AC, Pires LF, dos Santos JAB, Caires EF, Borges JAR, Giarola NFB. Effects of surface-applied and soil-incorporated lime on some physical attributes of a Dystrudept soil. *Soil Use Manag*. 2017;33:129–140.
- Bach EM, Baer SG, Meyer CK, Six J. Soil texture affects soil microbial and structural recovery during grassland restoration. *Soil Biol Biochem*. Pergamon; 2010;42:2182–2191.
- Bennett JA, Maherali H, Reinhart KO, Lekberg Y, Hart MM, Klironomos J. Plant-soil feedbacks and mycorrhizal type influence temperate forest population dynamics. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2017;355:181–184.
- Breulmann M, Schulz E, Weißhuhn K, Buscot F. Impact of the plant community composition on labile soil organic carbon, soil microbial activity and community structure in semi-natural grassland ecosystems of different productivity. *Plant Soil*. Springer Netherlands; 2012;352:253–265.
- Chau JF, Bagtzoglou AC, Willig MR. The Effect of Soil Texture on Richness and

- Diversity of Bacterial Communities. *Environ Forensics*. Taylor & Francis Group ; 2011;12:333–341.
- Costa N de L, Paulino VT, Costa RSC da, Pereira RG de A, Townsend CR, Magalhães JA. Efeito de micorrizas arbusculares sobre o crescimento e nutrição mineral de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. *Ciência Anim Bras*. Universidade Federal de Goiás; 2010;13:406–411.
- Davies TKR, Lovelock CE, Pettit NE, Grierson PF. Short-term microbial respiration in an arid zone mangrove soil is limited by availability of gallic acid, phosphorus and ammonium. *Soil Biol Biochem*. Pergamon; 2017;115:73–81.
- Dorioz JM, Robert M, Chenu C. The role of roots, fungi and bacteria on clay particle organization. An experimental approach. *Geoderma*. Elsevier; 1993;56:179–194.
- Embrapa. Manual de Métodos de Análise de Solo. 2 Revisada. Embrapa; 2011.
- Fanin N, Hättenschwiler S, Schimann H, Fromin N. Interactive effects of C, N and P fertilization on soil microbial community structure and function in an Amazonian rain forest. Bailey JK, organizador. *Funct Ecol*. 2015;29:140–150.
- Ferreira MM. Caracterização física do solo. In: van Lier QJ, organizador. *Física do solo*. 1º ed Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; 2010. p. 1–28.
- Folli-Pereira M da S, Meira-Haddad LS, Bazzolli DMS, Kasuya MCM. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. *Rev Bras Ciência do Solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; 2012;36:1663–1679.
- Fontes JG de G, Fagundes JL, Backes AA, Barbosa LT, Cerqueira ESA, Silva LM da, Morais JA da S, Vieira JS, Vieira JS. Acúmulo de massa seca em cultivares de *Brachiaria brizantha* submetida a intensidades de desfolhação. *Semin Ciências Agrárias*. 2014;35:1425.
- García-Orenes F, Guerrero C, Roldán A, Mataix-Solera J, Cerdà A, Campoy M, Zornoza R, Bárcenas G, Caravaca F. Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil Tillage Res*. Elsevier; 2010;109:110–115.
- Gerdemann JW, Nicolson TH. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc*. 1963;46:235–244.
- Ghiberto PJ, Imhoff S, Libardi PL, Silva ?lvaro Pires da, Tormena CA, Pilatti M ?ngel, Ghiberto PJ, Imhoff S, Libardi PL, Silva ÁP da, Tormena CA, Pilatti MÁ. Soil physical quality of Mollisols quantified by a global index. *Sci Agric. Scientia Agricola*; 2015;72:167–174.
- Gill SS, Gill R, Trivedi DK, Anjum NA, Sharma KK, Ansari MW, Ansari AA, Johri AK, Prasad R, Pereira E, Varma A, Tuteja N. *Piriformospora indica*: Potential and Significance in Plant Stress Tolerance. *Front Microbiol*. Frontiers Media SA; 2016;7:332.
- Gomez E, Ferreras L, Lovotti L, Fernandez E. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *Eur J Soil Biol*. Elsevier Masson; 2009;45:163–167.
- Gomide PHO, Santos JGD dos, Siqueira JO, Soares CRFS. Diversidade e função de fungos micorrízicos arbusculares em sucessão de espécies hospedeiras. *Pesqui Agropecuária Bras*. 2009;44:1483–1490.
- Guo G, Kong W, Liu J, Zhao J, Du H, Zhang X, Xia P. Diversity and distribution of autotrophic microbial community along environmental gradients in grassland soils on the Tibetan Plateau. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99:8765–8776.
- Haferburg G, Kothe E. Microbes and metals: interactions in the environment. *J Basic Microbiol*. WILEY-VCH Verlag; 2007;47:453–467.
- Helliwell JR, Miller AJ, Whalley WR, Mooney SJ, Sturrock CJ. Quantifying the impact of microbes on soil structural development and behaviour in wet soils. *Soil Biol Biochem*. Pergamon; 2014;74:138–147.

- Hu J, Lin X, Wang J, Dai J, Chen R, Zhang J, Wong MH. Microbial functional diversity, metabolic quotient, and invertase activity of a sandy loam soil as affected by long-term application of organic amendment and mineral fertilizer. *J Soils Sediments*. Springer-Verlag; 2011;11:271–280.
- Hunke P, Mueller EN, Schröder B, Zeilhofer P. The Brazilian Cerrado: Assessment of water and soil degradation in catchments under intensive agricultural use. *Ecohydrology*. 2015;8:1154–1180.
- Imeson AC, Vis M. Assessing soil aggregate stability by water-drop impact and ultrasonic dispersion. *Geoderma*. 1984;34:185–200.
- Islam KR, Weil RR. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. *Biol Fertil Soils*. Springer-Verlag; 1998;27:408–416.
- Jenkins WR. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis Report*. 1964;48:692.
- Kaiser EA, Mueller T, Joergensen RG, Insam H, Heinemeyer O. Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter. *Soil Biol Biochem*. Pergamon; 1992;24:675–683.
- Karlen D, Mausbach M, Doran J, Cline R, Harris R, Schuman G. Soil quality: A concept, definition, and framework for evaluation. *Soil Sci Soc Am J*. 1997;61:4–10.
- Lehmann A, Veresoglou SD, Leifheit EF, Rilling MC. Arbuscular mycorrhizal influence on zinc nutrition in crop plants – A meta-analysis. *Soil Biol Biochem*. Pergamon; 2014;69:123–131.
- Leifheit EF, Veresoglou SD, Lehmann A, Morris EK, Rilling MC. Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation—a meta-analysis. *Plant Soil*. Springer Netherlands; 2014;374:523–537.
- Lima HV de, Silva ÁP da, Giarola NFB, Imhoff S. Index of soil physical quality of hardsetting soils on the brazilian coast. *Rev Bras Ci?ncia do Solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; 2014;38:1722–1730.
- Liu L, Gundersen P, Zhang W, Zhang T, Chen H, Mo J. Effects of nitrogen and phosphorus additions on soil microbial biomass and community structure in two reforested tropical forests. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2015;5:14378.
- Ludwig RL, Lovato T, Pizzani R, Goulart RZ, Schaefer PE. Produção e qualidade do *Arachis pinto*i. *Enciclopédia Biosf*. 2010;6:2–15.
- Maqubela MP, Mkeni PNS, Issa OM, Pardo MT, D'Acqui LP. Nostoc cyanobacterial inoculation in South African agricultural soils enhances soil structure, fertility, and maize growth. *Plant Soil*. Springer Netherlands; 2009;315:79–92.
- McCalla T. Water-drop method of determining stability of soil structure. *Soil Sci*. 1944;58:117–121.
- Miranda EM de, Silva EMR da, Saggin Júnior OJ, Miranda EM de, Silva EMR da, Saggin Júnior OJ. Inoculação micorrízica e adubação fosfatada na produção de mudas de Amendoim Forrageiro. *Rev Ciência Agronômica*. Universidade Federal do Ceará; 2016;47:240–246.
- Miranda EM de, Silva EMR da, Saggin Júnior OJ. Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares associados ao amendoim forrageiro em pastagens consorciadas no Estado do Acre, Brasil. *Acta Amaz*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; 2010;40:13–22.
- Morales VL, Parlange JY, Steenhuis TS. Are preferential flow paths perpetuated by microbial activity in the soil matrix? A review. *J Hydrol*. Elsevier; 2010;393:29–36.
- Moreira FM de S, Siqueira JO. Micorrizas. In: Moreira FM de S, Siqueira JO, organizadores. *Microbiol e bioquímica do solo*. 2º ed Lavras: UFLA; 2006. p. 543–662.
- Oades JM. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for

- management. *Biol Process Soil Fertil.* Dordrecht: Springer Netherlands; 1984. p. 319–337.
- Oades JM. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma.* 1993;56:377–400.
- Peng S, Guo T, Liu G. The effects of arbuscular mycorrhizal hyphal networks on soil aggregations of purple soil in southwest China. *Soil Biol Biochem.* 2013;57:411–417.
- Pérès G, Cluzeau D, Menasseri S, Soussana JF, Bessler H, Engels C, Habekost M, Gleixner G, Weigelt A, Weisser WW, Scheu S, Eisenhauer N. Mechanisms linking plant community properties to soil aggregate stability in an experimental grassland plant diversity gradient. *Plant Soil.* Springer Netherlands; 2013;373:285–299.
- Qiang X, Weiss M, Kogel K-H, Schäfer P. *Piriformospora indica*-a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. *Mol Plant Pathol.* Blackwell Publishing Ltd; 2012;13:508–518.
- Ren C, Zhang W, Zhong Z, Han X, Yang G, Feng Y, Ren G. Differential responses of soil microbial biomass, diversity, and compositions to altitudinal gradients depend on plant and soil characteristics. *Sci Total Environ.* 2017;610–611:750–758.
- Rillig MC, Aguilar-Trigueros CA, Bergmann J, Verbruggen E, Veresoglou SD, Lehmann A. Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. *New Phytol.* 2015;205:1385–1388.
- Silva RR da, Silva MLN, Cardoso EL, Moreira FM de S, Curi N, Alovizi AMT. Biomassa e atividade microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica Campos das Vertentes - MG. *Rev Bras Ciência do Solo.* 2010;34:1584–1592.
- Spera ST, Denardin JE, Escosteguy PAV, Santos HP dos, Figueroa EA. Dispersão de argila em microagregados de solo incubado com calcário. *Rev Bras Ciência do Solo.* Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; 2008;32:2613–2620.
- Sun S, Xing F, Zhao H, Gao Y, Bai Z, Dong Y. Response of bacterial community to simulated nitrogen deposition in soils and a unique relationship between plant species and soil bacteria in the Songnen grassland in Northeastern China. *J soil Sci plant Nutr.* Chilean Society of Soil Science; 2014;14:0–0.
- Treseder KK. Nitrogen additions and microbial biomass: a meta-analysis of ecosystem studies. *Ecol Lett.* 2008;11:1111–1120.
- Treseder KK. The extent of mycorrhizal colonization of roots and its influence on plant growth and phosphorus content. *Plant Soil.* Springer Netherlands; 2013;371:1–13.
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem.* 1987;19:703–707.
- Varma A, Bakshi M, Lou B, Hartmann A, Oelmueller R. *Piriformospora indica*: A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. *Agric Res.* Springer-Verlag; 2012;1:117–131.
- Vitória EL da, Fernandes HC, Teixeira MM, Cecon PR, Lacerda EDG. Correlação linear e espacial entre produtividade de *Brachiaria brizantha*, densidade do solo e porosidade total em função do sistema de manejo do solo. *Eng Agrícola.* Associação Brasileira de Engenharia Agrícola; 2012;32:909–919.
- Wang Y, Zhou L, Wu J, Butterly CR, Tang C, Xu J. Soil Microbial Biomass and pH as Affected by the Addition of Plant Residues. In: Xu J, Huang PM, organizadores. *Mol Environ Soil Sci Interfaces Earth's Crit Zo.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 320–322.
- Waugh DL, Fitts J. Estudios de interpretación de análisis de suelo: Laboratorio y macetas. Boletín técnico 3. Raleigh, NC, USA: International Soil Testing; 1966.
- Wright SF, Upadhyaya A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and

- comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.* 1996;61:575–586.
- Wu Q-S, Cao M-Q, Zou Y-N, He X. Direct and indirect effects of glomalin, mycorrhizal hyphae, and roots on aggregate stability in rhizosphere of trifoliate orange. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2014;4:5823.
- Yang Y, He C, Huang L, Ban Y, Tang M. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on glomalin-related soil protein distribution, aggregate stability and their relationships with soil properties at different soil depths in lead-zinc contaminated area. Li J-T, organizador. *PLoS One.* Public Library of Science; 2017;12:e0182264.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos na avaliação de campo das forrageiras indicam que elas apresentam potencial diferenciado de alteração de propriedades do solo e, embora a diversidade de fungos seja similar nas diferentes espécies avaliadas, existem variações quanto à importância dos grupos associados a cada espécie.

Os capins Mombaça, Colonião, Cameron, Marandu, Xaraés, Massai, Tanzânia, Puerária e Andropogom são associados às melhorias dos teores de carbono orgânico no solo, as forrageiras Amendoim, Decumbens e Humidícola apresentam maior potencial para a recuperação física e a leguminosa estilosantes apresenta potencial de melhorias no status de nutrientes do solo. As características que mais discriminam os efeitos do cultivo de forrageiras na qualidade do solo são: os teores de glomalina total e de Ca trocável; a densidade do solo. Os grupos de fungos mais importantes no solo das diferentes forrageiras pertencem à ordem Mortierellales e à família Nectriaceae, embora outros grupos também importantes estejam presentes, mas que não foram identificados em níveis taxonômicos mais específicos.

Apesar das diferenças observadas, no contexto geral, verifica-se homogeneidade entre as características avaliadas, indicando que alterações mais marcantes devem ser associadas ao manejo do solo e não à espécie de forrageira utilizada.

Sob condições controladas observou-se que nos estágios iniciais da reestruturação do substrato, as raízes, especialmente as da braquiária, atuam sobre a estrutura em meso e macroagregados, ao passo, que microrganismos autotróficos atuam sobre a agregação em nível coloidal. O melhor status em termos de características microbiológicas foram obtidos com a inoculação de *Piriformospora indica* e espécies de fungos micorrízicos arbusculares combinada com o uso do amendoim forrageiro.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Material suplementar capítulo 1

Tabela 1 – Estatística descritiva de características químicas, físicas e microbiológicas de solo avaliadas em parcelas cultivadas com 17 forrageiras por mais de dez anos e em área de Mata secundária

	Cbio	Nbio	CN bio	Cmop	CN mop	Cmam	CN mam	Gt	Gfe	<i>qCO</i> ₂	RB	pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	Ds	Dp	Pmi	Pma	Ko	DMP	ADA	argila	silte	Ds raiz	Nº esporos
Forrageiras	(mg g s ⁻¹)									(mg C-CO ₂ Mg C-bio g solo dia ⁻¹) (x e ⁻⁰⁴)	(mg C-CO ₂ g solo dia ⁻¹) (x e ⁻⁰⁴)	(mg dm ⁻³)				(cmol _c dm ⁻³)				(g cm ⁻³)		(m ³ m ⁻³)		(cm h ⁻¹)	(mm)	(%)	(g dm ⁻³)	(esporos cm ⁻³)	
Andropogon ^{An}	372	1121	0,3	3,8	19,8	19,2	10,2	49,8	18,7	0,8	0,3	4,7	2,3	43,3	2,5	0,7	0,1	6,2	1,2	2,6	0,3	0,2	0,1	2,9	19,8	46,9	13,3	3,7	13,1
Tanzânia ^{Pa}	268	1084	0,2	5,4	23,6	20,5	10,3	47,4	18,7	2,5	0,7	5,7	4,4	45,3	3,3	1,1	0,0	5,8	1,2	2,6	0,3	0,2	0,3	2,9	20,6	48,4	11,2	5,8	11,4
Massai ^{Pa}	251	987	0,3	3,4	18,9	18,7	10,1	46,7	18,1	1,3	0,2	4,7	4,1	50,3	2,7	1,0	0,2	7,0	1,3	2,5	0,3	0,2	0,1	2,9	15,7	49,0	9,1	2,7	5,5
Mombaça ^{Pa}	437	1936	0,2	5,1	15,5	21,3	10,1	54,1	21,4	3,4	1,5	5,3	2,5	82,5	2,5	1,0	0,1	6,0	1,2	2,5	0,3	0,2	0,2	3,0	17,1	52,6	10,8	7,3	19,5
Colonião ^{Pa}	425	1237	0,4	6,0	14,7	20,2	9,6	56,7	20,6	2,7	1,1	5,7	2,2	61,0	2,7	1,3	0,0	4,4	1,2	2,6	0,3	0,2	0,2	3,0	18,9	45,8	10,7	3,0	14,9
Cameroon ^{Pa}	538	1381	0,4	4,6	18,7	19,0	9,3	45,0	17,5	3,5	1,9	5,1	4,3	58,7	2,5	0,6	0,2	6,4	1,1	2,6	0,3	0,2	0,2	3,0	14,5	46,5	12,6	4,3	20,5
Tifton ^{Cy}	172	741	0,2	3,0	17,5	15,4	9,1	43,1	16,6	5,8	1,4	4,6	3,1	39,3	2,0	0,7	0,4	6,9	1,3	2,6	0,3	0,2	0,1	3,0	12,3	40,5	11,8	3,5	19,4
Marandu ^{Br}	213	1132	0,2	4,6	19,3	19,4	10,0	47,2	16,6	4,8	0,8	5,5	2,0	49,7	2,0	0,7	0,1	5,2	1,3	2,5	0,3	0,2	0,1	3,0	17,0	49,5	11,0	9,6	28,2
Mulato ^{Br}	114	1227	0,1	4,3	22,8	16,3	9,9	41,8	14,6	6,2	1,0	5,5	1,3	41,0	3,2	1,4	0,0	4,0	1,2	2,5	0,3	0,2	0,0	2,9	17,3	45,9	12,5	6,1	14,5
Xaraés ^{Br}	239	988	0,3	4,2	25,2	17,1	10,2	46,1	18,7	7,3	2,2	5,6	2,5	59,3	3,1	1,1	0,0	4,9	1,3	2,5	0,3	0,2	0,0	3,0	11,7	40,5	10,7	8,7	19,2
Humidícola ^{Br}	553	1159	0,4	2,9	18,4	17,1	9,7	38,9	14,9	3,1	1,7	5,0	4,0	58,0	1,8	0,6	0,2	6,7	1,1	2,6	0,3	0,2	0,4	3,0	14,5	48,1	10,5	4,0	31,6
Ruziziensis ^{Br}	269	1668	0,2	4,0	21,0	18,0	10,0	40,2	15,7	6,2	1,6	5,2	4,4	67,3	1,3	0,5	0,4	6,1	1,1	2,6	0,4	0,2	0,4	2,9	13,2	48,6	12,5	7,1	50,7
Decumbens ^{Br}	413	1273	0,3	3,1	21,8	16,6	10,3	37,6	14,7	3,0	1,7	5,3	3,2	43,0	1,7	0,7	0,1	5,9	1,1	2,6	0,3	0,2	0,3	3,0	13,3	45,3	10,9	7,2	20,5
Gordura ^{Me}	331	600	0,6	1,5	16,2	16,9	9,9	37,6	13,7	2,3	0,8	5,0	3,5	47,7	1,9	0,9	0,1	5,6	1,3	2,6	0,3	0,2	0,0	2,9	19,6	55,1	10,9	2,2	16,4
Amendoim ^{Ar}	127	1277	0,1	3,7	14,1	17,5	9,5	34,7	13,1	9,0	1,8	5,3	2,7	47,7	2,4	0,5	0,2	5,3	1,1	2,6	0,3	0,2	0,4	2,9	16,6	57,0	11,8	8,3	15,0
Puerária ^{Pu}	236	866	0,3	4,0	14,8	17,7	9,4	49,2	18,6	2,8	0,6	4,5	1,5	59,0	4,0	1,5	0,0	5,3	1,3	2,7	0,3	0,2	0,1	3,0	14,7	40,7	14,6	2,9	6,2
Estilosantes St	357	768	0,4	3,1	11,2	17,1	9,4	45,4	11,2	1,4	0,5	5,5	1,6	43,0	4,0	1,2	0,0	4,8	1,3	2,6	0,2	0,2	0,1	3,0	13,5	43,0	13,4	2,5	8,5
Mata	484	849	0,6	3,5	15,5	19,7	9,0	47,4	20,1	3,5	1,2	4,9	2,0	43,7	2,2	1,1	0,2	6,0	1,1	2,6	0,3	0,2	0,4	3,0	13,6	49,2	13,1	3,0	8,2

Média geral	322	1128	0,3	3,9	18,3	18,2	9,8	45,0	16,9	3,9	1,2	5,2	2,9	52,2	2,5	0,9	0,1	5,7	1,2	2,6	0,3	0,2	0,2	2,9	15,8	47,4	11,7	5,1	18,0
Mínimo	36	438	0,0	1,5	3,9	14,9	8,7	33,8	9,7	0,5	0,2	4,1	1,1	24,0	1,1	0,3	0,0	2,3	1,0	2,4	0,2	0,1	0,0	2,8	9,6	38,1	8,5	0,3	4,5
Máximo	668	2169	0,7	8,4	27,2	21,9	10,6	63,1	23,7	15	2,9	5,9	5,6	100,0	4,7	1,8	0,7	8,1	1,4	2,9	0,4	0,3	0,7	3,0	23,0	58,2	16,3	11,4	74,3
DP	163	394	0,2	1,5	4,3	1,8	0,4	6,8	3,1	2,7	0,7	0,5	1,1	16,7	0,8	0,3	0,2	1,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	3,3	4,7	1,7	2,6	12,7
Erro padrão	22	54	0,0	0,2	0,6	0,2	0,1	0,9	0,4	0,4	0,1	0,1	0,2	2,3	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,6	0,2	0,4	1,7
CV(%)	51	35	52,5	37,9	23,3	10,0	4,6	15,2	18,5	68,7	59,7	8,8	40,1	31,9	32,6	37,7	135,3	20,7	8,1	3,3	11,8	14,6	94,8	1,0	20,7	10,0	14,5	51,6	70,6

Cbio: carbono da biomassa microbiana; Nbio: nitrogênio da biomassa microbiana; C/Nbio: relação C/N da biomassa microbiana; Cmpo: carbono da matéria orgânica particulada; CNmpo: relação C/N da matéria orgânica particulada; Cmam: carbono da matéria orgânica associada aos minerais; CNmam: relação C/N da matéria orgânica associada aos minerais; Gt: proteína relacionada à glomalina total; Gfe: proteína relacionada à glomalina facilmente extraível; qCO₂: quociente metabólico; RB: respiração basal; P: fósforo disponível; K: potássio disponível; Ca: cálcio trocável; Mg: magnésio trocável; Al: alumínio trocável; H+Al: acidez potencial; Ds: densidade do solo; Dp: densidade de partículas; Pmi: microporosidade; Pma: macroporosidade; K₀: condutividade hidráulica; DMP: diâmetro médio ponderado; ADA: argila dispersa em água; argila: argila total; silte: silte total; Ds raiz: densidade de raízes; N° esporos: número de esporos totais. ^{An} gênero Andropogon; ^{Pa} gênero Panicum; ^{Pe} gênero Penisetum; ^{Cy} gênero Cynodon; ^{Br} gênero Brachiaria; ^{Me} gênero Melinis; ^{Ar} gênero Arachis; ^{Pu} gênero Puerária e St gênero Stilosantes. DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Material suplementar do Capítulo 3

Tabela 1 – Quadro de análise de variância para variáveis com 36 graus de liberdade no resíduo. PT – porosidade total; PMA – macroporos; PMI – microporos; ADA – argila dispersa em água; CBM – carbono da biomassa microbiana; NBM – nitrogênio da biomassa microbiana; ESPT – número de esporos totais; qCO₂ – quociente metabólico microbiano; IEA – índice de estabilidade de agregados e ID – índice de dispersão de argila

FV	GL	Quadrado Médio									
		PT	PMA	PMI	ADA	CBM	NBM	ESPT	qCO ₂	IEA	ID
Bloco	4	0,0006 ^{ns}	0,00247*	0,0021 ^{ns}	194,78*	3398,96 ^{ns}	199,44*	2580042,0 ^{ns}	0,78 ^{ns}	0,1270*	442,89*
Planta	2	0,0013 ^{ns}	0,00145 ^{ns}	0,0027 ^{ns}	462,80*	141661,40*	417,87*	132010400,0*	8,01*	0,2111*	1437,76*
Inóculo	2	0,0002 ^{ns}	0,00195 ^{ns}	0,0029 ^{ns}	52,12 ^{ns}	61718,19*	490,56*	6048576,0*	0,77 ^{ns}	0,0483 ^{ns}	185,20 ^{ns}
Planta x Inóculo	4	0,0006 ^{ns}	0,00108 ^{ns}	0,0015 ^{ns}	65,07*	70361,70*	212,28*	7020657,0*	1,47 ^{ns}	0,0236 ^{ns}	197,77*
Fatorial vs Controle	1	0,0049 ^{ns}	0,00002 ^{ns}	0,0056 ^{ns}	1467,59*	155526,10*	1798,73*	20532900,0*	3,33*	0,0880 ^{ns}	4446,94*
Resíduo	36	0,0013	0,00067	0,0022	22,24	8328,96	69,04	986659,4	0,76	0,0224	73,81
Média		0,58	0,36	0,22	16,39	224,77	22,89	1943,23	1,45	0,28	28,54
CV(%)		6,33	7,29	21,25	28,78	40,60	36,30	51,12	60,08	52,56	21,25

FV fonte de variação; GL graus de liberdade; QM quadrado médio; * significativo e ^{ns} não significativo pelo teste t (p<0,05).

Tabela 2 – Quadro de análise de variância para variáveis para variáveis com seis (fontes de variação inóculo e planta com quatro repetições) e oito (fontes de variação inóculo e planta com cinco repetições) graus de liberdade do resíduo. DSR – densidade de raízes, MSP – Massa de plantas e COL – percentagem de colonização de raízes

FV	GL	QM	FV	GL	QM	
		DSR			MSP	COL
Bloco	3	0,37 ^{ns}	BL	4	269,12 ^{ns}	31.73 ^{ns}
Planta	1	47,64*	PL	1	3967,73*	318.18 ^{ns}
Inóculo	2	3,50 ^{ns}	INOC	2	2,94 ^{ns}	177.06 ^{ns}
Planta x Inóculo	2	1,65 ^{ns}	PL x INOC	2	80,82 ^{ns}	51.86 ^{ns}
Resíduo	15	1,35	Resíduo	20	139,5263	244.66
Média		4,90			48,29	46,30
CV%		23,67	CV%		24,46	33,79

FV – fonte de variação; GL – graus de liberdade; QM quadrado médio; * significativo e ^{ns} não significativo pelo teste t (p<0,05).

Tabela 3 – Quadro de análise de variância para variáveis com 36 graus de liberdade no resíduo. PT – porosidade total; PMA – macroporos; PMI – microporos; ADA – argila dispersa em água; CBM – carbono da biomassa microbiana; NBM – nitrogênio da biomassa microbiana; ESPT – número de esporos totais; qCO₂ – quociente metabólico microbiano; IEA – índice de estabilidade de agregados e ID – índice de dispersão de argila

FV	GL	Quadrado Médio									
		PT	PMA	PMI	AG	CBM	NBM	ESPT	qCO ₂	IEA	ID
Bloco	4	0,0029 ^{ns}	0,00025 ^{ns}	0,0037 ^{ns}	2,45 ^{ns}	2440,39 ^{ns}	20,58 ^{ns}	7691203 ^{ns}	0,46*	0,1007*	13,94 ^{ns}
Planta	2	0,0023 ^{ns}	0,00114*	0,0065 ^{ns}	0,20 ^{ns}	5321,02 ^{ns}	28,39 ^{ns}	229570700*	3,48*	0,1103*	2,49 ^{ns}
Inóculo	2	0,0029 ^{ns}	0,00004 ^{ns}	0,0036 ^{ns}	0,18 ^{ns}	47293,63*	7,95 ^{ns}	29085760*	3,43*	0,0027 ^{ns}	5,11 ^{ns}
Planta x Inóculo	4	0,0011 ^{ns}	0,00019 ^{ns}	0,0015 ^{ns}	0,38 ^{ns}	29743,11*	17,34 ^{ns}	31189550*	1,82*	0,0068 ^{ns}	6,83 ^{ns}
Fatorial vs Controle	1	0,0009 ^{ns}	0,00042 ^{ns}	0,0025 ^{ns}	28,95*	41033,80*	5,65 ^{ns}	33159900 ^{ns}	3,89*	0,0191 ^{ns}	292,06*
Resíduo	36	0,0015	0,00027	0,0019	2,68	4233,68	9,81	8604045	0,55	0,0284	17,33
Média		0,46	0,24	0,22	17,81	135,31	8,77	2484,71	1,51	0,20	15,13
CV(%)		8,42	6,80	19,89	9,18	48,09	35,70	118,05	59,51	83,05	27,52

FV fonte de variação; GL graus de liberdade; QM quadrado médio; * significativo e ^{ns} não significativo pelo teste t (p<0,05).

Tabela 4 – Quadro de análise de variância para variáveis para variáveis com seis (fontes de variação inóculo e planta com quatro repetições) e oito (fontes de variação inóculo e planta com cinco repetições) graus de liberdade do resíduo. DSR – densidade de raízes, MSP – Massa de plantas e COL – percentagem de colonização de raízes

FV	GL	QM	FV	GL	QM	
		DSR			MSP	COL
Bloco	3	3,08*	BL	4	481,84*	32.58 ^{ns}
Planta	1	41,26*	PL	1	8330,84*	4607.84*
Inóculo	2	0,26 ^{ns}	INOC	2	95,30 ^{ns}	798.96*
Planta x Inóculo	2	0,40 ^{ns}	PL x INOC	2	216,24 ^{ns}	139.27 ^{ns}
Resíduo	15	0,75	Resíduo	20	158,46	225.41
CV%		25,18	CV%		26,91	27,62

FV – fonte de variação; GL – graus de liberdade; QM quadrado médio; * significativo e ^{ns} não significativo pelo teste t (p<0,05).

Tabela 5 – Quadro de análise de variância dos para variáveis com 36 graus de liberdade no resíduo. PT – porosidade total; PMA – macroporos; PMI – microporos; ADA – argila dispersa em água; CBM – carbono da biomassa microbiana; NBM – nitrogênio da biomassa microbiana; ESPT – número de esporos totais; qCO₂ – quociente metabólico microbiano; IEA – índice de estabilidade de agregados e ID – índice de dispersão de argila

FV	GL	Quadrado Médio									
		PT	PMA	PMI	ADA	CBM	NBM	ESPT	qCO ₂	IEA	ID
Bloco	4	0,0025 ^{ns}	0,00027 ^{ns}	0,0039 ^{ns}	0,49 ^{ns}	1360,49 ^{ns}	6,34 ^{ns}	90866 ^{ns}	2,77 ^{ns}	0,097*	122,78*
Planta	2	0,0005 ^{ns}	0,00082 ^{ns}	0,0020 ^{ns}	3,81*	1287,64 ^{ns}	111,22*	6655188*	2,67*	0,220*	496,32*
Inóculo	2	0,0029 ^{ns}	0,00030 ^{ns}	0,0024 ^{ns}	0,04 ^{ns}	3345,90*	78,65*	471354*	2,38*	0,041 ^{ns}	47,88 ^{ns}
Planta x Inóculo	4	0,0025 ^{ns}	0,00033 ^{ns}	0,0020 ^{ns}	0,08 ^{ns}	9303,66*	23,50*	458345*	6,50*	0,026 ^{ns}	18,93 ^{ns}
Fatorial vs Controle	1	0,0222*	0,00214 ^{ns}	0,0106*	1,51*	10,41 ^{ns}	25,35*	3097540*	1,89*	0,017 ^{ns}	233,86*
Resíduo	36	0,0018	0,00088	0,0015	0,24	829,84	5,86	83841	1,36	0,015	29,16
Média		0,48	0,36	0,12	0,89	82,67	5,98	558,90	1,64	0,18	13,87
CV%		8,82	8,26	32,68	55,24	34,85	35,50	51,81	70,56	68,20	38,94

FV fonte de variação; GL graus de liberdade; QM quadrado médio; * significativo e ^{ns} não significativo pelo teste t (p<0,05).

Tabela 6 – Quadro de análise de variância para variáveis para variáveis com seis (fonte de variação inóculo com quatro repetições) e oito (fonte de variação inóculo com cinco repetições) graus de liberdade do resíduo. DSR – densidade de raízes, MSP – Massa de plantas e COL – percentagem de colonização de raízes.

FV	GL	QM DSR	FV	GL	QM MSP	COL
Bloco	3	7,24 ^{ns}	BL	4	44,61 ^{ns}	196.94 ^{ns}
Inóculo	2	3,63 ^{ns}	INOC	2	143,35 ^{ns}	4.33 ^{ns}
Resíduo	6	6,21	Resíduo	8	36,32	282.15 ^{ns}
Média		5,74	Média		51,86	62,60
CV%		43,42	CV%		11,62	26,84

FV – fonte de variação; GL – graus de liberdade; QM quadrado médio; * significativo e ^{ns} não significativo pelo teste t (p<0,05).