

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Influência da profundidade do solo e do manejo de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* na estrutura das comunidades microbianas do solo

Arthur Prudêncio de Araujo Pereira

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2014**

Arthur Prudêncio de Araujo Pereira
Engenheiro Agrônomo

Influência da profundidade do solo e do manejo de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* na estrutura das comunidades microbianas do solo

Orientadora:
Profa. Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Pereira, Arthur Prudêncio de Araujo
Influência da profundidade do solo e do manejo de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* na estrutura das comunidades microbianas do solo / Arthur Prudêncio de Araujo Pereira. - - Piracicaba, 2014.
102 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Ecologia microbiana 2. Consórcio 3. DGGE 4. qPCR 5. Leguminosas I. Título

CDD 634.9734
P436i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus avós paternos (**Júlia & Severino**) e maternos (**Maria Eunice & Otávio**),
pelo **exemplo de humildade, luta, amor** e por terem me concedido
Pais maravilhosos.
Vocês sempre serão **referência** e motivo de **orgulho** para mim.
Minha eterna gratidão!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu grande orientador, por tornar realidade os planos do meu coração;

Aos meus pais, **Francisco de Assis e Claudineide Prudêncio**, pela educação, pelo amor e pelo total apoio em todas as minhas decisões. Vocês são pessoas valiosas para mim. Obrigado;

A **Elvis Prudêncio**, verdadeiro irmão e amigo, por todo incentivo durante essa jornada;

À Profa. Dra. **Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso**, pela confiança em mim depositada, pela amizade construída e, sobretudo, pela orientação e pelos valiosos conselhos e discussões que me fizeram crescer cientificamente, engrandecendo também este trabalho. Muito obrigado;

À Profa. Dra. **Júlia Sobral**, pelo grande apoio pessoal e científico durante o meu período de graduação. Nunca irei esquecer. Muito obrigado;

Aos Professores Dr. **Fernando Andreote** e Dr. **Daniel Bini**, sempre solícitos para discutir novas ideias e novos caminhos que aprimoraram este trabalho;

Ao Prof. Dr. **José Leonardo**, aos pesquisadores do CIRAD-França, Dr. **Jean-Pierre**, Dr. **Jean Paul**, Dra. **Àgnes Robin** e ao **George Lambais**, pela ajuda e parceria na realização deste trabalho;

À minha namorada, **Mirella Araújo**, sempre companheira, paciente e amiga;

À **toda minha família**, em especial aos meus tios(as) Andréia, Maria da Glória, Orlando, Agrício e Otávio. A meus primos(as) Guilherme, Maria Luiza, Elisângela, Júlia, Ivan, Rúbia, Bruno e Victor. Aos meus sogros Emídio e Mine Araújo e a José Gomes e Diléia, por todo apoio prestado em todos os momentos;

Ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro à pesquisa (proc. nº 476122/2013-9) e à **FAPESP**, pela bolsa de mestrado concedida (proc. nº 2013/12279-0);

Ao **DVATCOM**, em especial às assistentes sociais Solange, Áurea e Eliana, pela moradia na Vila Estudantil da Pós-Graduação da ESALQ/USP e aos amigos moradores da Vila: Timóteo, Bruno, Adijailton, Matheus Rovere, Mateus Tonelli, Nardélio, Diney, Marcos, Fabrício, Natália, Sales e Sibelle;

À **Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga-SP**, em especial a equipe "**Floragro Apoio**", pela ajuda na abertura das trincheiras e nos exaustivos dias de coleta de solo e raízes finas;

Ao meu amigo **Pedro Andrade**, por nunca hesitar em me fornecer ajuda, seja ela dentro ou fora do Laboratório. Seu apoio foi indispensável! Meu muito obrigado;

À **Luana Lira**, pela amizade e receptividade nos meus primeiros dias em Piracicaba;

À **Maiele Santana**, pelo exemplo de dedicação e por toda ajuda prestada ao meu experimento. Muito obrigado;

À **Joice Bonfim**, pela amizade formada e por todo apoio fornecido durante análises com as micorrizas arbusculares;

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia da ESALQ/USP, **Denise Mescolotti** e **Fernando Baldesin**, pela amizade e por todo auxílio fornecido a este trabalho. Com vocês foi possível ir muito mais longe. Muito obrigado;

Agradeço a todos meus colegas de Laboratório (Sônia, Maiele, Lucas, Thiago, Cristiane, German, Paulo, Lara, Tâmara, Mylenne, Joice, Dorotéia, Fábio, Armando, Simone, Maryiemy, Pedro, Adriano, Jose Carlos, Polé, Luana, Laura, Nicolle, Danielle, Diogo e, em especial, ao Ademir, pela ajuda nas análises de qPCR);

À **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** e ao curso de Pós-Graduação em **“Solos e Nutrição de Plantas”**, pela estrutura e oportunidade de desenvolvimento deste trabalho;

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, prestaram incentivo e apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

OBRIGADO!

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, do nível altíssimo ao mais baixo, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e

sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus.

Um dia você chega lá... De alguma maneira você chega lá”.

Ayrton Senna

“...**nunca deixe** alguém dizer que você não pode fazer algo.

Se você tem um sonho, deve protegê-lo.

Quando as pessoas não podem fazer algo por si mesmas,

elas dirão que você também não é capaz.

Você quer alguma coisa? **Vá buscá-la!** Ponto final”

Will Smith - À procura da felicidade, filme.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Plantios puros e mistos de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Acacia Mangium</i>	19
2.2 Comunidades microbianas do solo	21
2.2.1 A comunidade de fungos.....	21
2.2.1.1 Aspectos gerais.....	21
2.2.1.2 Fungos formadores de micorrizas arbusculares (FMA) e de ectomicorrizas (ECM)	22
2.2.2 A comunidade de bactérias.....	25
2.2.3 Avaliação das comunidades microbianas do solo	25
2.2.3.1 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	26
2.2.3.2 Real-time PCR (<i>q</i> PCR).....	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES	31
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1 Sítio experimental e coleta das amostras.....	33
5.1.2 Delineamento experimental.....	34
5.1.3 Abertura das trincheiras e obtenção das amostras	35
5.2 Análises microbiológicas	35
5.2.1 Extração do DNA presente nas amostras do solo.....	35
5.2.2 Estrutura das comunidades microbianas por PCR-DGGE	36
5.2.2.1 Amplificação da região 16S rRNA de bactérias presentes no solo	36
5.2.2.2 Amplificação da região 18S rRNA de fungos totais do solo	36
5.2.2.3 Amplificação da região 18S rRNA de FMA presentes no solo	37
5.2.2.4 Aplicação da técnica de DGGE	37
5.2.2.5 Análise de PCR em tempo real (<i>q</i> PCR) da região ITS e 16S rRNA.....	38
5.2.2.6 Extração de esporos de FMA	38

5.2.2.7 Avaliação da colonização radicular por FMA e ECM	39
5.3 Análise estatística	40
6 RESULTADOS	43
6.1 Atributos físicos e químicos do solo	43
6.2 Comunidades microbianas no solo	43
6.2.1 A comunidade de bactérias	43
6.2.1.1 Influência da profundidade do solo na estrutura da comunidade	43
6.2.1.2 Influência dos sistemas de plantios na estrutura da comunidade	46
6.2.1.3 Correlação do perfil da comunidade com dados ambientais	47
6.2.1.4 Abundância do gene 16S por qPCR	50
6.2.2 A comunidade fúngica total	50
6.2.2.1 Influência da profundidade do solo na estrutura da comunidade	50
6.2.2.2 Influência dos sistemas de plantios na estrutura da comunidade	53
6.2.2.3 Correlação do perfil da comunidade com dados ambientais	54
6.2.2.4 Abundância do gene ITS por qPCR	57
6.2.3 A comunidade de fungos formadores de micorrizas arbusculares	58
6.2.3.1 Influência da profundidade do solo na estrutura da comunidade	58
6.2.3.2 Influência dos sistemas de plantios na estrutura da comunidade	60
6.2.3.3 Correlação do perfil da comunidade com dados ambientais	61
6.2.3.4 Percentual de colonização radicular por FMA e ECM	64
6.2.3.6 Abundância de esporos e identificação morfológica de FMA	65
7 DISCUSSÃO	69
7.1 Atributos físicos e químicos do solo	69
7.2 Influência da profundidade do solo na estrutura das comunidades microbianas	69
7.3 Influência dos sistemas de plantios (<i>E. grandis</i> x <i>A. mangium</i>) na estrutura das comunidades microbianas do solo	70
7.4 Correlação dos atributos físicos e químicos do solo com os perfis das comunidades microbianas do solo	72
7.5 Análise de PCR em tempo real (qPCR)	73
8 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES	95
ANEXOS	99

RESUMO

Influência da profundidade do solo e do manejo de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* na estrutura das comunidades microbianas do solo

Pesquisas atuais demonstram respostas positivas em plantios de Eucalipto consorciados com *Acacia mangium*. O objetivo principal desse trabalho foi avaliar a influência dos sistemas puros e mistos de *Eucalyptus grandis* e *A. mangium* na estrutura das comunidades de bactérias e fungos do solo. Avaliou-se a estrutura dessas comunidades num gradiente de profundidade do solo. Foram abertas trincheiras profundas em plantios puros de Acácia (100A), Eucalipto (100E) e em sistemas mistos entre as duas espécies (A+E). No plantio misto fizeram-se coletas de solo e raízes na base da Acácia A(A+E) e na base do Eucalipto E(E+A). Cerca de 10 camadas do solo foram avaliadas ao longo do perfil das trincheiras, sendo coletados pontos de 0 a 800 cm, com 4 repetições cada. As comunidades microbianas foram monitoradas por PCR-DGGE, onde foi observado um forte efeito da profundidade do solo nas comunidades microbianas. Agrupamentos específicos foram formados em cada profundidade amostrada. Plantios puros de Eucalipto selecionaram grupos de bactérias diferentes dos que foram encontrados em 100A, A(A+E) e E(E+A). A comunidade de fungos totais não sofreu diferenciação de grupos nos plantios estudados, ao passo que os perfis de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) do solo no tratamento A(A+E), foram significativamente diferentes dos grupos encontrados nos demais tratamentos. Numa análise de correlação, realizada por RDA, ficou indicado que a comunidade de FMA do tratamento A(A+E) correlacionou-se positivamente com os valores de P no solo. Outra variável quantificada foi a abundância de bactérias e fungos, indicadas pelo número de cópias do gene ribossomal 16S DNAr e ITS, respectivamente. Quando comparadas as camadas superficiais do solo (0-20 cm), não foi possível encontrar diferenças na abundância de cópias dos genes 16S e ITS em todos os tratamentos. Ocorreu uma queda exponencial no número de cópias desses genes com o aumento da profundidade do solo. Porém, o tratamento 100E apresentou maior número de cópias em profundidade (de 300-800 cm) dos genes 16S e ITS do que qualquer outro tratamento. Em relação a presença específica de FMA, houve baixa colonização e baixa abundância de esporos de FMA em todos os tratamentos, sendo o tratamento 100E mais colonizado que os demais. Ao todo foram encontradas 16 espécies de FMA, sendo a maior parte pertencente ao gênero *Acaulospora*. Ao contrário dos FMA, os plantios apresentaram colonização radicular pronunciada por ECM. Conclui-se que nestes sistemas florestais uma espécie de planta parece ser mais importante que a outra na estruturação da comunidade microbiana e que alguns fatores do solo podem ser preponderantes nessa separação. O conhecimento dessas comunidades é de suma importância em plantios florestais, principalmente por estarem envolvidos diretamente nos ciclos biogeoquímicos e, sobretudo, por se tratar de uma forma de plantio florestal nova, promissora e que aborda parâmetros de sustentabilidade.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; Consórcio; DGGE; qPCR; Leguminosas

ABSTRACT

Soil depth and crop management of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* plantations influence the structure of soil microbial communities

Recently discoveries have shown positive responses in Eucalyptus plantations intercropped with *Acacia mangium*. The aim of this study was to evaluate the influence of pure and mixed systems (*Eucalyptus grandis* and *A. mangium*) on the microbial communities' structure in soil. We evaluated the structure of these communities in a gradient of soil depth. In this context, deep trenches were dug in pure stands of Acacia (100A), Eucalyptus (100E) and mixed systems (A+E). In mixed forest plantations, soil and roots were sampled at the base of Acacia (A+E) and the base of Eucalyptus (E+A). Soil over 10 layers along the profile from 0 to 800cm were sampled, with 4 replicates each. The microbial communities were monitored by PCR-DGGE, where we observed a strong effect of soil depth on microbial communities. As a result, specific clusters were formed in each soil layer. The community composition of *Eucalyptus grandis* stands was different from the community structure found in the 100A, A (A+E) and E (E+A) systems. The total fungal community did not show any group differentiation due to the plantation system, while the profiles of mycorrhizal fungi (AMF) of these three groups were significantly different from that of the treatment A (A+E). A correlation analysis performed by RDA indicated that the FMA community of the treatment (A+E) was correlated positively with P values in the soil. Another variable quantified was the community of bacteria and fungi, indicated by the number of copies of ribosomal 16S rDNA and ITS, respectively. Comparing the upper soil layers (0-20 cm), we couldn't find differences in the abundance of copies of 16S rRNA and ITS region genes in all treatments, but we observed an exponential decrease in 16S rRNA copy numbers with increasing soil depth. Regarding the presence of AMF, we found low root colonization and low abundance of AMF spores in all treatments, although 100E presented higher colonization rates than the others. Altogether, 16 AMF species were found, most of them belonging to the genus *Acaulospora*. We conclude that these forest systems a plant species seems to be more important than the other in the structuring of the microbial community and that some soil factors may be preponderant in this separation. The processes involving the dynamics of the microbial community structure is a crucial point in understanding the development of forest plantations, mainly by involving the biogeochemical cycles, when seeking for new promising approaches and sustainability parameters.

Keywords: Microbial ecology; Consortium; DGGE; qPCR; Legumes

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
(A+E)	Plantio misto de <i>A. mangium</i> e <i>E. grandis</i>
P _[x]	Camada do solo onde foi realizada amostragem
“a1”	Agrupamentos presentes em camadas de superfície (0-100 cm)
“a2”	Agrupamentos presentes em camadas intermediárias (100-400 cm)
“a3”	Agrupamentos presentes em camadas profundas (400-800 cm)
µg	Micrograma
µL	Microlitro
100A	<i>A. mangium</i> em sistema monoespecífico
100E	<i>E. grandis</i> em sistema monoespecífico
A(A+E)	<i>A. mangium</i> presente no plantio misto
ABRAF	Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas
Al ³⁺	Alumínio
ANOSIM	Análise de similaridade
C	Carbono
(C)	Citosina
C/N	Relação Carbono/Nitrogênio
cm	centímetros
CTC	Capacidade de troca de cátions
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> – Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E(E+A)	<i>E. grandis</i> presente no plantio misto
ECM	Fungo(s) ectomicorrízico(s)
FMA	Fungo(s) micorrízico(s) arbuscular(es)
g	grama
(G)	Guanina
H+Al	Acidez potencial do solo
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> – <i>Espaçador Interno Transcrito</i>

K ⁺	Potássio
kg	quilogramas
M	molar
m	Saturação por alumínio
M.O.S	Matéria orgânica no solo
mg	miligrama
Mg ²⁺	Magnésio
min	minuto
mL	mililitros
mM	Milimolar
N	Nitrogênio
N ₂	Nitrogênio atmosférico
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ ⁺	Amônia
NO ₃ ⁻	Nitrato
°C	Grau Celsius
P	Fósforo disponível
pb	pares de bases
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Real time-PCR (PCR em Tempo Real)
RDA	Análise de redundância
RNA	Ácido ribonucleico
s	segundo
SB	Soma de bases trocáveis
T _[x]	Tratamentos
TAE	Tris acetato
UV	ultravioleta
V%	Percentual de bases saturando a CTC
λA	Valor de Lambda (Percentual de explicação)

1 INTRODUÇÃO

Dentre as opções para diversificação da matriz energética brasileira, os recursos madeireiros são apontados como uma opção atraente. A crescente utilização de recursos para este fim ocorre em diversas partes do mundo, principalmente no Brasil. O País ocupa lugar de grande destaque no plantio de *Eucalyptus*, sendo considerado o maior produtor mundial do gênero. A intensificação nos estudos com essa cultura se dá pelas características agrônomo-florestais, como crescimento acelerado, boa adaptação em solos de baixa fertilidade e regiões de pouca pluviosidade, além de se tratar de uma espécie geneticamente melhorada.

Entretanto, plantios sucessivos e monoespecíficos de Eucalipto tendem a exaurir algumas formas de nutrientes minerais do solo ao longo do tempo, como o nitrogênio e fósforo, por exemplo, sendo estes insumos bastante onerosos para a silvicultura brasileira. Na intenção de minimizar a problemática citada, algumas pesquisas têm buscado práticas sustentáveis que contribuam para uma maior manutenção de nutrientes disponíveis no solo. Uma alternativa promissora está sendo a implantação de plantios mistos entre Eucalipto e plantas da família Fabaceae, especialmente as do gênero *Acacia*.

As espécies inseridas no gênero citado, como *Acacia mangium*, por exemplo, possuem capacidade de formar associação simbiótica com bactérias fixadoras de N₂ atmosférico e fungos micorrízicos, características que auxiliam a ciclagem biogeoquímica no agroecossistema. Estudos que avaliam alterações ocorridas na estrutura da comunidade de bactérias e fungos do solo em plantios mistos entre *E. grandis* e *A. mangium* ainda são incipientes, assim como o conhecimento do comportamento dessas comunidades ao longo do perfil do solo.

Diante disso, torna-se necessário recorrer a abordagens que busquem essas informações, de modo que as mesmas nos permitam opinar, do ponto de vista microbiológico, sobre a viabilidade de plantios mistos entre essas espécies, expondo benefícios ou possíveis entraves dessa prática agrícola adotada em plantios florestais de Eucalipto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantios puros e mistos de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium*

Eucalyptus é considerado um dos gêneros florestais mais utilizados em plantações comerciais no mundo (JAMES; DEL LUNGO, 2005). A área mundial com plantios do gênero está estimada em 20 milhões de hectares (GIT, 2009). Nesse cenário, o Brasil ocupa posição de destaque, sendo considerado o maior produtor mundial de Eucalipto, com 5,10 milhões de hectares plantados. O estado de São Paulo é o segundo maior produtor nacional, com 1,04 milhões de hectares plantados (Associação Brasileira de Florestas Plantadas - ABRAF, 2013). Esse plantio está sempre aumentando e isso se deve ao rápido crescimento e produtividade das árvores, o que auxilia na redução da exploração de florestas nativas por meio do fornecimento constante de matéria prima para indústrias de papel, celulose, lenha, carvão vegetal e outras (MEDRADO, 2003).

Segundo a ABRAF (2013), grande parte dos plantios florestais no Brasil é representada pelos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*. Visto que os estandes com esses gêneros são montados, na maioria das vezes, na forma de monocultivo, este fato leva a certa preocupação, principalmente de caráter ambiental. A exploração comercial de Eucalipto pode, em termos nutricionais, se manter sustentável por alguns anos (FORRESTER et al., 2006). Contudo, após sucessivas colheitas, o monocultivo intensivo resulta em elevada exportação de biomassa, o que acarreta em redução da disponibilidade de nutrientes, mudanças qualitativas e quantitativas na matéria orgânica do solo, redução nos valores pH e outras (GONÇALVES et al., 2004; LACLAU et al., 2005; LIU; LI, 2010; BINI et al., 2013a). Desta forma, para manter constantes os índices de produção, é necessário fornecer ao solo grande quantidade de fertilizantes minerais, principalmente N e P, os quais são considerados insumos bastante onerosos para a silvicultura brasileira (LACLAU et al., 2008) e que podem contribuir para a poluição ambiental.

Com o intuito de minimizar a problemática exposta, algumas pesquisas têm buscado implantar estandes florestais contendo espécies de Eucaliptos e plantas leguminosas em sistema de consórcio (FORRESTER et al., 2004). Essa nova abordagem vem sendo desenvolvida em várias partes do mundo e, em especial, nas condições edafoclimáticas do Brasil. Essa técnica de manejo têm o objetivo de

suprir, parcial ou totalmente, a demanda nutricional dos plantios de *Eucalyptus* (LACLAU et al., 2008; BOUILLET et al., 2008; JOURDAN et al., 2008; NOUVELLON et al., 2012; RACHID et al., 2013).

Dentre as espécies florestais leguminosas, a *Acacia mangium*, por apresentar características peculiares, como elevada fixação biológica de N₂, adaptação a solos ácidos e outras (VADEZ et al., 1995), foi escolhida para compor os estandes experimentais de plantios mistos com *E. grandis* no Brasil (BINI et al., 2013b). *A. mangium* é uma árvore de rápido crescimento, adaptada a regiões quentes e úmidas e seu centro de origem é a Austrália. Segundo Voigtlaender et al. (2012), esse gênero, apesar de apresentar papel secundário no setor florestal brasileiro, pode trazer melhorias para algumas propriedades do solo e acelerar a ciclagem de nutrientes.

A. mangium, quando comparada com Eucalipto, deposita maior quantidade de serapilheira (~6 ton ano⁻¹) rica em N e P no solo. Esta serapilheira, a qual apresenta menores relação C/N, pode, após a decomposição, ser uma fonte prontamente disponível para as plantas, promovendo condições de maior fertilidade para o solo (FORRESTER et al., 2006; BINI, 2013).

Vários trabalhos citam melhorias oriundas da associação dessas espécies, principalmente para a produção de madeira e alocação de C e N no solo (KHANNA, 1997; BAUHUS et al., 2000; BINKLEY et al., 2000, 2003; FORRESTER et al., 2004; FORRESTER et al., 2005; FORRESTER et al., 2006; LACLAU et al., 2008; VOIGTLAENDER et al., 2012). Além disso, esses estudos indicam que sistemas consorciados de *E. grandis* com *A. mangium*, quando comparados com plantios puros da mesma espécie, apresentam a capacidade de elevar a alocação de biomassa acima e abaixo do solo, ter maior deposição de serapilheira no solo, otimizar a eficiência no uso da luz e incrementar a disponibilização de fósforo no solo (RACHID et al., 2013).

Em contrapartida, a maioria dos estudos prioriza, basicamente, as mudanças ocorridas no sistema solo, tanto química, quanto fisicamente, além de dados sobre a produção madeireira. Abordagens envolvendo a estrutura das comunidades microbianas (em superfície e sub-superfície) e como a comunidade vegetal pode influenciar essas comunidades ainda são incipientes, principalmente com avaliações moleculares independentes de cultivo.

2.2 Comunidades microbianas do solo

2.2.1 A comunidade de fungos

2.2.1.1 Aspectos gerais

O solo é o ambiente com maior diversidade biológica que existe na terra (ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2008; QUINCE et al., 2008). Nele estão inseridos organismos pertencentes aos três domínios da vida (*Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*), os quais possuem papel fundamental em todos os processos que ocorrem nos ecossistemas (NANNIPIERI; BADALUCCO, 2003; BARRIOS, 2007; VAN DER HEIJDEN et al., 2008).

Os fungos são micro-organismos ubíquos, altamente diversos e compõem o domínio *Eukarya*. Os mesmos ocupam os mais variados nichos, são considerados um dos grupos funcionais mais importantes que existem no planeta (MUELLER et al., 2007; SMITH; READ, 2008) e dominam, em termos quantitativos, a biomassa microbiana do solo. Porém, o conhecimento dessa comunidade ainda é limitado (BALDRIAN et al., 2012), sendo conhecida apenas uma mínima fração, cerca de 100.000 espécies, das 1,5 milhões que se estima que existam (MOORE et al., 2011).

A importância dessa comunidade se dá por diversos fatores, como, por exemplo, seu papel na decomposição da matéria orgânica, transporte de nutrientes para as plantas, supressão de patógenos e outros (CAREY, 2004; MYERS et al., 2012). Além do mais, os mesmos são capazes de produzir grande quantidade de diferentes enzimas extracelulares e ácidos orgânicos (BALDRIAN et al., 2011). Esta estratégia lhes permite degradar eficientemente moléculas recalcitrantes no solo, como os compostos ricos em celulose e lignina, por exemplo, (BOER et al., 2005) e auxiliar na solubilização de fosfatos, liberando fontes de energia que podem ser translocadas para a planta, como será visto no tópico posterior. Desta forma, impactos na comunidade de fungos podem acarretar em mudanças na ciclagem de nutrientes e influenciar o funcionamento do sistema (VRIES et al., 2011).

Estudos indicam que os fungos são sensíveis a alterações na composição vegetal dominante. Acredita-se que as plantas, principalmente as florestais, podem selecionar grupos específicos de fungos no solo para interagirem com elas (NIELSEN et al., 2010). A seleção exercida pelos vegetais sobre a comunidade microbiana pode estar associada, em parte, à serapilheira que é depositada ao solo,

a qual libera diferentes compostos químicos, interfere no acesso de luz ao solo, assim como na infiltração da água de chuvas (GÖMÖRYYOVÁ et al., 2009).

Recentemente, em solos com plantios mistos de *E. urograndis* e *A. mangium*, foram classificados, por meio de pirosequenciamento, mais de 260 gêneros de fungos diferentes. Os filões de fungos foram totalmente distintos entre os tratamentos *Eucalyptus* e *Acacia* e um efeito significativo da cobertura vegetal na comunidade foi notado. Porém, o tratamento misto entre as espécies, quando comparado com as monoculturas, não foi divergente, apresentando uma abundância relativa intermediária de filões. Basidiomycota e Ascomycota foram os filões mais predominantes em *Eucalyptus* (75 %) e *Acacia* (62 %), respectivamente. Neste estudo, 4 gêneros foram intimamente relacionados com *Eucalyptus*, sendo os principais o *Pisolithus* (55,1 %) e *Scleroderma* (17 %), ao passo que no tratamento *Acacia*, treze gêneros foram associados, destacando-se *Thelephoraceae* (13,2 %) e *Giberella* (2,6 %) (RACHID, 2013). Entretanto, na avaliação citada, não foram detectados fungos micorrízicos arbusculares, estando presentes, no solo, pouco menos de 0,1 % de organismos pertencentes ao filo Glomeromycota (RACHID, 2013), sendo este fato bastante curioso, visto que em outros trabalhos já foi constatada associação de plantas de Eucalipto e Acácia com FMA (BINI, 2013).

2.2.1.2 Fungos formadores de micorrizas arbusculares (FMA) e de ectomicorrizas (ECM)

Naturalmente, as raízes das plantas interagem com diferentes espécies de fungos e estes podem formar com a planta hospedeira relações benéficas, neutras ou patogênicas (WEHNER et al., 2011). Há cerca de 400 milhões de anos, raízes de plantas se associam benéficamente com FMA (PARNISKE, 2008). Pertencentes ao filo Glomeromycota, estes grupos de fungos são capazes de realizar simbiose mutualística com mais de 80 % das plantas terrestres (SCHÜSSLER et al., 2001; SMITH; READ, 2008; BRUNDRETT, 2009).

Esta associação pode proporcionar inúmeros benefícios para a planta hospedeira e o ponto de partida se dá pela interligação da planta com inúmeras e extensas redes de hifas no solo (FRIESE; ALLEN, 1991). Essa grande massa de hifas extra-radiculares permite a rápida translocação de nutrientes minerais (WU et al., 2012) e água (FINLAY et al., 1986) para a planta, além de fornecer proteção

contra patógenos (BOROWICZ, 2001). Além do mais, os FMA podem excretar algumas glicoproteínas, como a glomalina, por exemplo, a qual produz influência benéfica para o solo, melhorando a estabilidade de agregados e, conseqüentemente, a retenção de água no solo (CARAVACA et al., 2002; RILLIG; MUMMEY, 2006; BEDINI et al., 2009; WILSON et al., 2009; BONFIM, 2011). A relação FMA-planta possui caráter biotrófico e o fungo penetra no interior da célula. Em retribuição, a planta fornece cerca de 20 % de seus fotossintatos para a sobrevivência e crescimento dos fungos (HÖGBERG et al., 2001).

Os FMA pertencem a um filo monofilético e isso se deve ao fato de compartilharem uma característica comum, isto é, a formação de “pequenas árvores fúngicas”, ou arbúsculos, que se estabelecem no interior de células vegetais do córtex radicular e são locais primários de troca de nutrientes entre os simbioses (TIBBETT et al., 2002; PERSSON et al., 2003; BANDOUD et al., 2006; SMITH; READ, 2008). Além da formação de arbúsculos, os FMA também podem formar vesículas, que são estruturas responsáveis por armazenar energia (SMITH; READ, 2008).

De forma similar aos FMA, os fungos ectomicorrízicos (ECM), geralmente dos filos Basidiomycota e Ascomycota, também são simbioses radiculares que expandem a superfície de contato da raiz com o solo, auxiliando a planta hospedeira na assimilação de nutrientes minerais, algumas fontes orgânicas e água (TIBBETT et al., 2002; PERSSON et al., 2003; BANDOUD et al., 2006; SMITH; READ, 2008;). Existem diferenças marcantes nos dois tipos de fungos aqui expostos. Os ECM desenvolvem um espesso manto de hifas que circunda o sistema radicular e formam a rede de Hartig que envolve as células do córtex da raiz, sendo esta a principal estrutura de troca de nutrientes entre os ECM e as células da planta hospedeira. Em contrapartida, os FMA, geralmente, não colonizam o ápice do sistema radicular (BONFANTE; GENRE, 2010). Historicamente, as ECM eram consideradas restritas apenas às regiões com predominância de clima temperado. Entretanto, com o avanço das pesquisas, percebeu-se que essa associação ocorre com frequência também em boa parte dos ecossistemas de clima tropical (SMITH et al., 2013). Estudos recentes relatam a existência de uma diversidade relativamente alta de ECM em florestas nesses ecossistemas, sendo muitas espécies originárias do próprio trópico (MORRIS et al., 2009; PEAY et al., 2010). Inúmeros métodos de avaliação de ECM já foram descritos na literatura. Entretanto, as avaliações das ectomicorrizas que apresentam caráter epigeo são as mais comuns, ficando as

inferências sobre tais espécies limitadas ao estudo dos corpos de frutificação (esporocarpos) presentes acima da superfície do solo. O aparecimento de corpos de frutificação é sazonal e depende de vários fatores. Além disto, alguns ECM, especialmente presentes no filo Basidiomycota, como os da família *Thelephoraceae*, por exemplo, produzem esporocarpos de tamanho reduzido em sistemas florestais, tornando a avaliação menos precisa (GARDES; BRUNS, 1996). Desta forma, tornam-se essenciais estudos que avaliem as taxas de colonização radicular diretamente da comunidade hipógea (subterrânea) de ECM presentes no solo, principalmente aquelas que colonizam o sistema radicular em camadas profundas do solo.

Ambos os gêneros de plantas aqui descritos (*Acacia* e *Eucalyptus*) possuem a capacidade de formar associação micorrízica, tanto com FMA, quanto com ECM (GONZALEZ et al., 2009; STEFFEN et al., 2010; BINI, 2013). Estas micorrizas podem melhorar o crescimento da planta, assim como a qualidade nutricional das folhas, aumentando os níveis de C, N e P (SATTER et al., 2007). Em plantios puros e mistos de *E. grandis* e *A. mangium* já foi reportada alta colonização por FMA nos primeiros meses do plantio. Nestes, a caracterização morfológica de esporos revelou a presença de alguns gêneros como *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Ambispora*, *Racocetra* e *Scutellospora*, sendo constatada, ainda, a presença das espécies *Gigaspora decipiens* e *Racocetra intraornata* na maioria dos plantios (BINI, 2013). Face à importância dos FMA nos ciclos biogeoquímicos (FITTER et al., 2011) e de suas funções ecológicas, percebe-se que produzem inúmeros benefícios na produtividade e sustentabilidade dos ecossistemas, principalmente nos florestais (FRASER et al., 2009; MADER et al., 2011).

Existem evidências que a idade da planta tem influência direta sobre o tipo de associação micorrízica que irá predominar (CAMPOS et al., 2011). Supõe-se que, nos períodos iniciais do plantio, ocorra uma maior colonização radicular de FMA, a qual pode ser paulatinamente sobreposta, com o avanço da idade do plantio, pelas associações com ECM (YINGLONG et al., 1999; SANTOS et al., 2001). Até onde nos foi possível averiguar, ainda não foram reportados dados na literatura sobre os percentuais de colonização por ECM em plantios comerciais mistos de *E. grandis* e *A. mangium*, especialmente em camadas abaixo de 20 a 30 cm de profundidade.

2.2.2 A comunidade de bactérias

As bactérias são organismos procariotos e representam um dos três domínios da árvore evolutiva (*Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya*) (WOESE, 1994). As mesmas são encontradas na maioria dos ambientes e, por mediar diferentes e importantes processos no ecossistema, são responsáveis, em parte, pela manutenção da vida na terra (ANDREOTE, 2007).

Um trabalho recente avaliou a comunidade de bactérias em plantios puros e mistos de Eucaliptos e Acácias na camada superficial (0-10 cm) do solo. Usando análise de DGGE, foi possível verificar diferenciação significativa na estrutura da comunidade de bactérias em resposta ao tratamento adotado. Porém, naquele trabalho, não foi possível detectar efeito do tratamento na quantificação dos genes 16S e *nifH* (RACHID et al., 2013). Em plantios puros de Eucalipto, uma avaliação de bactérias do solo revelou que cerca de 70 % das sequencias encontradas eram de micro-organismos que ainda não são passíveis de se cultivar em condições de laboratório, e foi detectada a presença dos filos Acidobacteria (25 %), Proteobacteria (22 %), Verrucomicrobia (19 %), Firmicutes (6 %), Bacteroidetes (3 %) e Planctomyces (2 %) (SILVEIRA et al., 2006).

De forma geral, apesar dos esforços e de pesquisas demonstrarem que vegetações florestais uniformes (monoculturas), ou seja, com menos riqueza de plantas, possuem tendência a selecionar comunidades de bactérias e fungos no solo (LEJON et al., 2005; BELLIS; KERNAGHAN; WIDDEN, 2007), abordagens envolvendo a influência de plantios mistos de espécies florestais na estrutura dessas comunidades ainda são escassas e necessitam de investigações mais robustas e aprofundadas.

2.2.3 Avaliação das comunidades microbianas no solo

Avaliar o microbioma do solo é um desafio complexo, principalmente em solos tropicais. As dificuldades se dão, em sua maior parte, pela enorme heterogeneidade física e química que existe no solo, os quais sofrem alterações espaciais e temporais muito intensas (ANDREOTE, 2014). Aliado a isso, um elevado número de micro-organismos podem habitar 1 g de solo. Estima-se que apenas 1 % das bactérias e cerca de 17 % das espécies de fungos presentes no solo (BRIDGE; SPOONER, 2001), podem, com as técnicas atuais, ser cultivados em ambiente de laboratório

(DAVIS et al., 2005). Este fato faz com que seja necessária a aplicação de técnicas moleculares robustas que melhor respondam aos questionamentos da pesquisa (ANDREOTE, 2014).

Nesse sentido, recentes avanços no uso de técnicas moleculares têm desvendado elevada diversidade de micro-organismos que antes não eram acessadas com técnicas tradicionais de isolamento (HUGHES et al., 2001). Métodos independentes de cultivo foram desenvolvidos e comumente são aplicados para examinar a ecologia de membros das comunidades microbianas (VAN ELSAS; BOERSMA, 2011). Além do mais, essas técnicas têm possibilitado o desenvolvimento de pesquisas com custo e tempo reduzidos, aliadas à grande capacidade de produção de dados (ARMOUGOM; RAOULT, 2009).

Essas abordagens se iniciam por meio da extração de DNA e/ou RNA de um determinado ambiente. Posteriormente, desenvolve-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual faz uso de *primers* (iniciadores) específicos que acessam regiões variáveis em genes ribossomais do genoma bacteriano e/ou fúngico, por exemplo (VAN ELSAS; BOERSMA, 2011). Parte dessas técnicas exibem uma verdadeira “impressão digital” (*fingerprinting*) da comunidade microbiana a partir dos produtos de PCR (ANDREOTE, 2007), como o DGGE, por exemplo.

2.2.3.1 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

O DGGE é uma técnica de *fingerprinting* usada na análise de comunidades microbianas (MUYZER et al., 1993). Nesta, a diferenciação da comunidade microbiana se dá por meio da separação de *amplicons* com composições diferenciadas de (G) e (C) nas duplas fitas de DNA (VAN ELSAS; BOERSMA, 2011). Os produtos de PCR, ao serem submetidos a um campo eletroforético contendo gradientes químico-desnaturantes (ureia e formamida), apresentam comportamentos distintos de migração em géis de poliacrilamida. As sequências que contêm baixo conteúdo de (C) e (G) tendem a estagnar na parte superior do gel, enquanto que as sequências com maior conteúdo de (C) e (G) migram para áreas inferiores do gel, local onde está presente o gradiente desnaturante em maior concentração. Nesta ótica, ao final da eletroforese, um perfil de bandas da comunidade microbiana é gerado. As imagens obtidas da comunidade podem ser convertidas em matrizes que

posteriormente darão suporte a análises estatísticas pertinentes, com o auxílio de softwares específicos (MUYZER, 1998).

Em seu desenvolvimento, a DGGE foi adotada na detecção de mutações (FISCHER; LEMAN, 1983) e, para isso, o uso de *primers* universais para o domínio *Bacteria* era rotineiro nos laboratórios. Contudo, o DGGE tem sido aplicado com eficácia nos mais variados estudos de avaliação da comunidade microbiana do solo (MUYZER, 1998; KOWALCHUK et al., 2004). Kowalchuk e seus colaboradores (2002), desenvolveram as primeiras pesquisas utilizando PCR-DGGE no estudo da diversidade de FMA. Eles compararam as diferenças existentes na estrutura das comunidades de FMA colonizando plantios saudáveis e degradados de *Ammophila arenaria*. Atualmente, vários outros estudos têm utilizado PCR-DGGE com eficácia no estudo das comunidades de FMA (HELGASON et al., 1999; SANTOS et al., 2006; LIANG et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; IPSILANTIS et al., 2009; LIU et al., 2009).

Em solos brasileiros, Oliveira et al. (2009) obtiveram sucesso ao desenharem sequências de *primers* para diferentes gêneros de FMA e aplicação da técnica de PCR-DGGE. Eles avaliaram, em condições de campo, mudanças na estrutura da comunidade de FMA colonizando a rizosfera de plantas de milho.

2.2.3.2 Real-Time PCR (qPCR)

O Real-Time PCR, ou PCR em tempo real, é uma poderosa técnica de quantificação de ácidos nucleicos. Basicamente, as análises de quantificação são realizadas com a utilização de marcadores fluorescentes nas reações de PCR, como o SYBR Green I, por exemplo (VAN ELSAS; BOERSMA, 2011). Assim, com o aumento da quantidade de ciclos da reação e o consequente aumento do número de cópias, um maior número de DNA vai sendo ligado à estrutura do marcador, aumentando sua fluorescência, a qual é captada por aparelhos sensíveis, produzidos especificamente para este fim (ÁLVARES et al., 2001).

Com o qPCR é possível detectar o ciclo exato em que a amplificação do DNA alvo ocorre. Esse ciclo é denominado de “Cycle Threshold” (C_t) e ele ocorre na fase exponencial da reação. Os valores de C_t obtidos são inversamente proporcionais à abundância de cópias de um gene em uma determinada amostra. Portanto, quanto maior a abundância de cópias do gene na amostra original, mais rapidamente será

detectado o aumento da fluorescência (com menores números de ciclos) e, conseqüentemente, menor será o valor de C_t (BUSTIN, 2005).

Essa é uma técnica muito aplicada em amostras de DNA extraídas do solo, o que permite a quantificação em tempo real do número de genes alvo por grama de solo, como os genes 16S e ITS rRNA (bactérias e fungos), ou até mesmo de alguns genes funcionais, como *nifH* e *amoA* (VAN ELSAS; BOERSMA, 2011). Maiores detalhes e elucidação sobre DGGE, qPCR e outras técnicas moleculares independentes de cultivo podem ser encontrados em Andreote (2007) e Van Elsas e Boersma (2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a influência da profundidade do solo, acompanhando todo sistema radicular até 8 m, e dos sistemas de plantios puros e mistos de *E. grandis* e *A. mangium* na estrutura das comunidades de bactérias totais, fungos totais e micorrízicos arbusculares do solo.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar, de forma qualitativa, a influência dos sistemas de plantios (puros e mistos) na estrutura das comunidades de bactérias totais, fungos totais e micorrízicos arbusculares do solo por meio de PCR-DGGE;

- Analisar a influência da profundidade do solo na estrutura das comunidades de bactérias totais, fungos totais e micorrízicos arbusculares do solo por meio de PCR-DGGE;

- Avaliar a abundância de genes ribossomais da comunidade de bactérias (16S - rRNA) e fungos (ITS - rRNA) por meio de PCR em tempo real (qPCR);

- Avaliar a densidade de esporos de FMA e a taxa de colonização radicular (%) por FMA e ECM nos diferentes sistemas de plantios e profundidades do solo em estudo;

- Correlacionar os dados de composição das comunidades microbianas com os fatores ambientais.

4 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

4.1 Justificativa

Em florestas de clima tropical, a presença de sistema radicular bem formado e profundo permite uma maior exploração do solo, maximizando a absorção de água nos períodos de maior escassez. Existe uma relação entre a altura da copa e profundidade de enraizamento. Em plantios de Eucalipto e Acácia, por exemplo, as raízes podem alcançar cerca de 17 e 12 metros de profundidade, respectivamente. Sabe-se que as raízes, ao absorverem água, liberam fontes carbonadas via exsudatos radiculares para o solo. Se as árvores florestais absorvem água e deslocam, via sistema radicular, energia metabolizável nas camadas mais profundas do solo, alguns questionamentos se tornam oportunos. É possível a ocorrência e como se estrutura as comunidades microbianas nesses nichos, em especial as de fungos e bactérias? As raízes finas presentes em profundidade são colonizadas por simbiontes, como as micorrizas? O entendimento da colonização do sistema radicular e da estrutura das comunidades microbianas presente em camadas profundas de solos com florestas plantadas de *E. grandis* e *A. mangium* ainda é bastante obscuro, principalmente em sistemas de plantios mistos entre as espécies. Nesse cenário, a busca por respostas se tornou necessária para preencher tais questionamentos, os quais justificam os esforços inseridos nessa pesquisa.

4.2 Hipóteses

I) O microbioma que acompanha o sistema radicular de cada espécie arbórea pode atingir no solo profundidades semelhantes às das raízes; II) a estrutura da comunidade de bactérias totais, de fungos totais e de fungos micorrízicos arbusculares tem significativa diferenciação de grupos entre as camadas do solo, variando em profundidade; III) árvores de florestas tendem a selecionar uma microbiota específica e uma planta pode ser mais importante do que outra na separação de grupos microbianos no solo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Sítio experimental e coleta das amostras

O estudo foi realizado na Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga (EECFI - 23°02' S 48°38' W), estado de São Paulo / Brasil, vinculada ao Departamento de Ciências Florestais (LCF) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / Universidade de São Paulo – ESALQ / USP. Os estudos microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo do Departamento de Ciência do Solo da mesma instituição.

A precipitação pluvial média registrada durante o ano de 2013 foi de 1.455,9 mm. O maior valor médio de precipitação registrado foi no mês de janeiro (268,7 mm), enquanto o período em que houve escassez de água ocorreu no mês de agosto (0,6 mm) (Figura 1).

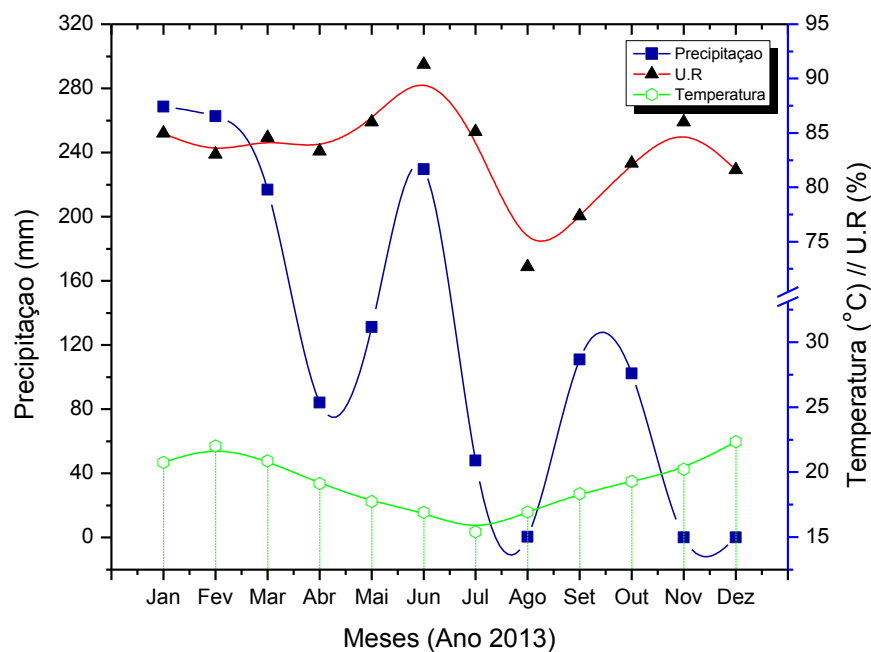


Figura 1 - Valores médios de precipitação (mm), umidade relativa (%) e temperatura (°C) referentes ao ano 2013 na Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga, ESALQ / USP

Segundo Voigtlaender et al. (2012) e Laclau et al. (2013), a região na qual foi implantando o experimento possui estação “quente” e “fria” bem definidas, sendo registradas baixas temperaturas entre os meses de junho (16,9 °C), julho (15,4 °C) e

agosto (16,9 °C), e de maior elevação da temperatura compreendendo os meses de dezembro (22,3 °C) janeiro (20,7 °C) e fevereiro (22,0 °C) (Figura 1).

O plantio foi feito num planalto ocidental que possui topografia suave-ondulada, característica típica do relevo do estado de São Paulo. O povoamento florestal foi situado no topo de uma colina com declividade menor que 3 % e ~830 m de elevação em relação ao nível do mar. Os solos da área foram classificados como Latossolos amarelos distróficos, oriundos de arenitos Cretáceos, da formação Marília, grupo Bauru (LACLAU et al., 2008; GONÇALVES et al., 2012).

5.1.2 Delineamento experimental

O delineamento utilizado na montagem do experimento foi inteiramente casualizado (DIC), composto por quatro blocos e sete tratamentos (Figura 3). Porém, para as análises microbiológicas propostas no presente trabalho, foram selecionados, dentre os sete originais, os tratamentos T1 – 100A (monocultura de *Acacia mangium* - espaçamento 3 m x 3 m); T2 - 100E (monocultura de *Eucalyptus grandis* - 3 m x 3 m) e T7 - 50A:50E (mistura 1:1 de *E. grandis* e *A. mangium*). Maiores informações sobre o histórico da área, delineamento e implantação da floresta aqui citada podem ser encontradas consultando Maire et al. (2013) e Bini et al. (2013b).

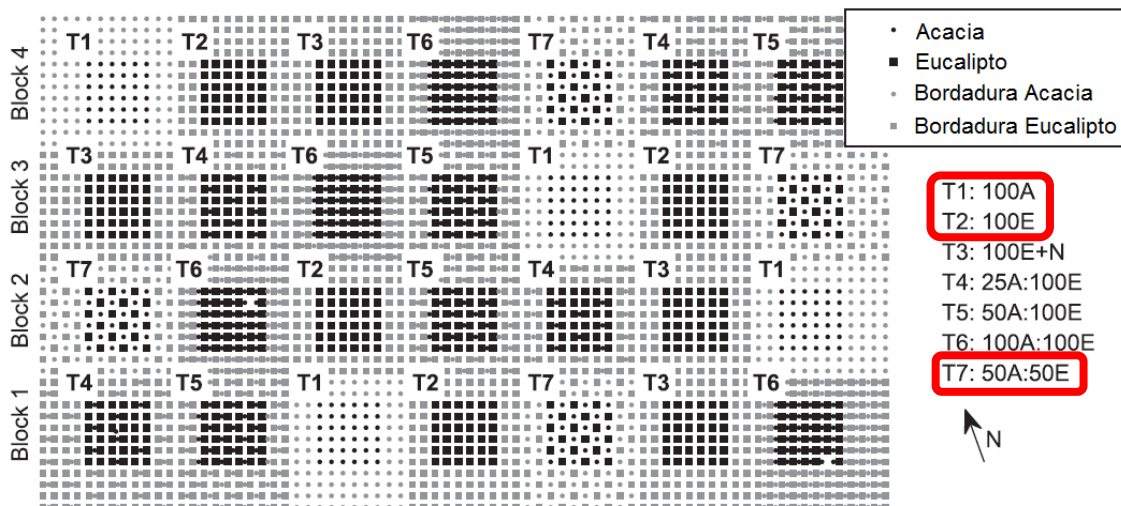


Figura 3 - Representação esquemática do delineamento experimental. Os tratamentos são numerados de T1 a T7. A área total compreende a um espaço de 220 x 130 m. Diagrama adaptado de Maire et al. (2013)

As amostras foram coletadas no ano de 2013 e durante o período de amostragem os estandes estavam com quatro anos de implantação. No intuito de verificar possíveis alterações na região de cada espécie de planta analisada, a área de consórcio foi subdividida. Foram realizadas amostragens na base de *A. mangium* A(A+E) e na base de *E. grandis* E(E+A). Cada parcela apresentou área total de 30 m x 30 m, porém, apenas 18 m x 18 m foram consideradas áreas úteis na abertura das trincheiras, sendo as bordas desconsideradas.

5.1.3 Abertura das trincheiras e obtenção das amostras

Foram construídas trincheiras profundas para coleta de solo e raízes nos tratamentos T1 - 100A; T2 - 100E e T7 - A(A+E) e E(E+A). Dez camadas foram selecionadas ao longo do perfil do solo de cada trincheira, sendo as mesmas equivalentes a |P1| 0-20 cm; |P2| 20-50 cm; |P3| 50-100 cm; |P4| 100-200 cm; |P5| 200-300 cm; |P6| 300-400 cm; |P7| 400-500 cm; |P8| 500-600 cm; |P9| 600-700 cm e |P10| 700-800 cm (Apêndice A). Nove amostras simples deram origem a uma amostra composta, obtendo-se, ao término, 4 repetições em cada profundidade amostrada. Cerca de 25 cm das paredes externas da trincheira foram descartados em cada camada, assegurando que o solo coletado não sofresse contaminação por eventuais partículas de solo oriundas de partes mais elevadas da trincheira. Parte das amostras de solo coletadas (400 g), foram submetidas a análises físicas e químicas no Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ / USP.

5.2 Análises microbiológicas

5.2.1 Extração do DNA presente nas amostras do solo

O DNA genômico foi extraído a partir de 400 mg de solo e para isso foi utilizado o kit comercial de extração PowerSoil® DNA Isolation (MoBio, Carlsbad, EUA), seguindo o protocolo informado pelo fabricante. Após a extração, cerca de 5 µL das amostras foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5 %, com tampão TAE 1x [400 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA], o qual foi posteriormente corado com GelRed™ (0,5 µg mL⁻¹), visualizado e fotodocumentado em transiluminador sob luz ultravioleta (DNR – Bio Imaging Systems/MiniBis Pro).

5.2.2 Estrutura das comunidades microbianas por PCR-DGGE

5.2.2.1 Amplificação da região 16S rRNA de bactérias presentes no solo

As reações de amplificação da região V6 do gene 16S rRNA de bactérias foi realizada com os *primers* 027F (5' -GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3') e 1492R (5' -TACCTTGTACGACTT- 3') (NÜBEL et al., 1996). A amplificação foi realizada com desnaturação inicial de 94 °C por 1 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 63 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, seguida de uma extensão final de 72 °C por 10 min. Todas as reações de PCR tiveram um volume final de 25 µL. Um microlitro dos *amplicons* obtidos na reação anterior foi utilizado como DNA molde em uma segunda reação (Nested-PCR). Para tanto, foram utilizados os *primers* 968 (5' "GC-Clamp" - AACGCGAAGACCTTAC- 3') e 1387R (5' -CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG- 3') (HEUER et al., 1997). As condições de amplificação foram programadas em termociclador (Viriti® Applied Biosystems), com desnaturação inicial de 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos 95 °C por 1 min, 56 °C por 1 min 72 °C por 2 min, e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Nesta última reação, o volume final foi de 50 µL. O primeiro e o segundo ciclo de amplificação resultaram em *amplicons* de aproximadamente 1465_{pb} e 430_{pb}, respectivamente.

Para a confirmação da amplificação dos produtos de PCR obtidos, cerca de 5 µL foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TAE 1x, corados com GelRed™ (0,5 µg mL⁻¹), visualizados em transiluminador (DNR – Bio Imaging Systems/MiniBis Pro) sob luz UV e fotodocumentados, sendo os tamanhos dos *amplicons* estimados por comparação com o GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas Life Sciences®). O procedimento descrito neste parágrafo também foi realizado para todas as reações de PCR descritas a seguir.

5.2.2.2 Amplificação da região 18S rRNA de fungos totais do solo

Foram utilizados os *primers* NS1 (5' -GTAGTCATATGCTTGTCTC- 3') e NS8 (5' -TCCGCAGGTTACCTACGGA- 3') em uma primeira reação de amplificação (WHITE et al., 1990) para a região gênica 18S. Tais iniciadores amplificam um fragmento de DNA equivalente a 1700_{pb}. Um microlitro do produto da primeira reação foi utilizado como DNA molde em uma Nested-PCR, com *primers* específicos para DGGE. Neste caso, foram utilizados NS1 (5' -GTAGTCATATGCTTGTCTC- 3') e Fung-GC (5' "GC-Clamp" -ATTCCCCGTTACCCGTTG- 3'), os quais amplificam

fragmentos de 300_{pb}, aproximadamente (MÖHLENHOFF et al., 2001). Ambas as reações tiveram volume final de 25 µL.

5.2.2.3 Amplificação da região 18S rRNA de FMA presentes no solo

Um microlitro do produto obtido na primeira reação citada no tópico anterior, (5.2.2.2), usando NS1/NS8, foi usado como DNA molde em um Nested-PCR com o par de *primers* AM1 (5' -GTTTCCCGTAAGGCGCGCAA- 3') (HELGASON et al., 1999) e NS31-GC (5' "GC-Clamp" -TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC- 3') específicos para micorrizas arbusculares (SIMON et al., 1992). Essa última reação resultou em *amplicons* com aproximadamente 580_{pb}.

As reações citadas com o uso dos *primers* NS1/NS8, NS1/Fung-GC e AM1/NS31-GC foram realizadas em termociclador (Viriti® *Applied Biosystems*), programado para operar com desnaturação inicial equivalente a 94 °C por 5 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 30 s e 1 min e 30 s, seguida de uma extensão final de 72 °C por 5 min.

5.2.2.4 Aplicação da técnica de DGGE

A análise de DGGE foi realizada com o auxílio do aparelho phoU2 system (Ingeny, Goes, Holanda) seguindo metodologia adaptada de Muyzer et al. (1993). Os produtos de PCR, nos quais os *primers* continham os "GC-Clamps", foram carregados em gel de poliacrilamida 6% para bactérias e 8% para fungos totais e FMA, na proporção 30:1 acrilamida:bis-acrilamida. Foi usado gradiente desnaturante de ureia e formamida equivalente a 45%-65% (bactérias), 15%-50% (fungos totais) e 25%-65% (FMA), onde 80% significa a concentração de 5,6M de ureia e 32% de formamida deionizada. Para a eletroforese, foram utilizados 12 µL dos produtos de PCR acrescidos com 5 µL de *Loading Buffer* 6 x. A corrida de DGGE foi realizada a 60 °C e submetida a uma corrente de 100 volts durante 16 horas. Os géis foram corados com SYBR-green® (Invitrogen, Breda, The Netherlands), em TAE 0,5 x, por 15 minutos na ausência de luz e escaneados em Storm 845: New Phosphorimager/Gel Scanner.

5.2.2.5 Análise de PCR em tempo real (qPCR) da região ITS e 16S rRNA

A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada com o uso do StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) e nas reações de amplificação foi utilizado o marcador fluorescente Syber® Green PCR Master Mix 2 x (Applied Biosystems®).

Os *primers* ITS1F (5' -CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA- 3') e 5.8S (5' -CGCTGCGTTCTTCATCG- 3') foram utilizados para os grupos de fungos, gerando fragmentos de aproximadamente 300_{pb} (FIERER et al., 2005). Para grupos de bactérias, foram usados os *primers* 341F 1 (5' -CCTACGGGAGGCAGCAG- 3') e 534R 2 (5' -ATTACCGCGGCTGCTTGG- 3') (LOPEZ-GUTIERREZ et al., 2004).

As reações foram feitas com quatro réplicas por amostra e cada uma teve o volume final de 25 µL. Um microlitro de DNA molde foi usado em cada reação de amplificação e as mesmas foram realizadas em placas MicroAmp Optical 48-Well. Em todos os experimentos, dois controles negativos (ausência de DNA) foram submetidos às mesmas condições que as amostras alvo, excluindo qualquer possível contaminação externa. Além disso, as curvas de *melting* também foram adicionadas em cada corrida para monitorar a pureza dos produtos amplificados.

Amostras para amplificação do gene ITS foram submetidas a um ciclo de desnaturação inicial equivalente a 94 °C por 15 min, seguido de 40 ciclos de amplificação a 94 °C por 1 min, 53 °C por 30 s e 72 °C por 1 min (FIERER et al., 2005). Para quantificação do gene 16S, as amostras foram submetidas a um ciclo de desnaturação inicial equivalente a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, sendo realizada ao término uma extensão final de 72 °C por 45 s (MOSONI et al., 2007).

Curvas padrões conhecidas foram utilizadas em diluições seriadas (10^{-2} a 10^{-8}) em todas reações realizadas, possibilitando que os dados obtidos nas amostras de solo (valor Ct) fossem interpolados entre os valores das curvas, determinando o número de cópias do gene 16S e ITS por grama de solo.

5.2.2.6 Extração de esporos de FMA presentes no solo

A extração de esporos de FMA foi realizada segundo o método de peneiramento úmido e decantação de 50 g de solo (GEDERMANN; NICOLSON, 1963). Crivos de tamanhos diferenciados (0,71 mm e 0,045 mm) foram utilizados no processo de peneiramento úmido. Os esporos coletados na peneira 0,045 mm foram

transferidos para tubos Falcon (50 mL) e centrifugados em solução de sacarose (70 %), por 3 minutos a 3.500 rpm (LABCARE - Jouan BR4i) conforme (BONFIM, 2011). O sobrenadante foi lavado e passado em peneira de 0,045 mm. Os esporos retidos foram transferidos para tubos Falcon (50 mL) e armazenados a -20 °C até o momento da avaliação.

Os esporos extraídos foram contados com o auxílio de microscópio estereoscópico (40x), sendo separados e agrupados de acordo com a cor, o tamanho e a forma apresentada. Apenas os esporos aparentemente saudáveis foram inseridos na contagem, sendo eliminados os que se apresentaram vazios. Após a contagem e separação, os esporos foram montados em lâminas semipermanentes usando resina de álcool polivinílico, glicerol (PVLG) e reagente de Melzer (1:1) (MORTON et al., 1993). Os esporos foram cuidadosamente quebrados para a exposição das paredes internas.

A classificação taxonômica foi realizada usando um microscópio óptico (100 a 400 x), tendo auxílio do manual de Schenck e Pérez (1990) e informações contidas na Coleção Internacional de Fungos Micorrízicos Arbusculares e Vesiculares (INVAM), disponível em <http://invam.wvu.edu>. Este último procedimento foi realizado na Agroscope Reckenholz / Tänikon Research Station – Suíça, durante o estágio de pesquisa no exterior da aluna de doutorado Joice Andrade Bonfim, a qual teve supervisão do Prof. Dr. Fritz Oehl, especialista em taxonomia de FMA.

O número total de esporos, assim como o de cada espécie, foi determinado tendo como base o número de esporos presentes em uma amostra de 50 g de solo. Além do mais, foram calculados: I - Abundância Relativa (AR) de cada gênero identificado, por meio da equação: $AR = (J_i / K) \times 100$, sendo J_i referente ao número total de esporos de cada gênero e K ao número total de esporos contidos na amostra; II - Riqueza de espécies (R), determinada pelo número de espécies presentes em 50 g de solo; III - Índice de diversidade de Shannon (H) [$H = -\sum (p_i \log p_i)$], onde: $p_i = n_i / N$; n_i = número de esporos em cada espécie de fungo micorrízico arbuscular e N = número total de espécies (BONFIM et al., 2013).

5.2.2.7 Avaliação da colonização radicular por FMA e ECM

Para avaliação da colonização radicular por FMA, as raízes foram lavadas em água corrente, sendo posteriormente cortadas em segmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento. Cerca de 0,5 g dos segmentos foram diafanizados em

solução de KOH 10 %, com duração de imersão dependendo das características das raízes (cor, espessura etc.). Quando os segmentos apresentaram coloração visualmente clara, foram imersos em nova solução de KOH 10 %, passando cerca de 30 minutos em água a 90 °C (BRUNDRETT et al., 1996). Segmentos mais escuros foram adicionalmente branqueadas com solução de peróxido de hidrogênio alcalino H₂O₂ (10 %), por 3 minutos à temperatura ambiente. Ao término desta etapa, os segmentos receberam coloração com tinta de caneta azul (Paker – Quink®) por 15 segundos em banho com água a 90 °C, sendo posteriormente conservadas em solução de Lactoglicerol (1:1:1 ácido láctico, glicerol e água) (BRUNDRETT et al., 1996). Segmentos de 1 cm foram montados em lâminas de microscopia e fixadas com glicerol ácido. Foram montadas 5 lâminas para cada repetição e analisados 10 segmentos de raízes em cada lâmina (PHILLIPS; HAYMAN, 1970; GIOVANETTI; MOSSE, 1980; MELLONI; CARDOSO, 1999).

O percentual do comprimento de raiz colonizada por ECM foi determinado pelo método de intersecção em placa com fundo quadriculado, sob lupa binocular (40 x) (BRUNDRETT, 1996; CAMPOS et al., 2011). Os segmentos que apresentavam radículas com ramificações curtas modificadas (em “Y” ou “I”, na maioria das vezes), foram considerados colonizados por ECM, conforme exemplos no Apêndice B.

5.3 Análise estatística

As imagens digitais dos géis de DGGE foram convertidas em uma matriz de dados, gerando uma planilha na qual foram registradas presença e/ou ausência de banda, com o auxílio do software ImageQuant TL unidimensional (Amersham Biosciences, Amersham, UK, v. 2003). As diferenças na estrutura da comunidade microbiana nas camadas do solo e nos tratamentos foram exploradas por meio da análise de coordenadas principais (PCoA) e a similaridade entre os agrupamentos foram testados pela análise de ANOSIM, ambas realizadas usando o software estatístico Primer-E 6+. Para discriminar quais variáveis físicas e químicas do solo melhor explicariam a variância no perfil das comunidades microbianas, os dados foram submetidos, inicialmente, a uma análise de DCA. Na DCA, quando os valores dos primeiros eixos foram $< 4,00$ (*Length of gradient* $< 4,00$), uma distribuição linear foi caracterizada, indicando condição favorável para aplicação da análise de

redundância (RDA). Paralelo a RDA foi realizado o teste de Monte Carlo, o qual considera 499 permutações aleatórias e exibe os valores (significativos ou não) de “ p ” e o percentual de explicação (λ - λA) dos atributos avaliados na distribuição da comunidade microbiana no solo. Os três últimos, DCA, RDA e o Teste de Monte Carlo, foram executados com o auxílio do software Canoco® for Windows v. 4.5. Os valores de colonização por FMA e ECM foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com a utilização do software Sisvar® v. 5.0.

6 RESULTADOS

6.1 Atributos físicos e químicos do solo

Não foram detectadas alterações marcantes nos atributos químicos quando comparados os tratamentos estudados. Os valores decresceram significativamente com o aumento da profundidade do solo. Exceção ocorreu nos valores de pH, que apresentou leve aumento em profundidade, porém, se manteve abaixo de 5,0 na maioria dos plantios. De forma geral, os valores dos atributos foram baixos e a maioria se enquadrou fora do limite de detecção nas camadas inferiores a 20 cm, como por exemplo, os cátions K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} em todos os tratamentos. Mesmo em camadas superficiais (0-20 cm), os solos apresentaram valores de V % menores que 50 %, com baixo percentual de soma de bases (SB) e capacidade de troca de cátions (CTC) (Anexo A).

Os valores de matéria orgânica do solo (M.O.S) reduziram drasticamente com a profundidade. Os plantios mistos apresentaram, quando comparados com as monoculturas, menores valores de M.O.S em 20 cm de profundidade. O tratamento 100E apresentou pontos de iluviação de M.O.S nas camadas 100-200 cm, 200-300 cm e 300-400 cm, as quais tiveram 9 g kg^{-1} (0,9 %); 51 g kg^{-1} (5,1 %) e 6 g kg^{-1} (0,6 %) de M.O.S, respectivamente. As camadas analisadas foram, em sua maioria, classificadas texturalmente como “Média-arenosa”, exceto no plantio de *A. mangium*, a qual se enquadrou como “Arenosa” em 0-20, 20-50 e 50-100 cm (Anexo B).

6.2 Comunidades microbianas no solo

6.2.1 A comunidade de bactérias

6.2.1.1 Influência da profundidade do solo na estrutura da comunidade

Foi constatada a presença de bactérias com número expressivo de bandas em todos os tratamentos e camadas de solos. Contudo, uma diminuição na abundância e intensidade das bandas foi percebida, principalmente quando analisadas amostras de solo oriundas das camadas abaixo de 100 cm de profundidade (géis não apresentados). A análise de coordenadas principais (PCoA) exibiu uma ordenação complexa dos grupos microbianos, revelando forte influência da profundidade do solo na estrutura das comunidades (Figura 4).

Ao longo das camadas, as comunidades microbianas apresentaram 3 agrupamentos espacialmente distinguíveis, designados “a1” “a2” e “a3”, formando um gradiente de estruturação. Nas camadas 0-20 cm, 20-50 cm e 50-100 cm (agrupamento “a1”), as comunidades se agruparam uniformemente em todos os plantios. Na maioria das vezes, grupos bem estruturados se formaram em pontos intermediários, como nas camadas 100-200 cm, 200-300 cm e 300-400 cm (agrupamento “a2”), principalmente na monocultura do Eucalipto e nos plantios consorciados E(E+A) e A(A+E). Grupos presentes em camadas abaixo de 400 cm (agrupamento “a3”) tiveram comportamento disperso, isto é, com estruturação pouco definida, o que tornou difícil a interpretação (Figura 4).

Os agrupamentos detectados na PCoA foram testados pela análise de similaridade de ANOSIM. Em 100A não foi possível identificar separação significativa entre a maioria dos agrupamentos. A comunidade superficial de bactérias presentes nos tratamentos 100E, E(E+A) e A(A+E), mostraram-se distintas do grupo “a2” (intermediárias). Contudo, nestes mesmos plantios, com exceção do 100E, ocorreu forte sobreposição dos agrupamentos “a1” (superficiais) com a comunidade presente em camadas mais profundas (Tabela 1). Plantios mistos, com amostras coletadas na base do Eucalipto E(A+E), estruturaram mais a comunidade de bactérias em profundidade. No plantio citado, E(A+E), os grupos “a1” e “a2” se separaram com sobreposição ($R_{\text{(Bray-Curtis)}} = 0,59$) e tiveram ausência de similaridade com as amostras do grupo “a3”, sendo possível perceber um gradiente de estruturação mais bem definido da comunidade ao longo do perfil do solo (Figura 4; Tabela 1).

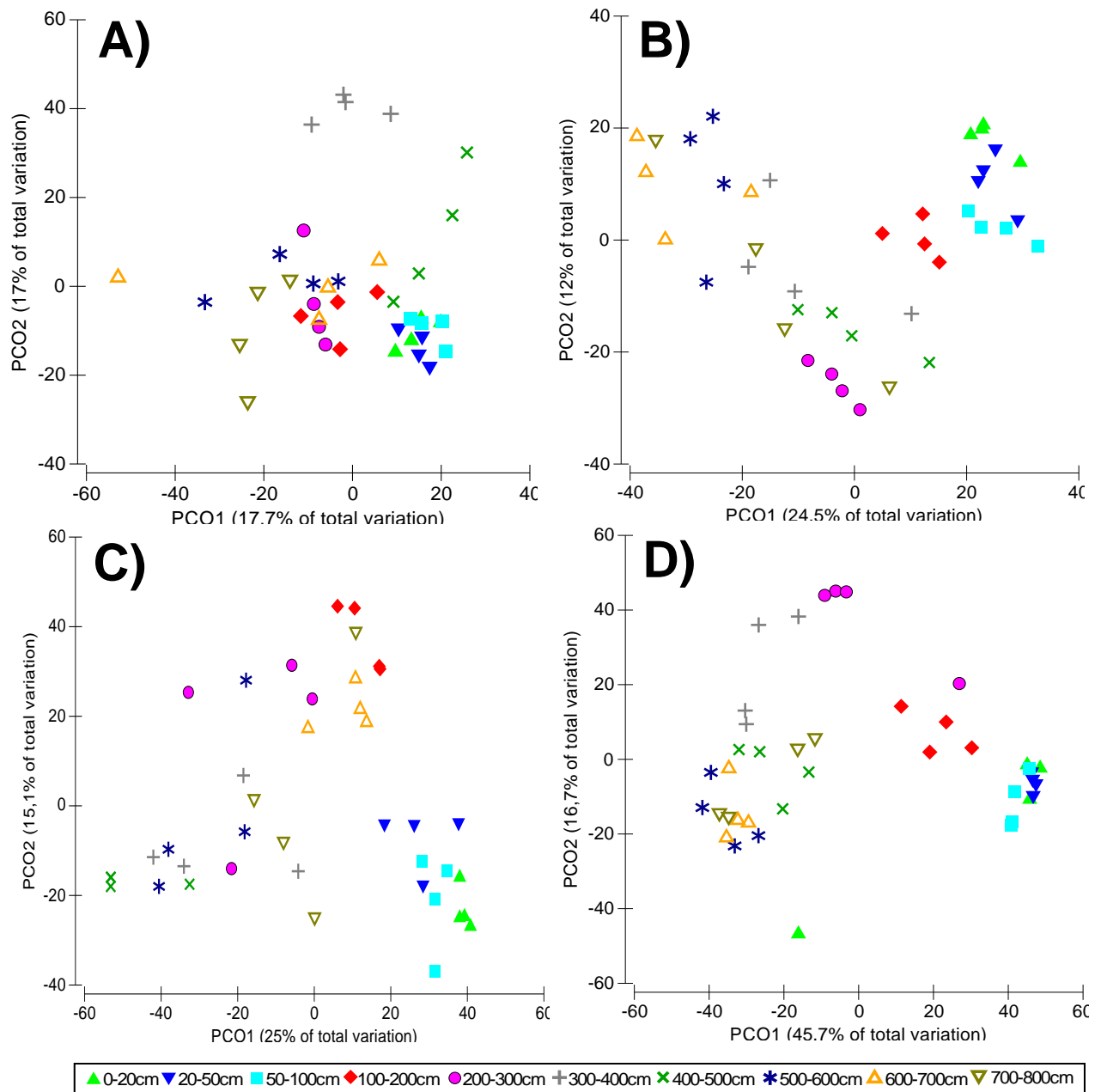


Figura 4 - Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de bandas (16S rRNA) referentes às comunidades de bactérias num gradiente de profundidade do solo. A), plantio de *A. mangium* em sistema monoespecífico (100A); B), plantio misto entre *A. mangium* e *E. grandis*, com amostras coletadas na base da Acácia A(A+E); C), plantio de *E. grandis* em sistema monoespecífico (100E) e D), plantio misto entre *A. mangium* e *E. grandis*, com amostras coletadas na base do Eucalipto E(E+A)

Tabela 1 - Análise de similaridade de ANOSIM (algoritmo de *Bray-Curtis*) para agrupamentos da comunidade bacteriana total (16S rRNA) em cada camada do solo estudado

100A	R values	<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	0	0,994	0,01087
	<u>a2</u>	-	0	0,4601*
	<u>a3</u>	-	-	0
A (A+E)		<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	0	0,713*	0,3134*
	<u>a2</u>	-	0	0,08518
	<u>a3</u>	-	-	0
100E		<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	0	0,6808*	0,4853*
	<u>a2</u>	-	0	0,275*
	<u>a3</u>	-	-	0
E (E+A)		<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	0	0,5911*	0,8841*
	<u>a2</u>	-	0	0,5545*
	<u>a3</u>	-	-	0

*(p) significativo. Valores de R superiores a 0,75 indicam separação entre as amostras, $R > 0,5$ indicam separação com sobreposição e $R < 0,5$, as amostras não apresentam diferenças significativas. "a1", camadas superficiais do solo (0-100 cm); "a2", camadas intermediárias (100-400 cm) e "a3", camadas profundas (400-800 cm)

6.2.1.2 Influência dos sistemas de plantios na estrutura da comunidade

Para avaliar a influência do sistema de plantio na estrutura das comunidades de bactérias, amostras superficiais de cada tratamento foram monitoradas por PCR-DGGE. Os tratamentos influenciaram as comunidades bacterianas do solo. Os perfis da comunidade do tratamento 100E apresentou separação significativa ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 0,712$, $p < 0,0001$) dos demais tratamentos estudados 100A, A(A+E) e E(E+A), que ficou coordenado em uma posição separada na PCoA (Figura 2). Uma integração dos grupos bacterianos presentes nos tratamentos mistos A(A+E) e E(E+A) com a monocultura da *Acacia mangium* foi percebida. Nestes últimos, os valores de $R_{\text{Bray-Curtys}}$ variaram de 0,254 a 0,410, o que detecta alta similaridade entre os perfis das comunidades destes plantios (Figura 5).

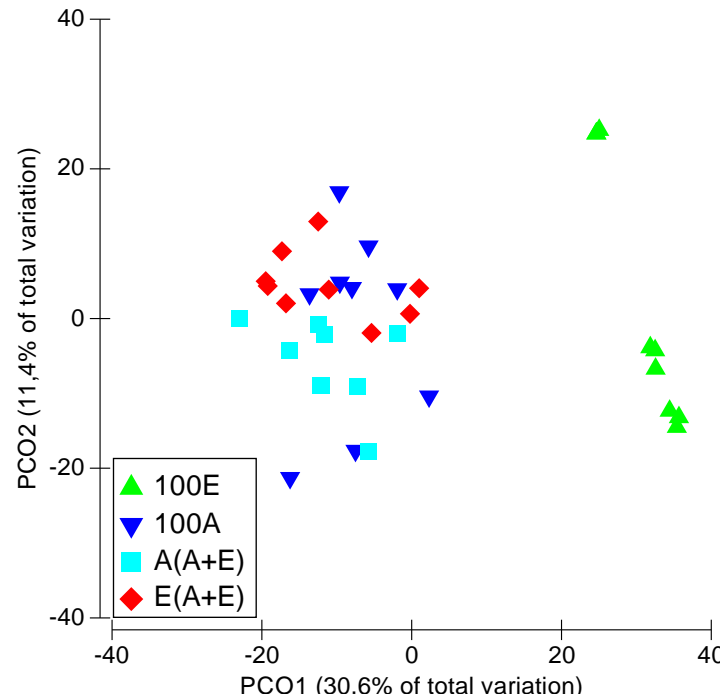


Figura 5 – Análise de coordenadas principais (PCoA) referentes à comunidade bacteriana total do solo (16S rRNA) em sistemas de plantios monoespecíficos e mistos de *E. grandis* e *A. mangium*

6.2.1.3 Correlação do perfil da comunidade com dados ambientais

Os perfis das comunidades obtidos por DGGE foram correlacionados com os atributos físicos e químicos do solo por meio de uma análise de redundância (RDA). Esse procedimento indica quais dos atributos contribuem na distribuição das comunidades microbianas no solo. Inicialmente, foi realizada uma RDA geral, englobando os perfis da comunidade de cada tratamento (incluindo todas as camadas do solo) e outra mais específica, incluindo os perfis da comunidade quando todos os plantios (com amostras superficiais) foram agrupados dentro de um único gel de DGGE.

Os atributos químicos que mais contribuíram para a separação dos perfis da comunidade bacteriana nas camadas profundas do solo foi o pH ($\lambda A = 14\%$), P disponível ($\lambda A = 26\%$), Ca^{2+} ($\lambda A = 10\%$), $H+Al$ ($\lambda A = 9\%$), com destaque para o valor de Al^{3+} , que apresentou $\lambda A = 89\%$. Com relação aos atributos físicos, destacam-se a Areia ($\lambda A = 22\%$), Silte ($\lambda A = 13\%$), Argila ($\lambda A = 12\%$) e M.O.S ($\lambda A = 15\%$) (Tabela 2A). Contudo, esses atributos não foram capazes de expressar alto percentual de explicação quando comparados os perfis da comunidade envolvendo

todos os plantios no mesmo gel. Neste caso, o valor de λA para o P disponível foi (5 %), K (4 %), H+Al (6 %), Silte (5 %), Argila (6 %) e M.O.S (8 %) (Tabela 2B; Figura 6). Esses últimos, com exceção do P e do valor de Silte, foram diretamente relacionados com o perfil da comunidade bacteriana presente no tratamento 100E. Os valores de pH, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} e Areia não tiveram correlação positiva com nenhum agrupamento da comunidade bacteriana do solo, apresentando valores de “ p ” superiores a 5% de significância (Tabela 2).

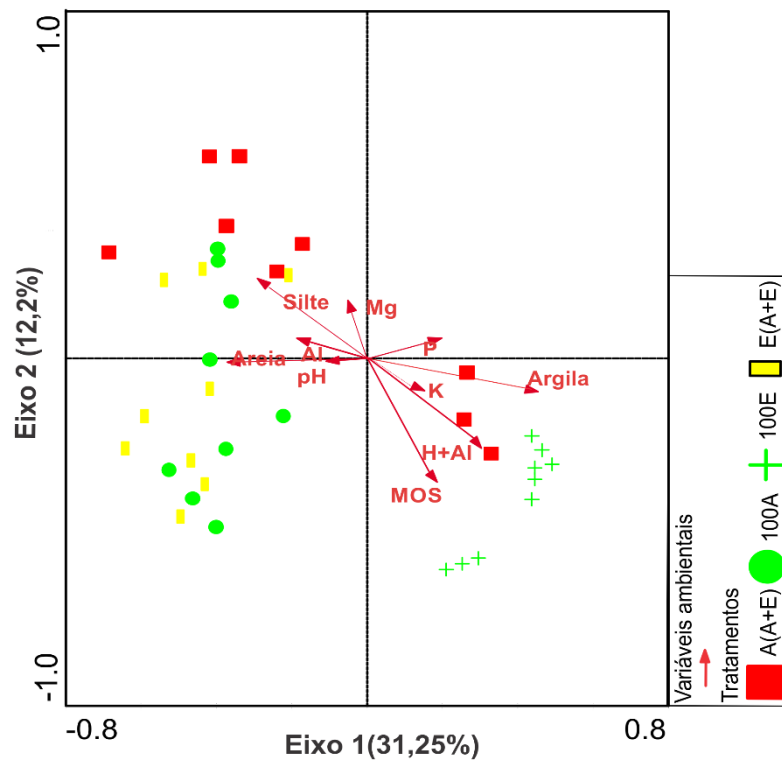


Figura 6 - Análise de redundância (RDA) entre os perfis da comunidade de bactérias totais e os atributos físicos e químicos do solo

Tabela 2 - Análise de correlação entre atributos físicos e químicos do solo com os perfis de bandas de bactérias do solo (16S rRNA). A) perfis da comunidade de cada tratamento individual, incluindo todas as profundidades. B) Perfis da comunidade quando avaliados todos os plantios juntos. Os valores de ($\lambda A\%$) representam o percentual de explicação de cada variável e (p) seu respectivo índice de significância

A)

Manejos	pH		P		K ⁺		Ca ²⁺		Mg ²⁺		Al ³⁺		H+Al		Areia		Silte		Argila		M.O.S	
	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	P	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p
100 ^a	3%	0,178	-	-	-	-	-	-	-	-	6%	0,002	5%	0,002	15%	0,002	4%	0,014	6%	0,004	4%	0,034
100E	3%	0,472	8%	0,002	-	-	-	-	-	-	24%	0,002	2%	0,316	4%	0,024	3%	0,068	1%	0,996	3%	0,526
A(A+E)	2%	0,516	10%	0,002	-	-	6%	0,002	-	-	21%	0,002	2%	0,660	2%	0,816	4%	0,006	3%	0,086	4%	0,010
E(E+A)	6%	0,002	8%	0,002	-	-	4%	0,002	-	-	38%	0,002		1%	0,680	2%	0,106	3%	0,014	4%	0,012	
Total*	14%		26%				10%				89%		9%		22%		13%		12%		15%	

* Soma das percentagens da explicação de cada tratamento avaliado

B)

	pH		P		K ⁺		Ca ²⁺		Mg ²⁺		Al ³⁺		H+Al		Areia		Silte		Argila		M.O.S	
	λA	p	λA	P	λA	p	λA	p	λA	P	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p
Total	-	-	5%	0,002	4%	0,008	-	-	-	-	-	-	6%	0,002	-	-	5%	0,004	6%	0,002	8%	0,018

6.2.1.4 Abundância do gene 16S por qPCR

Nas reações de quantificação, o valor médio de eficiência (E) foi de 0,91, ao passo que os valores de regressão logarítmica (R^2) inseridos na curva normal foram de 0,98. Não foram encontradas diferenças significativas no número de cópias do gene 16S nas camadas superficiais dos tratamentos avaliados. Porém, ocorreu forte redução no número de cópias do gene 16S com o aumento da profundidade. Os valores de Log_{10} variaram de 9,5 a 10,5 nas camadas superficiais, exibindo queda exponencial e chegando a um “equilíbrio” nas camadas profundas de 2 metros (Figura 7). A monocultura de Eucalipto apresentou maior número de cópias do gene 16S nessas camadas (Log -médio de 7,6), (Figura 7).

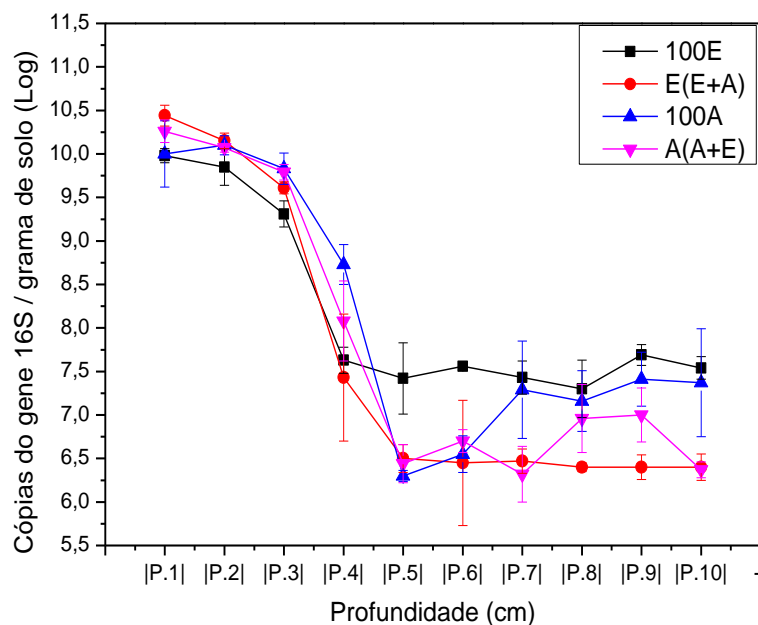


Figura 7 - Número de cópias do gene 16S rRNA por grama de solo nos tratamentos e profundidades amostradas. |P1| 0-20 cm; |P2| 20-50 cm; |P3| 50-100 cm; |P4| 100-200 cm; |P5| 200-300 cm; |P6| 300-400 cm; |P7| 400-500 cm; |P8| 500-600 cm; |P9| 600-700 cm e |P10| 700-800 cm

6.2.2 A comunidade fúngica total

6.2.2.1 Influência da profundidade do solo na estrutura da comunidade

Os perfis de DGGE da comunidade de fungos totais do solo exibiram uma distribuição randômica na maioria dos plantios, com pouca diferenciação significativa

entre os agrupamentos (Figura 8). Exceção é dada aos perfis de DGGE avaliados no tratamento A(A+E), os quais apresentaram estruturação da comunidade mais definida em profundidade, a ponto de distinguir facilmente grupos em cada camada (Figura 8). A maior diferenciação de grupos ocorrida em A(A+E) e a aleatorização dos perfis de fungos nos demais plantios foram identificadas pela análise de similaridade de ANOSIM (Tabela 3).

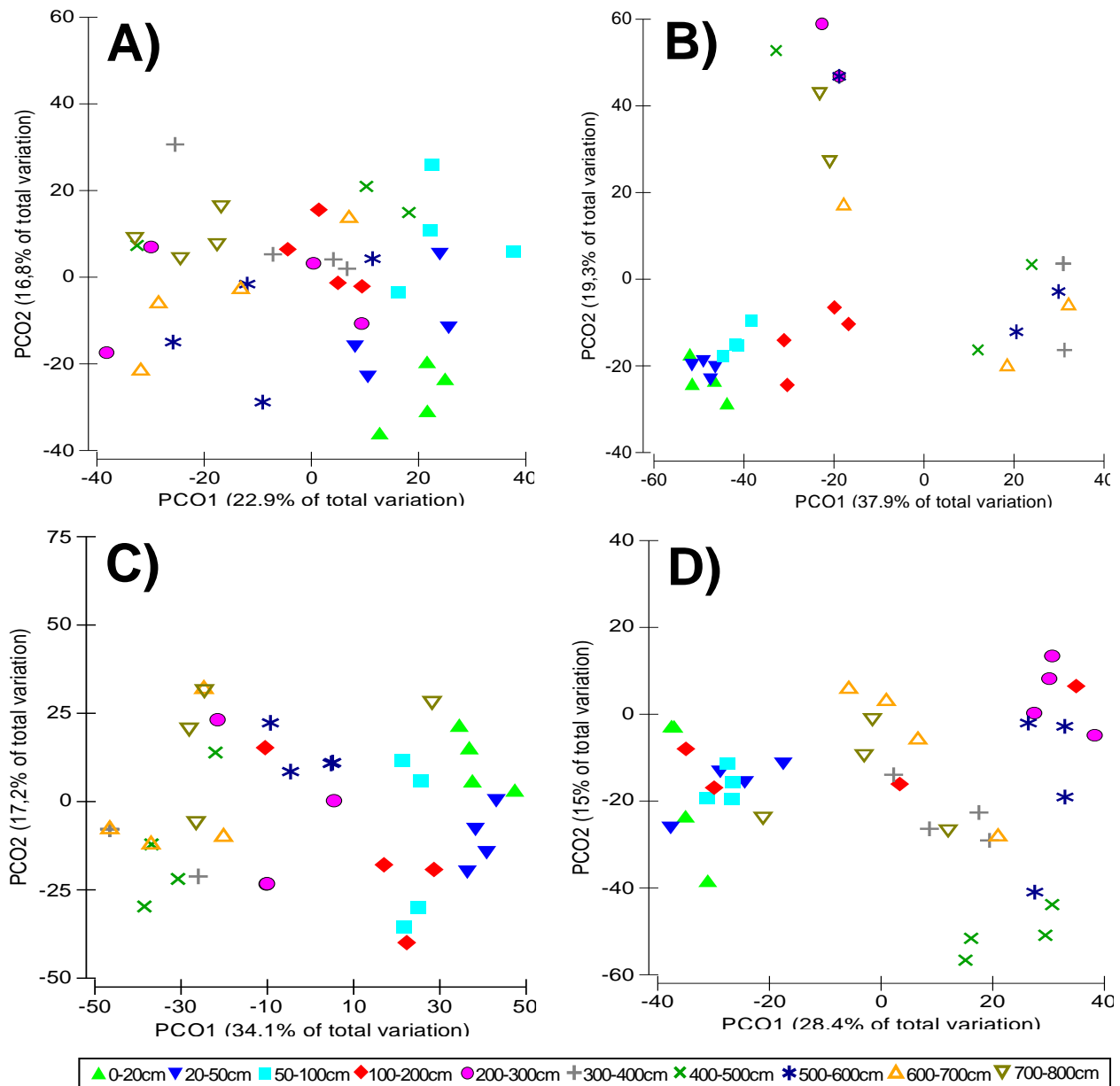


Figura 8 - Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de bandas (18S rRNA) referentes às comunidades de fungos totais num gradiente de profundidade do solo. A), plantio de *A. mangium* em sistema monoespecífico (100A); B), plantio misto entre *A. mangium* e *E. grandis*, com amostras coletadas na base da Acácia A(A+E); C) plantio de *E. grandis* em sistema monoespecífico (100E) e D), plantio misto entre *A. mangium* e *E. grandis*, com amostras coletadas na base do Eucalipto E(E+A)

Tabela 3 - Análise de similaridade de ANOSIM baseada no algoritmo de *Bray-Curtis*. Agrupamentos da comunidade de fungos totais (18S rRNA) em cada plantio e profundidade estudados

100A	R values	<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	-	0,3847*	0,2231*
	<u>a2</u>	-	-	0,2122*
	<u>a3</u>	-	-	-
A (A+E)		<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	-	0,7123*	0,6077*
	<u>a2</u>	-	-	0,7088*
	<u>a3</u>	-	-	-
100E		<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	-	0,3244*	0,3776*
	<u>a2</u>	-	-	0,1776*
	<u>a3</u>	-	-	-
E (E+A)		<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	-	0,4398*	0,4183*
	<u>a2</u>	-	-	0,1266*
	<u>a3</u>	-	-	-

*(p) significativo. Valores de R superiores a 0,75 indicam separação entre as amostras, $R > 0,5$ indicam separação com sobreposição e $R < 0,5$, as amostras não apresentam diferenças significativas. "a1", camadas superficiais do solo (0-100 cm); "a2", camadas intermediárias (100-400 cm) e "a3", camadas profundas (400-800 cm)

6.2.2.2 Influência dos sistemas de plantios na estrutura da comunidade

Não foi detectada forte influência do sistema de plantio no perfil de fungos totais do solo obtidos por DGGE. Os tratamentos 100E, 100A e E(E+A), apresentaram alta semelhança entre si, a qual foi percebida na PCoA e também na ANOSIM. Estes plantios (100E, 100A e E(E+A)) apresentaram tendência de separação com o perfil da comunidade de fungos dos plantios mistos com amostras coletadas na base da Acácia. Entretanto, a análise estatística não confirmou essa separação, detectando apenas uma leve sobreposição entre as comunidades (Tabela 4; Figura 9).

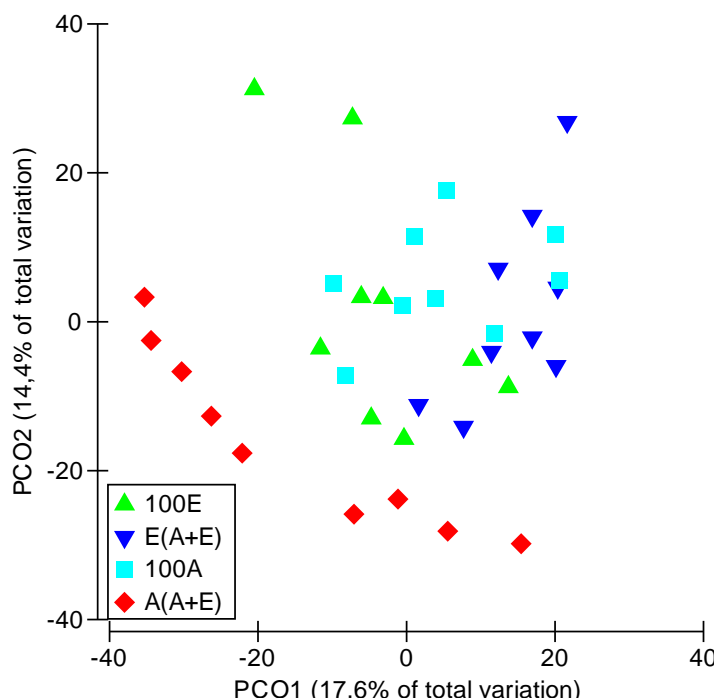


Figura 9 – Análise de coordenadas principais (PCoA) referentes a comunidade de fungos totais do solo (18S rRNA) em sistemas de plantios mono específicos e mistos de *E. grandis* e *A. mangium*

Tabela 4 - Análise de similaridade de ANOSIM (algoritmo de *Bray-Curtis*) para agrupamentos da comunidade de fungos totais do solo (18S rRNA) em cada sistema de plantio

R values	100E	E(E+A)	100A	A(A+E)
100E	0	0,3471*	0,09362	0,4177*
E(E+A)	-	0	0,2891*	0,5002*
100A	-	-	0	0,5668*
A(A+E)	-	-	-	0

*(p) significativo. Valores de R superiores a 0,75 indicam separação entre as amostras, R > 0,5 indica separação com sobreposição e R < 0,5 não apresentam diferenças significativas

6.2.2.3 Correlação do perfil da comunidade com dados ambientais

Globalmente, os atributos que mais contribuíram na estruturação da comunidade de fungos totais nas camadas do solo foi a M.O.S, com percentual de explicação equivalente a ($\lambda A = 17\%$), seguida de acidez potencial ($\lambda A = 18\%$), P

disponível ($\lambda A = 20\%$) e, com maior destaque, o valor de Al^{3+} , que explicou ($\lambda A = 83\%$) da variância dos dados (Tabela 5A).

Quando o perfil de fungos foi analisado em géis de DGGE contendo amostras de todos os tratamentos (plantios), os atributos físicos e químicos que tiveram participação na estruturação da comunidade foi o pH ($\lambda A = 2\%$), K^+ ($\lambda A = 3\%$), Al^{3+} ($\lambda A = 4\%$), $H+Al$ ($\lambda A = 5\%$), Argila ($\lambda A = 6\%$) e, com maior expressão, os valores de fósforo, os quais expressaram correlação positiva com o perfil da comunidade presente no tratamento A(A+E), atingindo valor de lambda equivalente a ($\lambda A = 17\%$) (Tabela 5B; Figura 10). Dentre os fatores avaliados, os valores de Ca^{2+} , Mg^{3+} , Areia e Silte não tiveram valores significativos a $p < 0,05$ (Tabela 5B).

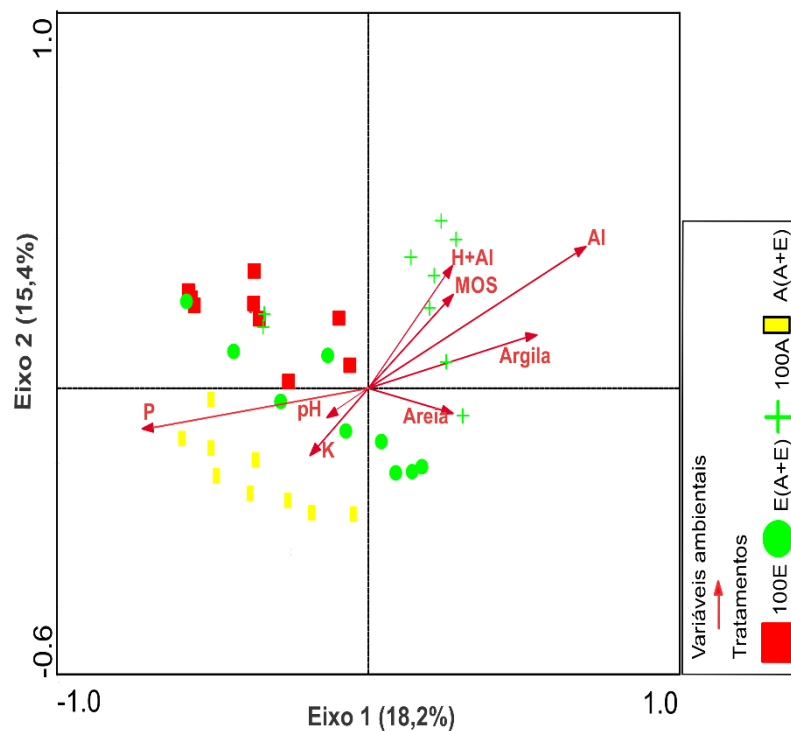


Figura 10 - Análise de redundância (RDA) entre os perfis da comunidade de fungos totais do solo e os atributos físicos e químicos do solo

Tabela 5 - Análise de correlação dos atributos físicos e químicos do solo com os perfis de bandas de fungos totais do solo (18S rRNA). A) perfis da comunidade de cada tratamento individual, incluindo todas as profundidades. B) Perfis da comunidade quando avaliados todos os plantios juntos. Os valores de ($\lambda A\%$) representam o percentual de explicação de cada variável e (p) seu respectivo índice de significância

A)

Manejos	pH		P		K ⁺		Ca ²⁺		Mg ²⁺		Al ³⁺		H+Al		Areia		Silte		Argila		M.O.S		
	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	
100A	4%	0,020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5%	0,022	5%	0,008	-	-	10%	0,002	6%	0,014
100E	2%	0,036	10%	0,002	-	-	-	-	-	-	29%	0,002	-	-	-	-	5%	0,030	-	-	-	-	
A(A+E)	1%	0,062	10%	0,002	-	-	5%	0,004	-	-	37%	0,002	4%	0,054	-	-	-	-	-	-	-	6%	0,010
E(E+A)	4%	0,018	-	-	-	-	3%	0,002	-	-	17%	0,002	9%	0,002	-	-	5%	0,010	-	-	-	5%	0,024
Total*	11%		20%		-		8%		-		83%		18%		5%		10%		10%		17%		

* Soma das percentagens da explicação de cada tratamento avaliado

B)

	pH		P		K		Ca		Mg		Al		H+Al		Areia		Silte		Argila		M.O.S	
	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	P	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p
Total	2%	0,002	17%	0,014	3%	0,040	-	-	-	-	18%	0,034	5%	0,002	-	-	-	-	6%	0,002	2%	0,004

6.2.2.4 Abundância do gene ITS por qPCR

Nas reações de quantificação, o valor médio de eficiência (E) foi de 0,90, ao passo que o valor de regressão logarítmica (R^2) inserido na curva normal foi de 0,92. Nas camadas superficiais do solo (0-20 cm), o tratamento 100E apresentou menor valor de Log_{10} (9,32) em relação aos demais, E(A+E) (10,43), 100A (9,73) e A(A+E) (9,83). Contudo, não foram detectadas diferenças significativas entre os valores (Figura 11). De forma geral, ocorreu uma queda exponencial no número de cópias do gene ITS com o aumento da profundidade, principalmente entre os pontos P2 e P5 (20 cm a 200 cm). A partir dessa camada, os tratamentos 100A e A(A+E) apresentaram menor abundância do gene ITS, quando comparados com os plantios puros e mistos de Eucalipto. De forma similar à quantificação realizada para o gene 16S, o plantio 100E, quando analisado em profundidade, possui maior abundância dos genes 16S e ITS (Figura 11).

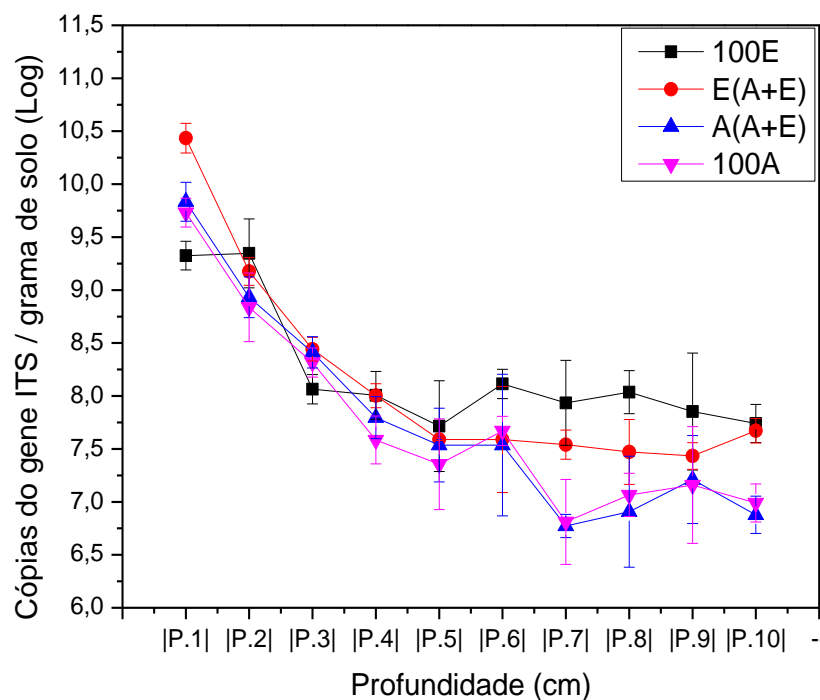


Figura 11 - Número de cópias do gene ITS rRNA por grama de solo nos tratamentos e profundidades amostradas. |P.1| 0-20 cm; |P.2| 20-50 cm; |P.3| 50-100 cm; |P.4| 100-200 cm; |P.5| 200-300 cm; |P.6| 300-400 cm; |P.7| 400-500 cm; |P.8| 500-600 cm; |P.9| 600-700 cm e |P.10| 700-800 cm

6.2.3 A comunidade de fungos formadores de micorrizas arbusculares

6.2.3.1 Influência da profundidade do solo na estrutura da comunidade

No tratamento 100A, os perfis de DGGE da comunidade de FMA presentes nas camadas “a1” e “a2” foram semelhantes na análise de PCoA e similaridade de ANOSIM. Contudo, estes agrupamentos foram totalmente distintos dos perfis formados em profundidade (“a3”). Fato similar foi constatado no tratamento A(A+E) (Figura 12). Os perfis de DGGE de FMA presentes na monocultura do Eucalipto apresentaram caráter disperso, sendo possível diferenciá-los dos demais agrupamentos, com valores significativos, apenas na comunidade presente na camada de 0-20 cm. O tratamento misto, com amostras coletadas na base do Eucalipto, estruturaram mais a comunidade de FMA em profundidade, tendo separação significativa de grupos em todas as camadas (Figura 12; Tabela 6).

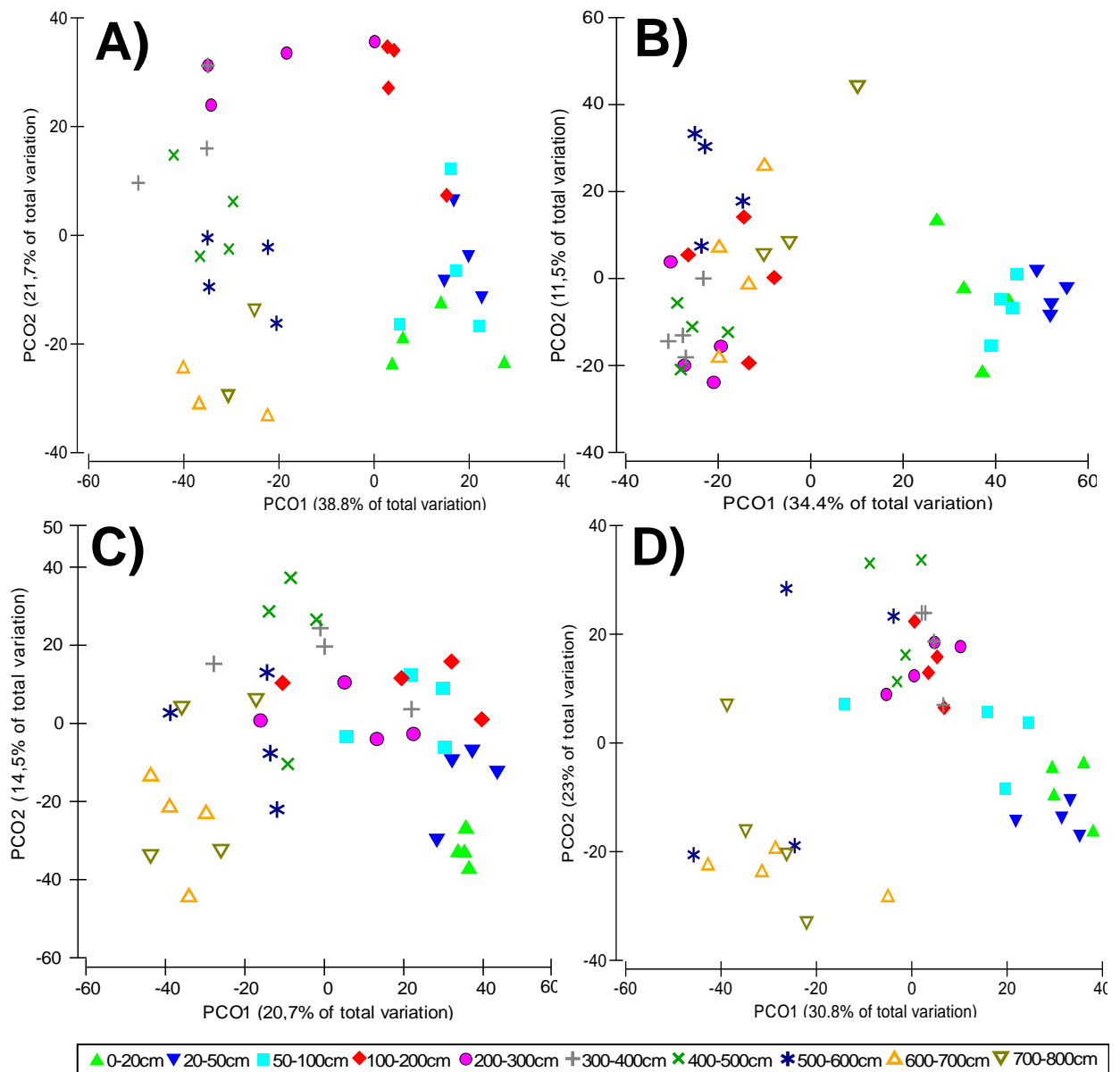


Figura 12 - Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de bandas (18S rRNA) referentes às comunidades de FMA num gradiente de profundidade do solo. A), plantio de *A. mangium* em sistema monoespecífico (100A); B), plantio misto entre *A. mangium* e *E. grandis*, com amostras coletadas na base da Acácia A(A+E); C), plantio de *E. grandis* em sistema monoespecífico (100E) e D), plantio misto entre *A. mangium* e *E. grandis*, com amostras coletadas na base do Eucalipto E(E+A)

Tabela 6 - Análise de similaridade de ANOSIM baseada no algoritmo de *Bray-Curtis*. Agrupamentos da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (18S rRNA) em cada plantio e profundidade estudados

100A	R values	<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	0	0,294*	0,8648*
	<u>a2</u>	-	0	0,7002*
	<u>a3</u>	-	-	0
A (A+E)		<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	0	0,1967*	0,678*
	<u>a2</u>	-	0	0,633*
	<u>a3</u>	-	-	0
100E		<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	0	0,7417*	0,219
	<u>a2</u>	-	0	0,1106
	<u>a3</u>	-	-	0
E (E+A)		<u>a1</u>	<u>a2</u>	<u>a3</u>
	<u>a1</u>	0	0,7013*	0,7654*
	<u>a2</u>	-	0	0,7388*
	<u>a3</u>	-	-	0

*(p) significativo. Valores de R superiores a 0,75 indicam separação entre as amostras, $R > 0,5$ indicam separação com sobreposição e $R < 0,5$, as amostras não apresentam diferenças significativas. "a1", camadas superficiais do solo (0-100 cm); "a2", camadas intermediárias (100-400 cm) e "a3", camadas profundas (400-800 cm)

6.2.3.2 Influência dos sistemas de plantios na estrutura da comunidade

Houve influência do sistema de plantio sobre a estrutura da comunidade de FMA do solo. Os agrupamentos de FMA formados nos plantios E(E+A) e 100A apresentam alta similaridade entre si pela análise de ANOSIM, tendo semelhança, com sobreposição, com amostras do plantio monoespecífico de Eucalipto. Contrariamente, os perfis de DGGE de FMA do solo com plantios mistos e amostras coletadas na base da Acácia, apresentaram separação significativa dos demais plantios, apresentando valores de $R_{\text{Bray-Curtis}}$ superiores a 7, ficando os mesmos coordenados separadamente na PCoA (Figura 13; Tabela 7).

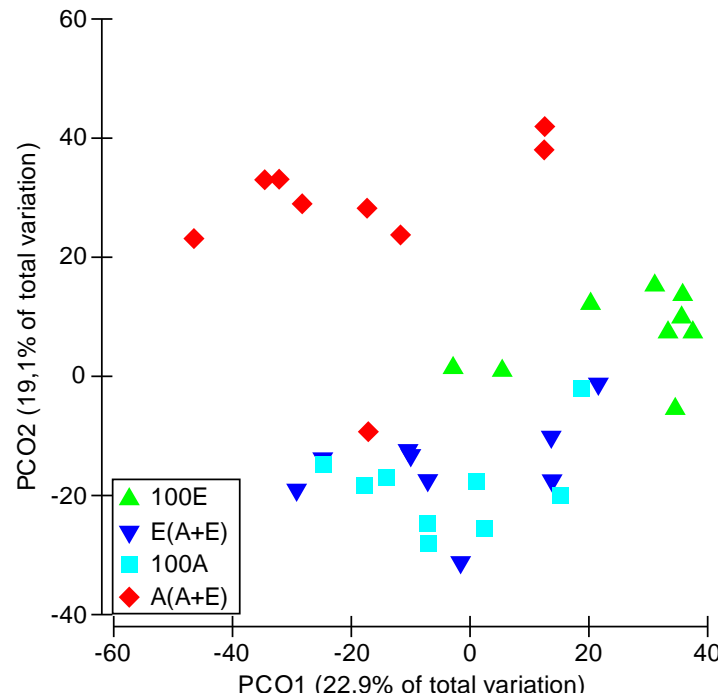


Figura 13 – Análise de coordenadas principais (PCoA) referentes à comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (18S rRNA) em sistemas de plantios monoespecíficos e mistos de *E. grandis* e *A. mangium*

Tabela 7 - Análise de similaridade de ANOSIM (algoritmo de *Bray-Curtis*) para agrupamentos da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (18S rRNA) em cada sistema de plantio

R values	100E	E(E+A)	100A	A(A+E)
100E	0	0,5456*	0,6193*	0,7621*
E(E+A)	-	0	0,2788*	0,7619*
100A	-	-	0	0,7577*
A(A+E)	-	-	-	0

*(p) significativo. Valores de R superiores a 0,75 indicam separação entre as amostras, $R > 0,5$ indica separação com sobreposição e $R < 0,5$ não apresentam diferenças significativas

6.2.3.3 Correlação do perfil da comunidade com dados ambientais

Os atributos que contribuíram para a estruturação da comunidade de FMA em profundidade foi pH, com percentual de explicação equivalente a ($\lambda A\% = 12\%$), Silte e Argila ($\lambda A\% = 5\%$), Areia ($\lambda A\% = 11\%$) e Ca ($\lambda A\% = 9\%$). Os valores de Al^{3+} , P

disponível, H+Al e M.O.S apresentaram maior destaque, com valores de $\lambda A = 66 \%$, 57% , 47% e 17% respectivamente (Tabela 8 A).

Quando comparados os perfis da comunidade de FMA em todos os plantios em um único gel, os valores que mais explicaram a variação nos dados foi pH ($\lambda A\% = 1 \%$), H+Al ($\lambda A\% = 6 \%$), Argila e M.O.S ($\lambda A\% = 7 \%$) e, em maior proporção, os valores de P, que tiveram ($\lambda A\% = 31 \%$) de explicação (Tabela 8B; Figura 14).

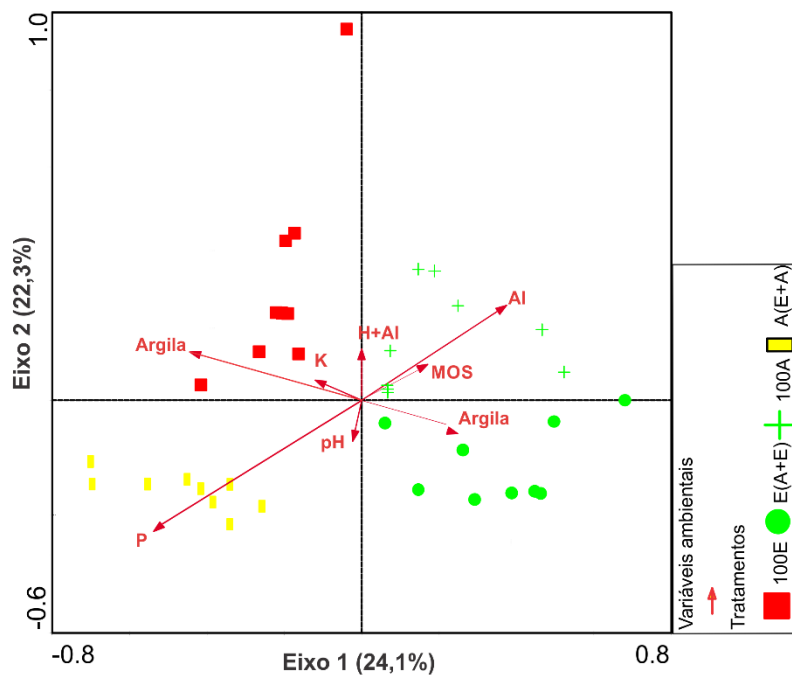


Figura 14 - Análise de redundância (RDA) entre os perfis da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) do solo e os atributos físicos e químicos do solo

Tabela 8 - Análise de correlação dos atributos físicos e químicos do solo com os perfis de bandas de fungos micorrízicos arbusculares (18S rRNA). A) perfis da comunidade de cada tratamento individual, incluindo todas as profundidades. B) Perfis da comunidade quando avaliados todos os plantios juntos. Os valores de ($\lambda A\%$) representam o percentual de explicação de cada variável e (p) seu respectivo índice de significância.

A)

Manejos	pH		P		K ⁺		Ca ²⁺		Mg ²⁺		Al ³⁺		H+Al		Areia		Silte		Argila		M.O.S	
	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p
100A	3%	0,090	11%	0,002	-	-	-	-	-	-	4%	0,034	24%	0,002	11%	0,002	5%	0,012	-	-	5%	0,012
100E	-	-	-	0,001	-	-	-	-	-	-	15%	0,002	-	-	-	-	-	-	5%	0,002	3%	0,044
A(A+E)	-	-	13%	0,040	-	-	3%	0,072	-	-	27%	0,002	19%	0,002	-	-	-	-	-	-	5%	0,002
E(E+A)	-	-	33%	0,034	-	-	6%	0,004	-	-	20%	0,002	4%	0,010	-	-	-	-	-	-	4%	0,010
Total*	3%		57%		-		9%		-		66%		47%		11%		5%		5%		17%	

* Soma das percentagens da explicação de cada tratamento avaliado

B)

	pH		P		K ⁺		Ca ²⁺		Mg ²⁺		Al ³⁺		H+Al		Areia		Silte		Argila		M.O.S	
	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p	λA	p
Total	1%	0,003	31%	0,010	-	-	-	-	1%	0,002	-	-	6%	0,004	-	-	-	-	7%	0,004	7%	0,002

6.2.3.4 Percentual de colonização radicular por FMA e ECM

Os percentuais de colonização radicular por FMA foram baixos em todos os tratamentos estudados, até mesmo quando foram avaliadas raízes coletadas nas camadas superficiais de solo (0-100 cm) (Tabela 9). Houve forte redução da colonização radicular com o aumento da profundidade do solo, sendo esta mais pronunciada nos plantios mistos. Dentre os tratamentos avaliados, a monocultura do Eucalipto (100E) apresentou maior colonização, tanto em superfície, quanto em subsuperfície, com exceção da camada 400-800 cm, a qual não diferiu significativamente da 100A (Tabela 9).

Tabela 9 – Percentual de colonização radicular por FMA em plantios puros (100A e 100E) e mistos (A(A+E) e E(E+A)) de *E. grandis* e *A. mangium*. Letras minúsculas diferenciam os tratamentos (linhas) e maiúsculas as profundidades do solo (colunas) pelo teste de Tukey $p > 0,05$

	0-100 cm	100-400 cm	400-800 cm
	(%) de colonização FMA		
100 ^a	7,1 aA	0,4 aB	0,4 aB
A(A+E)	2,0 bA	0,3 aB	0,0 bC
100E	9,3 cA	1,3 bB	0,4 aC
E(E+A)	0,7 dA	0,1 cB	0,0 bC

*0-100 cm = $\sum \bar{x}$ (P1+P2+P3); 100-400 cm = $\sum \bar{x}$ (P4+P5+P6) e 400-800 cm = $\sum \bar{x}$ (P7+P8+P9+P10)

O tratamento 100E apresentou, quando comparado aos demais, maiores valores de colonização radicular por ECM em todas as camadas de solo avaliadas (Tabela 10). A monocultura da Acácia teve percentual de colonização semelhante com os plantios mistos A(A+E) e E(E+A) e estes, não diferiram significativamente entre si (Tabela 10).

Tabela 10 – Percentual de colonização radicular por ECM em plantios puros (100A e 100E) e mistos (A(A+E) e E(E+A)) de *E. grandis* e *A. mangium*. Letras minúsculas diferenciam os tratamentos (linhas) e maiúsculas as profundidades do solo (colunas) pelo teste de Tukey $p > 0,05$

	0-100 cm	100-400 cm	400-800 cm
	(%) de colonização ECM		
100A	33,3 aA	17,0 aB	12,0 aC
A(A+E)	34,6 aA	16,6 aB	10,6 bC
100E	52,3 bA	25,6 bB	18,3 cC
E(E+A)	33,0 aA	16,0 aB	9,0 dC

*0-100 cm = $\sum \bar{x}$ (P1+P2+P3); 100-400 cm = $\sum \bar{x}$ (P4+P5+P6) e 400-800 cm = $\sum \bar{x}$ (P7+P8+P9+P10)

6.2.3.6 Abundância de esporos e identificação morfológica de FMA

De modo geral, houve baixa abundância de esporos de FMA em todos os plantios e camadas do solo avaliados. Na camada superficial (0-100 cm), o tratamento 100E apresentou menor abundância de esporos (28 esporos), ao passo que os demais apresentaram de 62 A(A+E); 71 (100A) a 74 E(E+A) esporos (Tabela 11). Na camada 100-400 cm, o tratamento 100A apresentou, em relação aos demais tratamentos, maior abundância de esporos (29 esporos). Nas camadas abaixo de 400 cm, o número de esporos não foi maior que 7 em nenhum dos tratamentos (Tabela 11).

Tabela 11 – Abundância e diversidade de esporos viáveis de FMA (50 g solo⁻¹) em plantios puros e mistos de *E. grandis* e *A. mangium*. Em 100A, monocultura da *A. mangium*; A(A+E) *A. mangium* presente no plantio misto; 100E, monocultura do *E. grandis* e E(E+A), *E. grandis* presente no plantio misto

	100A*			A(A+E)			100E			E(E+A)		
	0-100 cm	100-400 cm	400-800 cm	0-100 cm	100-400 cm	400-800 cm	0-100 cm	100-400 cm	400-800 cm	0-100 cm	100-400 cm	400-800 cm
<i>Acaulospora delicata</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	-	7	-	-
<i>Acaulospora foveata</i> (Trappe; Janos)	7	-	-	-	-	-	2	-	-	7	-	-
<i>Acaulospora lacunosa</i> (Morton)	14	1	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-
<i>Acaulospora leavis</i>	-	-	-	21	-	-	-	-	-	2	1	2
<i>Acaulospora mellea</i> (Spain, Schenck)	13	18	2	9	1	1	3	1	-	9	2	1
<i>Acaulospora tuberculata</i>	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
<i>Gigaspora margarita</i>	3	-	-	-	-	-	2	-	-	4	-	-
<i>Gigaspora rosea</i> (Nicolson & Schenck)	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gigaspora</i> sp. 1	-	-	-	-	-	-	7	1	-	1	-	-
<i>Glomus macrocarpum</i>	2	3	-	-	2	-	-	-	-	4	-	-
<i>Glomus</i> sp. 1	17	6	-	-	-	-	4	-	1	16	-	1
<i>Intraornatospora intraornata</i>	1	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-
<i>Intraornatospora</i> sp. 1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Racocetra beninenses</i>	-	-	-	28	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Scutellospora callospora</i>	5	-	-	-	-	-	1	-	-	7	-	-
<i>Scutellospora</i> sp. 1	-	1	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-
Não identificado	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Abundância	71	29	2	62	3	1	28	4	1	74	3	7
Riqueza (R)	12	5	1	3	1	0	6	3	1	10	2	3
Índice de Shannon	0,5	0,25	0,1	0,2	0,1	0,03	0,4	0,25	0,03	0,39	0,21	0,09

*0-100 cm = $\sum (P1+P2+P3)$; 100-400 cm = $\sum (P4+P5+P6)$ e 400-800 cm = $\sum (P7+P8+P9+P10)$

Foram encontradas dezesseis espécies de FMA em todos os tratamentos (Tabela 10). Os gêneros mais abundantes de FMA foram *Acaulospora* (R= 6), *Gigaspora* (R= 3), *Glomus* (R= 2), *Intraornatospora* (R= 2), *Racocetra* (R= 1), *Scutellospora* (R= 2) e 9 esporos não identificados devido a limitações de qualidade da parede externa. O gênero *Acaulospora*, além de apresentar a maior riqueza de espécies, também apresentou maior abundância relativa em todos os tratamentos e camadas de solos analisados. Dentre as espécies, *Acaulospora mellea*, esteve presente na maioria dos plantios e apresentou, quando comparada com as demais, maior abundância de esporos. Esta mesma espécie, *Acaulospora mellea*, apesar da baixa abundância de esporos, esteve, na maioria das vezes, presente nas camadas do solo abaixo de 100 cm (Tabela 10).

A maior riqueza de espécies foi encontrada nas camadas 0-100 e 100-400 cm dos tratamentos 100A e no plantio misto com amostras coletadas na base do Eucalipto E(E+A). No tratamento A(A+E), apesar de apresentar 62 esporos viáveis na camada 0-100 cm, foram constatados os menores índices de diversidade e baixa riqueza de espécies, com apenas três espécies identificadas.

7 DISCUSSÃO

7.1 Atributos físicos e químicos do solo

Foram encontrados valores de pH baixos nas camadas superficiais dos solos de todos os tratamentos, principalmente onde plantas de Acácia estavam presentes. Essa situação, típica de solos florestais, ocorre, possivelmente, devido à maior liberação de ácidos orgânicos pelas raízes das plantas e por parte dos micro-organismos durante a decomposição da M.O.S (YAMASHITA et al., 2008). Mesmo nas camadas superficiais (0-20 cm), o solo de todos os tratamentos apresentava valores de V % menores que 50 %, com baixa SB e CTC, sendo enquadrado como solo distrófico, característica típica de Latossolos (EMBRAPA, 1999). Os valores de matéria orgânica se reduziram drasticamente com o aumento da profundidade do solo. A alocação de M.O.S foi semelhante em ambas as monoculturas e apresentou leve redução nos plantios consorciados (Anexo B), conforme foi constatado por Forrester et al. (2005). Não foram encontradas diferenciações marcantes nos valores de P disponível no solo dos diferentes tratamentos, com exceção do tratamento A(A+E), que apresentou o menor valor. Todavia, em outro trabalho, com plantios mistos de *E. globulus* e *A. mearnsii* foi constatado maior incremento de P no solo devido à quantidade de serapilheira depositada na superfície do solo (FORRESTER et al., 2005). Os tratamentos 100A, A(A+E) e E(E+A) apresentaram menores valores de Al^{3+} e Ca^{2+} quando comparados com Eucalipto puro (Anexo B). Salvo essas exceções, outros atributos como SB, CTC, V%, Mg^{2+} , K^+ , H+Al, não foram afetados pelo sistema de plantio adotado.

7.2 Influência da profundidade do solo na estrutura das comunidades microbianas

Os perfis das comunidades microbianas se agruparam fortemente nas camadas de 0-100 cm na maioria de todos os tratamentos. Isso pode ter ocorrido devido ao fornecimento constante de C e outras fontes de nutrientes oriundos da exsudação radicular, além da deposição e decomposição de serapilheira na camada superficial do solo. Esses resultados, aliados às interações e variações mais amplas (diárias e sazonais) das variáveis citadas, podem ter modulado de forma intensa o perfil desses grupos, tornando-os mais semelhantes.

Contudo, nas camadas do solo entre 100-400 cm, a maioria dos perfis microbianos se mostrou bastante distinta dos que foram formados em superfície. Pesquisas recentes mostraram que, em camadas abaixo de 100 cm, podem prevalecer micro-organismos que desempenham funções totalmente diferentes das desempenhadas em camadas superficiais do solo (HUANG et al., 2014). Além do mais, camadas do solo abaixo de 100 cm pode abrigar parte considerável dos micro-organismos, ao quais podem ter importante participação nos ciclos biogeoquímicos dos ecossistemas (FRITZE et al., 2000; BLUME et al., 2002).

Nas camadas do solo abaixo de 400 cm de profundidade, os perfis das comunidades microbianas exibiram agrupamentos com estruturação pouco definida. Nestas camadas, algumas condições se tornam limitantes para o crescimento microbiano, como a menor alocação de matéria orgânica, diferenciação na quantidade e qualidade de exsudatos, assim como pouca difusão de oxigênio (SCHENCK, 2005). Contrariamente, as variáveis atuantes na superfície do solo, como concentração de nutrientes, umidade, temperatura, sofrem variações mais bruscas do que em profundidades maiores. A menor variação desses atributos sugere que provavelmente ocorra pouca variabilidade genética nos horizontes profundos (BRADY; WEIL, 2002). Tais condições, agindo conjuntamente, podem fazer com que os processos genéticos e metabólicos nas camadas mais profundas ocorram de forma mais aleatória, levando à formação de agrupamentos dispersos e, conseqüentemente, pouco similares entre si.

Além do mais, a análise de similaridade de ANOSIM mostrou que alguns agrupamentos microbianos formados em camadas superficiais possuem forte semelhança com outros que ocupam nichos em profundidade abaixo de 400 cm. Talvez, parte da comunidade microbiana que habita camadas mais profundas seja formada por uma diluição das comunidades microbianas de superfície (EILERS et al. 2012).

7.3 Influência dos sistemas de plantios (*E. grandis* x *A. mangium*) na estrutura das comunidades microbianas do solo

Alguns estudos têm mostrado mudanças nos perfis da comunidade microbiana do solo em resposta a diferentes sistemas de manejo (PEIXOTO et al.,

2010; RACHID et al., 2012, 2013), assim como mudanças impostas pelas espécies vegetais nessas comunidades (LIU et al., 2010).

Neste trabalho, a comunidade bacteriana respondeu aos tratamentos. Grupos bacterianos presentes nos tratamentos mistos A(A+E) e E(E+A) se integraram com os de monocultura da *A. mangium*. Nos plantios mistos, a *A. mangium* talvez seja a espécie que mais influencie a estruturação das comunidades bacterianas do solo, o que sugere que plantas de *E. grandis*, quando plantadas na ausência de plantas de Acácia, selecionem grupos distintos de bactérias no solo. Em plantios mistos de *E. urograndis* e *A. mangium*, com desenho experimental semelhante ao aqui descrito, a comunidade bacteriana superficial (0-15 cm) no plantio misto apresentou posição intermediária entre as comunidades presentes nas monoculturas avaliadas, expressando características de ambos plantios puros (RACHID et al. 2013). Contudo, nesse último estudo, não foram coletadas amostras na base de cada espécie vegetal dentro do plantio misto. Os autores detectaram que os conteúdos de nitrogênio no solo, tanto nítrico quanto amoniacal, oriundos da inserção de árvores leguminosas no plantio, pode ter sido o fator preponderante nas alterações das comunidades de bactérias nos plantios mistos de *E. urograndis* e *A. mangium* (RACHID et al., 2013), fato esse também reportado por outros autores em solos florestais (HUANG et al., 2014).

De acordo com os perfis de DGGE, o grupo de fungos sofreu mais influência de plantas de *Acacia mangium* quando estas estavam presentes em sistema de consórcio, principalmente os FMA. Na análise de correlação por RDA, a estrutura da comunidade de FMA do tratamento A(A+E) teve correlação significativa com os valores de fósforo no solo, sendo este o plantio que apresentou os menores valores de P disponível. Isto sugere que a redução dos valores de P no solo se correlaciona diretamente com a comunidade de fungos, em especial os FMA presentes nos plantios mistos, fazendo com que a *A. mangium*, mesmo quando presente em sistema de consórcio, selecione uma comunidade de FMA específica no solo.

Segundo Wakelin et al. (2008), mudanças na estrutura das comunidades microbianas ocorrem, principalmente, por influência de práticas agrícolas adotadas e por intermédio da vegetação dominante na área. As espécies de plantas presentes na área podem influenciar as comunidades (GRAYSTON et al., 2001; KOURTEV et al., 2002, GARBEVA et al., 2006) por diversos fatores, como a liberação de compostos de C via sistema radicular (BERTHRONG et al., 2009), profundidade de

enraizamento (GREGORY, 2006), deposição de serapilheira, compostos alelopáticos (KASEL et al., 2008; LORENZO et al., 2010) e até mesmo efeitos sobre o pH do solo, umidade e níveis de nutrientes (LYNCH; WHIPPS 1990, WARDLE, 1992). A implantação de monoculturas (culturas anuais e florestas, por exemplo), podem causar alterações nas comunidades microbianas presentes no solo e, conseqüentemente, nos papéis ecológicos que os micro-organismos desempenham (LUMINI et al., 2010; BISSETT et al., 2011).

7.4 Correlação dos atributos físicos e químicos do solo com os perfis das comunidades microbianas do solo

Sabe-se que, à medida que aumenta a profundidade do solo, é normal que ocorra redução nos níveis de M.O.S e nos macro e micro nutrientes, fato que pode ter reflexo direto nas comunidades microbianas nesses ambientes (MENDES, 2009). Foram encontradas poucas informações na literatura sobre os fatores que determinam a estrutura da comunidade em profundidade. Contudo, existe uma série de fatores que pode determinar a estrutura da comunidade microbiana em solos de florestas, tais como a quantidade e qualidade da serapilheira, exsudatos radiculares, matéria orgânica, atributos químicos e físicos do solo e outros (HAMMAN et al., 2007). Segundo Huang et al. (2014), a inserção de árvores leguminosas podem contribuir, nas mudanças da estrutura da comunidade em plantios mistos com *A. mangium*, devido à maior inserção de nitrogênio no solo. Outros estudos também demonstram que a comunidade microbiana não apenas responde a práticas agrícolas, mas também aos atributos físicos e químicos do solo (XUE et al., 2010).

A elevação dos valores de NO_3 e NH_4^+ por meio da inserção de *A. mangium* pode ser, possivelmente, um importante fator na estruturação das comunidades microbianas no solo (RACHID et al., 2013; HUANG et al., 2014). Segundo Huang et al. (2014), a maior homogeneização da comunidade bacteriana em plantios mistos com Acácias pode ocorrer devido à predominância de grupos de bactérias que se adaptam melhor às condições menos variáveis de certos nutrientes, como o N, por exemplo. A estrutura e composição da comunidade microbiana no solo é controlada por interações complexas entre as plantas (BUTLER et al., 2004), principalmente pela alocação de C pela planta, qualidade e atividade dos exsudatos na rizosfera e deposição de serapilheira rica em nutrientes (MYERS et al., 2001; LECKIE, 2005).

Portanto, outros fatores, não mencionados e explorados nesse trabalho, podem estar contribuindo nas alterações da comunidade microbiana e diferenciação dos grupos que foram apresentados, como os valores de umidade do solo, temperatura, densidade, micronutrientes e outros.

Sendo assim e considerando a natureza dinâmica dos micro-organismos, não é possível ter-se certeza que apenas os fatores avaliados são os responsáveis por tal estruturação e, por isso, sugerimos que “a disponibilidade de recursos no solo” (independentemente de quais sejam) é o fator genérico mais provável que esteja relacionado com as alterações na estrutura e composição das comunidades microbianas nos horizontes profundos do solo.

7.5 Análise de PCR em tempo real (qPCR)

Não ocorreram diferenças significativas no número de cópias do gene 16S e ITS em camadas de 0-20 cm nos tratamentos puros e mistos aqui relatados. Rachid et al. (2013) também não detectaram diferenças na abundância de cópias do gene 16S e *nifH* em sistema de consórcio semelhante, nessa profundidade, corroborando os resultados deste trabalho. Porém, no trabalho de Rachid (2013), a abundância de cópias do gene ITS sofreu influência dos tratamentos avaliados, diferentemente dos valores encontrados na presente pesquisa, na qual não foram detectadas diferenças significativas na quantidade do gene ITS nas camadas superficiais do solo de todos os tratamentos.

Na maioria das vezes, foi possível visualizar uma redução na abundância de cópias dos genes 16S e ITS com o aumento da profundidade do solo (Figura 7). Trabalhos envolvendo a quantificação desses genes (16S e ITS) em camadas profundas do solo são escassos na literatura, principalmente nesses sistemas de plantios. Contudo, apesar da diminuição exponencial e da carência de estudos da biomassa microbiana com o aumento da profundidade, alguns autores relatam que ainda assim ocorre a presença de células microbianas metabolicamente ativas nessas camadas (BLUME et al., 2002; FIERER et al., 2003; BUSS et al., 2005).

A monocultura do Eucalipto apresentou maior número de cópias dos genes 16S e ITS (g de solo⁻¹) nas camadas profundas (abaixo de 400 cm), chegando em 10% (16S) e 41,81% (ITS) a mais do que nos outros tratamentos. A monocultura do Eucalipto apresenta, quando comparada aos demais tratamentos, maior biomassa

de raízes em profundidade (dados não apresentados). Neste plantio, talvez ocorra um maior efeito rizosférico nas camadas profundas, sendo este, possivelmente, o principal fator que determine o maior número de cópias nessas camadas em relação aos demais plantios.

7.6 Colonização radicular por FMA, ECM e abundância de esporos de FMA

Foram encontrados baixos valores de colonização por FMA no presente trabalho. Porém, altas taxas de colonização por FMA foram encontradas nessa mesma área e nos mesmos sistemas de plantios puros e mistos de *E. grandis* e *A. mangium* (BINI, 2013). Contudo, naquele trabalho, foram avaliadas raízes na camada de 15 cm de profundidade do solo e o plantio estava nos estágios iniciais de desenvolvimento (entre 2 e 20 meses). Em Eucalipto, vários pesquisadores constataram uma maior dependência e um maior investimento por parte da planta em estabelecer simbiose com FMA nos primeiros estágios de desenvolvimento, sendo estes reduzidos em plantios mais maduros (ZANGARO et al., 2003, 2007). Em plantios com maior tempo de implementação é comum haver predominância de colonização das raízes por ECM. Contudo, é válido ressaltar que não apenas a idade da planta pode interferir na colonização radicular, mas diversos fatores edafoclimáticos podem estar envolvidos, como os valores de pH do solo, nutrientes minerais e outros (CARDOSO et al., 2010). Embora tenham ocorrido valores baixos de colonização, a monocultura do Eucalipto apresentou a maior taxa colonização por FMA em relação aos demais plantios, ao contrário dos resultados encontrados por Bini (2013), que encontrou maiores índices de colonização por FMA nas plantas de *A. mangium*, em plantios com até 20 meses.

Os baixos valores de colonização por FMA encontrados podem estar relacionados a diversos fatores, entre eles a baixa quantidade de propágulos com potencial de iniciar a colonização micorrízica, sendo este fator mais agravante nas camadas abaixo de 100 cm de profundidade; a quantidade de raízes finas, visto que os FMA são biotróficos obrigatórios e necessitam dessas estruturas para dar início à simbiose, fornecer fontes carbonadas, e outros (CARDOSO, 2003; BONFIM, 2011). Resultados semelhantes a este, nos quais os percentuais de colonização por FMA reduziram com o aumento da profundidade do solo, também foram encontrados em outros sistemas, de acordo com Oehl et al. (2005), em áreas de pastagem, milho e

vinhedo, com Jakobsen e Nielsen (1983), em plantios de ervilhas e trigo e com Bonfim (2011) em plantas da Mata Atlântica no estado de São Paulo.

Além destes fatores, a forma de coleta, na qual foram amostradas raízes na base de cada planta, pode ter influenciado na colonização por FMA. Bonfim (2011), em florestas de Mata Atlântica no estado de São Paulo, percebeu um aumento surpreendente nos valores de colonização radicular quando deixou de realizar coletadas na base da planta e passou a realizá-las a um metro de distância do tronco das árvores.

De forma contrária aos FMA, os valores de colonização por ECM foram bem mais elevados. A monocultura do Eucalipto se destacou, apresentando, quando comparado aos demais plantios, maiores índices de colonização por ECM. Há relatos na literatura que plantas de *E. grandis*, com o avançar do plantio, elevam seu grau de associação com fungos ectomicorrízicos e, conseqüentemente, os valores de colonização por FMA são gradativamente reduzidos (SANTOS et al., 2001).

Em sistemas de plantios semelhantes (2-3 anos de idade), utilizando pirosequenciamento, pesquisadores encontraram no solo (0-10 cm) pouquíssimas sequências (~0,1 %) de fungos pertencentes ao filo Glomeromycota. Entretanto, alta diversidade de gêneros pertencentes aos filios Basidiomycota e Ascomycota foi reportada (RACHID, 2013). Dentre os gêneros mais abundantes, destacaram-se o *Pisolithus* e *Scleroderma*, dois gêneros de fungos que são potencialmente formadores de ectomicorrizas, tanto em plantas de Eucalipto, quanto de Acácia (DIAGNE et al., 2013; DUCOUSSO et al., 2012).

No presente trabalho foi feito um levantamento de esporos de FMA até a profundidade de 8 metros. Como esperado, as camadas superficiais do solo (0-100 cm), continham maior abundância de esporos. Este mesmo comportamento já foi relatado em outros sistemas (BELLGARD, 1993; OEHL et al., 2005; LOVERA; CUENCA, 2007). Em relação aos outros plantios, o tratamento 100E apresentou menor abundância de esporos, embora tenha apresentado maior colonização por FMA. Isto poderia justificar a menor abundância de esporos de FMA nesses plantios, sugerindo que um número maior de esporos germinou e conseguiu colonizar as raízes de eucalipto.

O plantio misto, com amostras coletadas na base da Acácia A(A+E), apresentou 62 esporos na camada 0-100 cm. Porém, apesar da quantidade de esporos, a riqueza de espécies nesse tratamento foi muito baixa, sendo encontradas

apenas as espécies *Acaulospora leavis*, *Acaulospora mellea* e *Racocetra beninenses*. Além disso, a maior quantidade de espécies encontradas foi pertencente ao gênero *Acaulospora*. Esse fato pode ter ocorrido devido a adaptação do gênero aos baixos valores de pH (pH 4 a 6), visto que já foi reportada maior frequência desse gênero de FMA em solos com essas condições (LAMBALIS; CARDOSO, 1988).

8 CONCLUSÃO

- Foram encontradas comunidades bacterianas e fúngicas ao longo de todo o comprimento das raízes de Eucalipto e Acácia, pelo menos até 8 m de profundidade, o que confirma nossa hipótese de trabalho.
- Foi detectada a presença de esporos de FMA, de DNA originário de FMA e de estruturas de ectomicorrizas até a mesma profundidade.
- O número e a diversidade de fungos foi geralmente maior nas camadas mais superficiais do solo, embora com variações de um plantio para outro.
- Foram encontradas mudanças significativas nas estruturas das comunidades microbianas. Tais mudanças foram acentuadas tanto em profundidade, quanto entre os tratamentos estudados.
- Plantios puros de Eucalipto selecionaram grupos específicos de bactérias no solo e se diferenciaram dos outros três sistemas.
- *A. mangium*, mesmo estando presente no sistema de consórcio, tenderam a selecionar grupos de FMA distintos dos demais sistemas estudados.
- Nas camadas superficiais do solo não foram detectadas diferenças na abundância dos genes 16S e ITS. Porém, houve forte redução desses valores com o aumento da profundidade do solo.
- Foram encontrados baixos valores de colonização radicular por FMA, assim como baixa abundância de esporos. Contrariamente, os valores de colonização por ECM foram bem mais elevados.

Avaliações ecológicas das comunidades microbianas nos horizontes profundos de solos são pouco conhecidas. Não apenas os micro-organismos superficiais, mas também aqueles que ocupam habitats profundos podem ter significativa importância no sequestro de carbono no solo, nos ciclos biogeoquímicos e na formação de novas camadas do solo. Até onde nos foi possível verificar, esta é a primeira vez que se faz um estudo sistemático sobre as comunidades microbianas em profundidade de até 8 m no solo, avaliando-se florestas jovens (4 anos) plantadas em sistema de monocultura e em consórcio entre *E. grandis* e *A. mangium*. Nossos resultados revelam a importância de incluir as principais camadas de um perfil de solos nas análises, especialmente quando se estudam árvores com

sistema radicular profundo. Desta forma, é possível observar a ecologia das comunidades de uma forma mais holística nos solos. Sugerimos que abordagens de sequenciamento e identificação desses grupos microbianos devam ser aplicadas em trabalhos futuros, os quais serão de grande importância para o entendimento das possíveis funções que são desempenhadas nos habitats aqui estudados.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; DOWD, S.; SUN, Y.; ALLEN, V. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford v. 40, p. 2762–2770, 2008.
- ALVARES, L.E. Aplicação da RT-PCR nos estudos de expressão gênica. In: REGINATO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: EMBRAPA, 2001. p. 135-150.
- ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 201 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-28112007-101523/>>. Acesso em: 30 jun. 2014.
- _____. **Estrutura e função do microbioma de solos brasileiros**. 2014. 193 p. Tese (Livre Docência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/livredocencia/11/tde-02092014-095652/>>. Acesso em: 07 out. 2014.
- ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. **Journal of Computer Science & Systems Biology**, Los Angeles, v. 2, p. 69-92, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FLORESTAS PLANTADAS. **Yearbook statistical ABRAF 2013**: base year 2012. Disponível em: <www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/3910>. Acesso em: 24 set. 2014.
- BALDRIAN, P.; VORISKOVA, J.; DOBIASOVA, P.; MERHAUTOVA, V.; LISA, L.; VALASKOVA, V. Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 338, p. 1–15, 2011.
- BALDRIAN, P.; KOLAŘÍK, M.; ŠTURSOVÁ, M.; KOPECKÝ, J.; VALÁŠKOVÁ, V.; VÉTROVSKÝ, T.; ŽIFČÁKOVÁ, L.; ŠNAJDR, J.; RÍDL, J.; VLČEK, C.; VOŘÍŠKOVÁ, J. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. **ISME Journal**, New York, v. 6, p. 248-258, 2012.
- BANDOU, E.; LEBAILLY, F.; MULLER, F.; DULORMNE, M.; TORIBIO, A.; CHABROL, J.; COURTECUISSÉ, R.; PLENCHETTE, C.; PRIN, Y.; DUPONNOIS, R.; THIAO, M.; SYLLA, S.; DREYFUS, B.; BÂ, A.M. The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt stress in seagrass (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. **Mycorrhiza**, New York, v. 16, p. 559-565, 2006.
- BARRIOS, E. Soil biota, ecosystem services and land productivity. **Ecological Economics**, New Hampshire, v. 64, p. 269–285, 2007.

- BAUHUS, J.; KHANNA, P.K.; MENDEN, N. Aboveground and belowground interactions in mixed plantations of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Canadian Journal Forestry Research**, Montreal, v. 30, p. 1886-1894, 2000.
- BEDINI, S.E.; PELLEGRINO, L.; AVIO, PELLEGRINI, S.; BAZZOFFI, P.; ARGESE, E.; GIOVANNETTI, M. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*, **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 1491–1496, 2009.
- BELLEGARD, S.E. The topsoil as the major store of propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in southeast Australian sandstone soils. **Mycorrhiza**. New York, v. 3, p. 19–24, 1993.
- BELLIS, T.; KERNAGHAN, G.; WIDDEN, P. Plant community influences on soil microfungal assemblages in boreal mixed-wood forests. **Mycologia**, New York, v. 99, p. 356-367, 2007.
- BERTHRONG, S.T.; JOBBAGY, E.G.; JACKSON, R.B. A global meta-analysis of soil exchangeable cations, ph, carbon, and nitrogen with afforestation. **Ecological Applications**, Washington, v. 19, p. 2228–2241, 2009.
- BINI, D. **Atributos microbianos e químicos do solo e da serapilheira em plantios puros e mistos de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium***. 2013. 105 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-02042013-112456/>>. Acesso em: 30 jun. 2014.
- BINI, D.; FIGUEIREDO, A.F.; SILVA, M.C.P.; VASCONCELLOS, R.L.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Microbial biomass and activity in litter during the initial development of pure and mixed plantations of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 76-85, 2013a.
- BINI, D.; SANTOS, C.A.; BOUILLET, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; CARDOSO, E.J.B.N. *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in monoculture and intercropped plantations: Evolution of soil and litter microbial and chemical attributes during early stages of plant development. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 57-66, 2013b.
- BINKLEY, D. Twenty years of stand development in pure and mixed stands of *Eucalyptus saligna* and nitrogen-fixing *Facaltaria moluccana*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 182, p. 93-102, 2003.
- BINKLEY, D.; GARDINA, C.; BASHKIN, M.A. Soil phosphorus pools and supply under the influence of *Eucalyptus saligna* and nitrogen-fixing *Albizia falcataria*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 128, p. 241-247, 2000.

BISSETT, A.; RICHARDSON, A.E.; BAKER, G.; THRALL, P.H. Long-term land use effects on soil microbial community structure and function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 51, p. 66–78, 2011.

BLUME, E.; BISCHOFF, M.; REICHERT, J.; MOORMAN, T.; KONOPKA, A.; TURCO, R. Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 592, p. 1–11, 2002.

BONFANTE, P.; GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature Communications**, London, v. 1, p. 48. 2010.

BONFIM, J.A. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas restauradas de Mata Atlântica, São Paulo, Brasil**. 2011. 92 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-29062011-085842/>>. Acesso em: 16 nov. 2014.

BONFIM, J.A.; VASCONCELLOS, R.L.F.; STÜRMER, S.L.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian Atlantic forest: a gradient of environmental restoration. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 71, p. 7-14, 2013.

BOROWICZ, V.A. Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations? **Ecology**, London, v. 82, p. 3057–3068, 2001.

BOUILLET, J.P.; LACLAU, J.P.; GONÇALVES, J.L.M.; MOREIRA, M.Z.; TRIVELIN, P.; JOURDAN, C.; GALIANA, A. Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil. 2. Nitrogen accumulation in the stands and N₂ biological fixation. **Forest Ecology & Management**, Amsterdam, v. 255, p. 3918-393, 2008.

BRADY, N.; WEIL, R. **The nature and properties of soils**. 13th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002. 960 p.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 147-154, 2001.

BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 374 p.

BRUNDRETT, M.C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 320, p. 37–77, 2009.

BUSS, H.L.; BRUNS, M.A.; SCHULTZ, M.J.; MOORE, J.; MATHUR, C.F.; BRANTLEY, S.L. The coupling of biological iron cycling and mineral weathering during saprolite formation. **Geobiology**, Luquillo Mountains, v. 3, p. 247-260, 2005.

BUSTIN, S.A. **Real time PCR**: encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics. 2005. Disponível em: <<http://pages.123-reg.co.uk/stephenabustin-1222168/sitebuilderfiles/qPCR.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2014.

BUTLER, J.L.; BOTTOMLEY, P.J.; GRIFFITH, S.M.; MYROLD, D.D. Distribution and turnover of recently fixed photosynthate in ryegrass rhizospheres. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 371–382, 2004.

CAMPOS, D.T.D.S.; SILVA, M.D.C.S.D.; LUZ, J.M.R.D.; TELESFORA, R.J.; KASUYA, M.C.M. Colonização micorrízica em plantios de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, p. 965-974, 2011.

CARAVACA, F.; BAREA, J.M.; FIGUEROA, D.; ROLDAN, A. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for reforestation with *Olea europaea* subsp. *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 20, p. 107–118, 2002.

CARDOSO, E.J.B.N.; CARDOSO, I.M.; NOGUEIRA, M.A.; MALUCHE BARETTA, C. R.D.; DE PAULA, A.M. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In. SIQUEIRA, J.O.; DE SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. v. 1, p. 153-215.

CARDOSO, I.M.; BODDINGTON, C.; JANSSEN, B.H.; OENEMA, O.; KUYPER, T.W. Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. **Agroforestry Systems**, Missouri, v. 58, p. 33-43, 2003.

CAREY, E.V.; MARILYN J.M.; RAGAN, M. CALLAWAY. Mycorrhizae transfer carbon from a native grass to an invasive weed: evidence from stable isotopes and physiology. **Plant Ecology**, Perth, v. 172, p. 133-141, 2004.

CUENCA, G.; LOVERA, M. Seasonal variation and distribution at different soil depths of arbuscular mycorrhizal fungi spores in a tropical sclerophyllous shrubland. **Botany**, Ottawa, v. 88, p. 54-64, 2010.

DAVIS, K.E.R.; JOSEPH, S.J.; JANSSEN, P.H. Effects of growth medium, inoculum size and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 71, p. 826-834, 2005.

de BELLIS, T.; KERNAGHAN, G.; WIDDEN, P. Plant community influences on soil microfungus assemblages in boreal mixed-wood forests. **Mycologia**, New York, v. 99, p. 56-67, 2007.

de BOER, W.D.; FOLMAN, L.B.; SUMMERBELL, R.C.; BODDY, L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 795–811, 2005.

de VRIES, F.; VAN GROENIGEN, J.; HOFFLAND, E.; BLOEM, J. Nitrogen losses from two grassland soils with different fungal biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 43, p. 997-1005, 2011.

DIAGNE, N.; THIOULOUSE, J.; SANGUIN, H.; PRIN, Y.; KRASOVA-WADE, T.; DUCOUSSO, M.; DUPONNOIS, R.; THOEN, D.; PRIN, Y. Diversity of ectomycorrhizal fungi associated with *Eucalyptus* in Africa and Madagascar. **International Journal of Forestry Research**, Nasr city, v. 2012, p. 1–10, 2012.

EILERS, K.G.; DEBENPORT, S.; ANDERSON, S.; FIERER, N. Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 32, p. 58-65, 2012.

ELSAS, J.D.; BOERSMA, F.G.H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, Oxford, v. 47, p. 77-87, 2011.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, 1999. 412 p.

FIERER, N.; SCHIMEL, J.P.; HOLDEN, P.A. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 35, p. 167–176, 2003.

FIERER, N.; JACKSON, J.A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R.B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 71, p. 4117-4120, 2005.

FINLAY, R.; READ, D. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. II. The uptake and distribution of phosphorus by mycelial strands interconnecting host plants. **New Phytologist**, New York, v. 103, p. 157–165, 1986.

FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 80, p. 1579-1583, 1983.

FITTER, A.H.; HELGASON, T.; HODGE, A. Nutritional exchanges in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: implications for sustainable agriculture, **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 68–72, 2011.

FORRESTER, D.I.; BAUHUS, J.; COWIE, A.L. On the success and failure of mixed species tree plantations: lessons learned from a model system of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 209, p. 147-155, 2005.

FORRESTER, D.I.; BAUHUS, J.; KHANNA, P.K. Growth dynamics in a mixed-species plantation of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 193, p. 81-95, 2004.

FORRESTER, D.I.; BAUHUS, J.; COWIE, A.L.; VANCLAY, J.K. Mixed-species plantations of *Eucalyptus* with nitrogen-fixing trees: a review. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 233, p. 211–230, 2006.

FRASER, T.A.; NAYYAR, W.; ELLOUZE, W.; PEREZA, J.; HANSON, P.; GERMIDA, J. Arbuscular mycorrhiza: where nature and industry meet. In: KHASA, D.Y.; PICHE, COUGHLAN, A.P. **Advances in mycorrhizal science and technology**. Ottawa: NRC Research Press; CABI Publ., 2009. chap. 18, p. 71–86.

FRIESE, C.F.; ALLEN, M.F. The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture, **Mycologia**, New York, v. 83, p. 409–418, 1991.

FRITZE, H.; PIETIKAINEN, J.; PENNANEN, T. Distribution of microbial biomass and phospholipid fatty acids in Podzol profiles under coniferous forest. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 51, p. 565–573, 2000.

GARBEVA, P.; POSTMA, J.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Effect of above ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. **Environmental Microbiology**. Oxford, v. 8, p. 233–246, 2006.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above-and below-ground views. **Journal of Plant Research**, Saitama, v. 74, p. 1572–1583, 1996.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transaction of the British Mycological Society**, Ardwick, v. 46, p. 235–246, 1963.

GIT. **Forestry consulting, 2009: *Eucalyptus* global map**. Disponível em: <http://git-forestry.com/download_git_eucalyptus_map.htm>. Acesso em: 24 maio 2014.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, New York, v. 84, p. 489–500, 1980.

GÖMÖRYOVÁ, E.; HRIVNÁK, R.; JANIŠOVÁ, M.; UJHÁZY, K.; GÖMÖRY, D. Changes of the functional diversity of soil microbial community during the colonization of abandoned grassland by a forest. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 191–199, 2009.

GONÇALVES, J.L.M.; STAPE, J.L.; LACLAU, J.P.; SMETHURST, P.; GAVA, J.L. Silvicultural effects on the productivity and wood quality of *Eucalyptus* plantations. **Forest Ecology & Management**, Amsterdam, v. 193, p. 45–61, 2004.

GONZALEZ, J.A.Z.; COSTA, M.D.; SILVA, I.R.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F.; BORGES, A.C. Acúmulo de ácido oxálico e cristais de cálcio em ectomicorrizas de eucalipto. II. Formação de cristais de oxalato de cálcio induzida por fungos ectomicorrízicos em raízes laterais finas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 555–562, 2009.

GRAYSTON, S.J.; GRIFFITH, G.S.; MAWDSLEY, J.L.; CAMPBELL, J.D.; BARDGETT, R.D. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 33, p. 533-551, 2001.

GREGORY, P.J. Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 57, p. 2-12, 2006.

HAMMAN, S.T.; BURKE, I.C.; STROMBERGER, M.E. Relationships between microbial community structure and soil environmental conditions in a recently burned system. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 1703-1711, 2007.

HEIJDEN, M.G.A. van der; BARDGETT, R.D.; STRAALLEN, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecological Letters**, Oxford, v. 11, p. 296-310, 2008.

HELGASON, T.; HELGASON, A.H.; FITTER, J.P.W. Young, molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. **Molecular Ecology**, Malta, v. 18, p. 659-666, 1999.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HÖGBERG, P.; NORDGREN, A.; BUCHMANN, N.; TAYLOR, A.F.S.; EKBLAD, A. Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. **Nature**, London, v. 411, p. 789–792, 2001.

HUANG, X.; LIU, S.; WANG, H.; HU, Z.; LI, Z.; YOU, Y. Changes of soil microbial biomass carbon and community composition through mixing nitrogen-fixing species with *Eucalyptus urophylla* in subtropical China. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 18, p. 42-48, 2014.

HUGHES, J.B.; HELLMAN, J.J.; RICKETTS, T.H.; BOHANNAN, B.J.M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4399-4406, 2001.

IPSILANTIS, I.; KARPOUZAS, D.G.; PAPADOPOULOU, K.K.; EHALIOTIS, C. Effects of soil application of olive mill wastewaters on the structure and function of the community of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 2466-2476, 2009.

JAKOBSEN I.; NIELSEN, N.E. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in field-grown crops. I. Mycorrhizal infection in cereals and peas at various times and soil depths. **New Phytologist**, v. 93, p. 401–413, 1983.

JAMES, R.; DEL LUNGO, A. **The potential for fast-growing commercial forest plantations to supply high-value round wood**. Rome: FAO, Forest Resources Development Service, Forest Resources Division, 2005. 49 p. (Planted Forests and Trees Working Paper, 33).

JOURDAN, C.; SILVA, E.; GONÇALVES, J.L.; RANGER, J.; MOREIRA, M.R.; LACLAU, J.P. Fine root production and turnover in Brazilian *Eucalyptus* plantations under contrasting nitrogen fertilization regimes. **Forest Ecology & Management**, Amsterdam, v. 256, p. 396-404, 2008.

KASEL, S.; BENNETT, L.T.; TIBBITS, J. Land uses influences soil fungal community composition across central Victoria, south-eastern Australia. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 40, p. 1724–1732, 2008.

KHANNA, P.K. Comparison of growth and nutrition of young monocultures and mixed stands of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 94, p. 105-113, 1997.

KOURTEV, P.S.; EHRENFELD, J.G.; HAGGBLOM, M. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. **Ecology**, London, v. 83, p. 3152-3166, 2002.

KOWALCHUK, G.A.; SOUZA, F.A.; VAN VEEN, J.A. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 11, p. 571-581, 2002.

KOWALCHUK, G.A.; BRUIJN, F.J.; HEAD, I.M.; AKKERMANS, A.D.L.; van ELSAS, J.D. **Molecular microbial ecology manual II**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. 922 p.

LACLAU, J.P.; RANGER, J.; DELEPORTE, P.; NOUVELLON, Y.; SAIN-ANDRÉ, L.; MARLET, S.; BOUILLET, J.P. Nutrient cycling in a clonal stand of *Eucalyptus* and an adjacent Savana ecosystem in Congo. Input-output budgets and consequences for the sustainability of the plantations. **Forest Ecology & management**, Amsterdam, v. 210, p. 375-391, 2005.

LACLAU, J.; NOUVELLON, Y.; REINE, C.; GONÇALVES, J.L.M.; KRUSCHE, A.V.; JOURDAN, C.; LE MAIRE, G.; BOUILLET, J.P. Mixing *Eucalyptus* and *Acacia* trees leads to fine root over-yielding and vertical segregation between species. **Oecologia**, London, v. 172, p. 903–913, 2013.

LACLAU, J.P.; BOUILLET, J.P.; GONÇALVES, J.L.M.; SILVA, E.V.; JOURDAN, C.; CUNHA, M.C.S.; MOREIRA, M.R.; SAINT-ANDRÉ, L.; MAQUÈRE, V.; NOUVELLON, Y.; RANGER, J. Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil: biomass allocation and net primary production. **Forest Ecology & Management**, Amsterdam, v. 255, p. 3905-3917, 2008.

- LAMBAIS, M.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação da germinação de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e da colonização micorrízica de *Stylosanthes guianensis* em solo ácido e distrófico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 12, p. 249-255, 1988.
- LE MAIRE, G.; NOUVELLON, Y.; CHRISTINA, M.; PONZONI, F.J.; GONÇALVES, J.L.M.; BOUILLET, J.P.; LACLAU, J.P. Tree and stand light use efficiencies over a full rotation of single- and mixed-species *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* plantations. **Forest Ecology & management**, Amsterdam, v. 12, p. 3-5, 2013.
- LECKIE, S.E. Method of microbial community profiling and their application to forest soils. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 220, p. 88–106, 2005.
- LEJON, D.P.H.; CHAUSSOD, R.; RANGER, J.; RANJARD, L. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 614-625, 2005.
- LIANG, Z.; DRIJBER, R.A.; LEE, J.; DWEIKAT, I.M.; HARRIS, S.D.; WEDIN, D.A. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 40, p. 956–966, 2008.
- LIU, H.; LI, J. The study of the ecological problems of *Eucalyptus* plantation and sustainable development in Maoming Xiaoliang. **Journal of Sustainable Development**, Toronto, v. 3, p. 197–201, 2010.
- LIU, L.; DUAN, Z.; XU, M.; HU, J.; WANG, S.; HU, Z.; ZHANG, S.W. Effect of monospecific and mixed *Cunninghamia lanceolata* plantations on microbial community and two functional genes involved in nitrogen cycling. **Plant and Soil**, The Hague, v. 327, p. 413, 2010.
- LIU, Y.; HE, L.; NA, L.Z.; HELGASON, T. & FENG, H.Y. Arbuscular mycorrhizal dynamics in a chronosequence of *Caragana korshinskii* plantations. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 67, p. 81-92, 2009.
- LOPEZ-GUTIERREZ, J.C.; HENRY, S.; HALLET, S.; MARTIN-LAURENT, F.; CATROU, G.; PHILIPPOT, L. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Oxford, v. 57, p. 399-407, 2004.
- LORENZO, P.; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; GONZÁLEZ, L.; FREITAS, H. Effect of invasive *Acacia dealbata* link on soil microorganisms as determined by PCR DGGE. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 44, p. 245–251, 2010.
- LOVERA, M.; CUENCA, G. Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y potencial micorrízico del suelo de una sabana natural y una sabana perturbada de la gran sabana, Venezuela. **Interciência**, Caracas, v. 32, p. 100-114, 2007.

LUMINI, E.; ORGIAZZI, A.; BORRIELLO, R.; BONFANTE, P.; BIANCIOTTO, V. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 12, p. 2165–2179, 2010.

LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and Soil**, The Hague, v. 129, p. 1-10, 1990.

MADER, P.F.; KAISER, A.; ADHOLEYA, A.; SINGH, R.; UPPAL, H.S.; SHARMA, A.K.; SRIVASTAVA, R.; SAHAI, V.; ARAGNO, M.; WIEMKEN, A.; JHORI, B.N.; FRIED, P.M. Inoculation of root microorganisms for sustainable wheat-rice and wheat-black gram rotations in India, **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 43, p. 609–619, 2011.

MEDRADO, M.J.S. **Cultivo do eucalipto: importância econômica e socioambiental**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 08 out. 2014.

MENDES, L.W. **Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso - SP**. 2009. 141 p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

MELLONI, R.; CARDOSO, E.J.B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares de plantas cítricas. II. Comparação entre diferentes espécies cítricas e endófitos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 59-67, 1999.

MÖHLENHOFF, P.; MULLER, L.; GORBUSHINA, A.A.; PETERSEN, K. Molecular approach to the characterization of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, p. 169–173, 2001.

MOORE, D.; ROBSON, G.R.; TRINCI, A.P.J. **21st century guidebook to fungi**. Cambridge: Cambridge University, Press, 2011. 639 p.

MORRIS, M.H.; PEREZ-PEREZ, M.A.; SMITH, M.E.; BLEDSOE, C.S. Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a tropical cloud forest. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 69, p. 274–287, 2009.

MORTON, J.B.; BENTIVENGA, S.P.; WHEELER, W.W. Germ plasm in the international collection of arbuscular and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. **Plant and Soil**, Amsterdam, v. 159, p. 47-59, 1993.

MOSONI, P.; DURAND, F.C.; MAILLET, C.B.; FORANO, E. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. **Applied Microbiology**, Washington, v. 103, p. 2676–2685, 2007.

MUELLER, G.M.; SCHMIT, J.P.; LEACOCK, P.R.; BUYCK, B.; CIFUENTES, J.; DESJARDIN, D.E.; HALLING, R.E.; HJORTSMAN, K.; ITURRIAGA, T.; LARSSON, K. Global diversity and distribution of macrofungi. **Biodiversity Conservation**, Oxford, v. 16, p. 37-48, 2007.

MYERS, B.; WEBSTER, K.L.; MCLAUGHLIN, J.W.; BASILIKO, N. Microbial activity across a boreal peat land nutrient gradient: the role of fungi and bacteria. **Wetlands Ecology and Management**, Dordrecht, v. 20, p. 77–88, 2012.

MYERS, R.T.; ZAK, D.R.; WHITE, D.C.; PEACOCK, A. Landscape-level patterns of microbial community composition and substrate use in upland forest ecosystems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 65, p. 359–367, 2001.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, p. 127-141, 1998.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A. Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

NANNIPIERI, P.; BADALUCCO, L. Biological processes. In: BEMBI, D.K.; NIEDER, R. (Ed.). **Processes in the soil–plant system: modelling concepts and applications**. Binghamton; New York: The Haworth Press, 2003. p. 87-102.

NIELSEN, U.N.; OSLER, G.H.R.; CAMPBELL, C.D.; BURSLEM, D.F.R.P.; WAL, R. The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. **Journal of Biogeography**, Malden, v. 37, p. 1317-1328, 2010.

NOUVELLON, Y.; LACLAU, J-P.; EPRON, D.; LE MAIRE, G.; BONNEFOND, J-M.; GONÇALVES, J.L.M.; BOUILLET, J-P. Carbon allocations throughout the development of monospecific and mixed-species plantations of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in Brazil. **Tree Physiology**, Oxford, v. 32, p. 680–695, 2012.

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, London, v.178, p. 5636-5643, 1996.

OEHL, F.; SIEBERDING, E.; INEICHEN, K.; RIS, E. A.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. **The New Phytologist**, Oxford, v. 165, p. 273-83, 2005.

OLIVEIRA, C.A.; SÁ, N.M.H.; GOMES, E.A.; MARRIEL, I.E.; SCOTTI, M.R.; GUIMARAES, C.T.; SCHAFFERT, R.E. & ALVES, V.M.C. Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Applied Soil Ecology**. Amsterdam, v. 41, p. 249-258, 2009.

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

PEAY, K.G.; KENNEDY, P.G.; DAVIES, S.J.; TAN, S.; BRUNS, T.D. Potential link between plant and fungal distributions in a dipterocarp rainforest: community and phylogenetic structure of tropical ectomycorrhizal fungi across a plant and soil ecotone. **New Phytologist**, New York, v. 185, p. 529–542, 2010.

PEIXOTO, R.S.; CHAER, G.M.; FRANCO, N.; REIS JUNIOR, F.B.; MENDES, I.C.; ROSADO, A.S. A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Antonie van Leeuwenhoek**, Belgium, v. 98, p. 403-413, 2010.

PERSSON, J.; HOGBERG, P.; EKBLAD, A.; HOGBERG, M.N.; NORDGREN, A.; NASHOLM, T. Nitrogen acquisition from inorganic and organic sources by boreal forest plants in the field. **Oecologia**, London, v. 137, p. 252–257, 2003.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 55, p. 158-161, 1970.

PRESCOTT, C.E.; GRAYSTON, S.J. Tree species influence on microbial communities in litter and soil: current knowledge and research needs, **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 309, p. 19-27, 2013.

QUINCE, C.; CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T. The rational exploration of microbial diversity. **The ISME Journal**, New York, v. 2, p. 997–1006, 2008.

RACHID, C.T. **Biodisponibilidade de nutrientes e estrutura microbiana do sistema solo serapilheira em floresta plantada mista de *Eucalyptus urograndis* e *Acacia mangium***. 2013. 103 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

RACHID, C.T.; PICCOLO, M.C.; LEITE, D.C.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.C.; VAN ELSAS, J.D.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S. Physical-chemical and microbiological changes in Cerrado soil under differing sugarcane harvest management systems. **BMC Microbiology**, Valencia, v. 12, p. 170, 2012.

RACHID, C.T.C.C.; BALIEIRO, F.C.; PEIXOTO, R.S.; PINHEIRO, Y.A.S.; PICCOLO, M.C.; CHAER, M.G.; ROSADO, A.S. Mixed plantations can promote microbial integration and soil nitrate increases with changes in the N cycling genes. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 18. p. 146-153, 2013.

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

RODRIGUES, L.A.; MARTINS, M.A.; SALOMÃO, M.S.M.B. Uso de micorrizas e rizóbio em cultivo consorciado de eucalipto e sesbânia. I. Crescimento, absorção e transferência de nitrogênio entre as plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v. 27, p. 583-591, 2003.

SANTOS, J.C.; FINLAY, R.D.; TEHLER, A. Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilisation gradient. **New Phytologist**, New York, v. 172, p. 159-168, 2006.

SANTOS, V.L.; MUCHOVEJ, R.M.; BORGES, A.C.; NEVES, J.C.; KASUYA, M.C.M. Vesicular-arbuscular-ectomycorrhiza succession in seedlings of *Eucalyptus* spp. **Journal Brazilian Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 81-86, 2001.

SATTER, M.A.; HANAFI, M.M.; MAHMUD, T.M.M.; AZIZAH, H. Performance of arbuscular mycorrhiza inoculated *Acacia mangium* seedlings on degraded land with different rates of phosphorus. **Bangladesh Journal of Microbiology**, Dhaka, v. 24, p. 9-13, 2007.

SCHENCK, H.J. Vertical vegetation structure below ground: scaling from root to globe. **Progress in Botany**, Heidelberg, v. 66, p. 341–373, 2005.

SCHENCK, N.C.; PÉREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. 3rd ed. Gainesville: Synergistic, 1990. 250 p.

SCHÜSSLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1413-1421, 2001.

SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C, PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; ALVES, L.M.C.; LEMOS, E.G.M. Bacterial diversity of soil under Eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1507-1516, 2006.

SIMON, L.; SIMON, M.; LALONDE, T.D.; BRUNS. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 58, p. 291-295, 1992.

SMITH, M.E.; HENKEL, T.W.; UEHLING, J.K.; FREMIER, A.K.; CLARKE, H.D. The ectomycorrhizal fungal community in a Neotropical forest dominated by the endemic dipterocarp *Pakaraimaea dipterocarpacea*. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 8, p. 55-60, 2013.

SMITH, S.; READ, D. **Mycorrhizal symbiosis**. 3rd ed. Boston: Academic Press, 2008. 787 p.

SMITH, S.E.; SMITH, F.A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 227–250, 2011.

STEFFEN, R.; ANTONIOLLI, Z.; STEFFEN, G.; ECKHARDT, D. Micorrização das mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden comercializadas no município de Santa Maria, RS. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 32, p. 25-35, 2010.

SYLLA, S.; GALIANA, A.; BAUDOIN, E.; NEYRA, M.; SVISTOONOFF, S.; LEBRUN, M.; DUPONNOIS, R. Ectomycorrhizal diversity enhances growth and nitrogen fixation of *Acacia mangium* seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 57, p. 468–476, 2013.

TIBBETT, M.; SANDERS, F.E. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 783-789, 2002.

VADEZ, V.; LIM, G.; DURAND, P.; DIEM, H.G. Comparative growth and symbiotic performance of *Acacia mangium* provenances from Papua New Guinea in response to the supply of phosphorus at various concentrations. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 19, p. 60-64, 1995.

VOIGTLAENDER, M.; LACLAU, J.P.; GONÇALVES, J.L.M.; DE CÁSSIA PICCOLO, M.Z.; NOUVELLON, Y.; RANGER J.; BOUILLET, J.P. Introducing *Acacia mangium* trees in *Eucalyptus grandis* plantations: consequences for soil organic matter stocks and nitrogen mineralization. **Plant and Soil**, The Hague, v. 352, p. 99-111, 2012.

WAKELIN, S.A.; MACDONALD, L.M.; ROGERS, S.L.; GREGG, A.L.; BOLGER, T.P.; BALDOCK, J.A. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 40, p. 803-813, 2008.

WARDLE, D.A. A comparative assessment of factors, which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biological Reviews**. Malden, v. 67, p. 321-358, 1992.

WEHNER, J.; ANTUNES, P.M.; POWELL, J.R.; CARUSO, T.; RILLIG, M.C. Indigenous arbuscular mycorrhizal fungal assemblages protect grassland host plants from pathogens. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 6, p. 27-81, 2011.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. chap. 38, p. 315-322.

WILSON, G.W.T.; RICE, C.W.; RILLIG, M.C.; SPRINGER, A.; HARTNETT, D.C. Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. **Ecology Letters**, Oxford, v. 12, p. 452–461, 2009.

WOESE, C.R. There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 58, p. 1-9, 1994.

WU, B.; MARUYAMA, H.; TERAMOTO, M.; HOGETSU, T. Structural and functional interactions between extra radical mycelia of ectomycorrhizal *Pisolithus* isolates. **New Phytologist**, New York, v. 194, p. 1070–1078, 2012.

XUE, D.; HUANG, X.D.; YAO, H.Y.; HUANG, Y.C. Effect of lime application on microbial community in acidic tea orchard soils in comparison with those in wasteland and forest soils. **Journal of Environmental Sciences**, Beijing, v. 22, p. 1253-1260, 2010.

YAMASHITA, N.; OHTA, S.; HARDJONO, A. Soil changes induced by *Acacia mangium* plantation establishment: comparison with secondary forest and *Imperata cylindrica* grassland soils in South Sumatra, Indonesia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 254, p. 362-370, 2008.

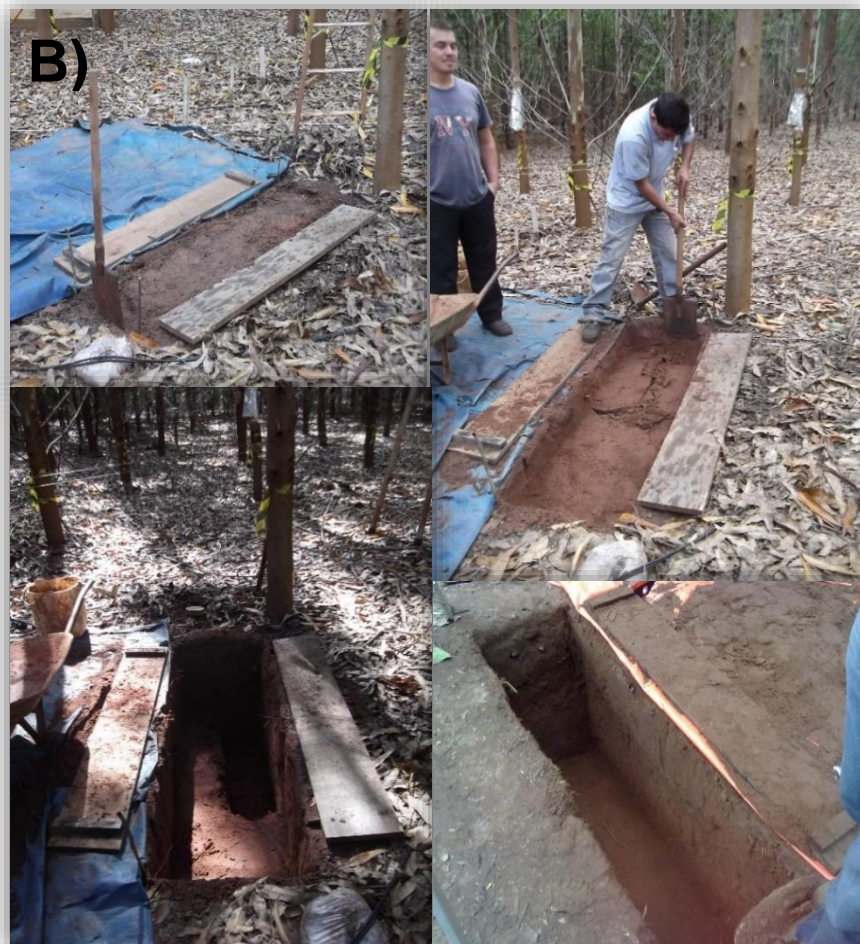
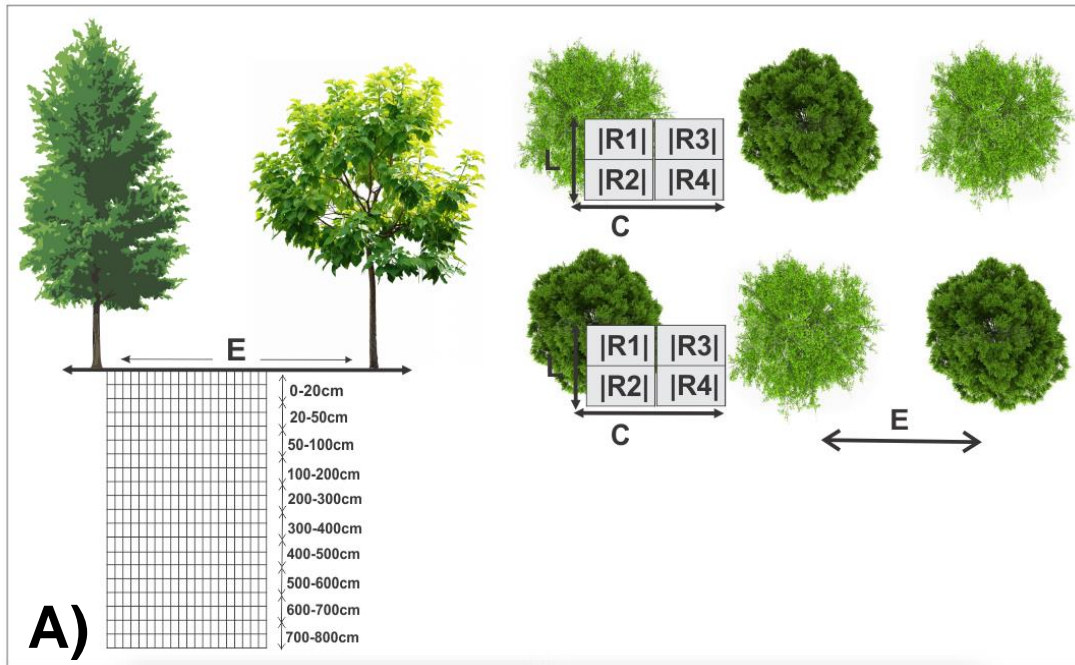
YINGLONG, C. Mycorrhizal succession and inoculant efficiency of dual inoculation on *Eucalyptus urophylla*. **Forestry Studies**, Beijing, v. 1, p. 16-21, 1999.

ZANGARO, W.; NISIZAKI, S.M.A.; DOMINGOS, J.C.B; NAKANO, E.M. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from South Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 19, p. 315-324, 2003.

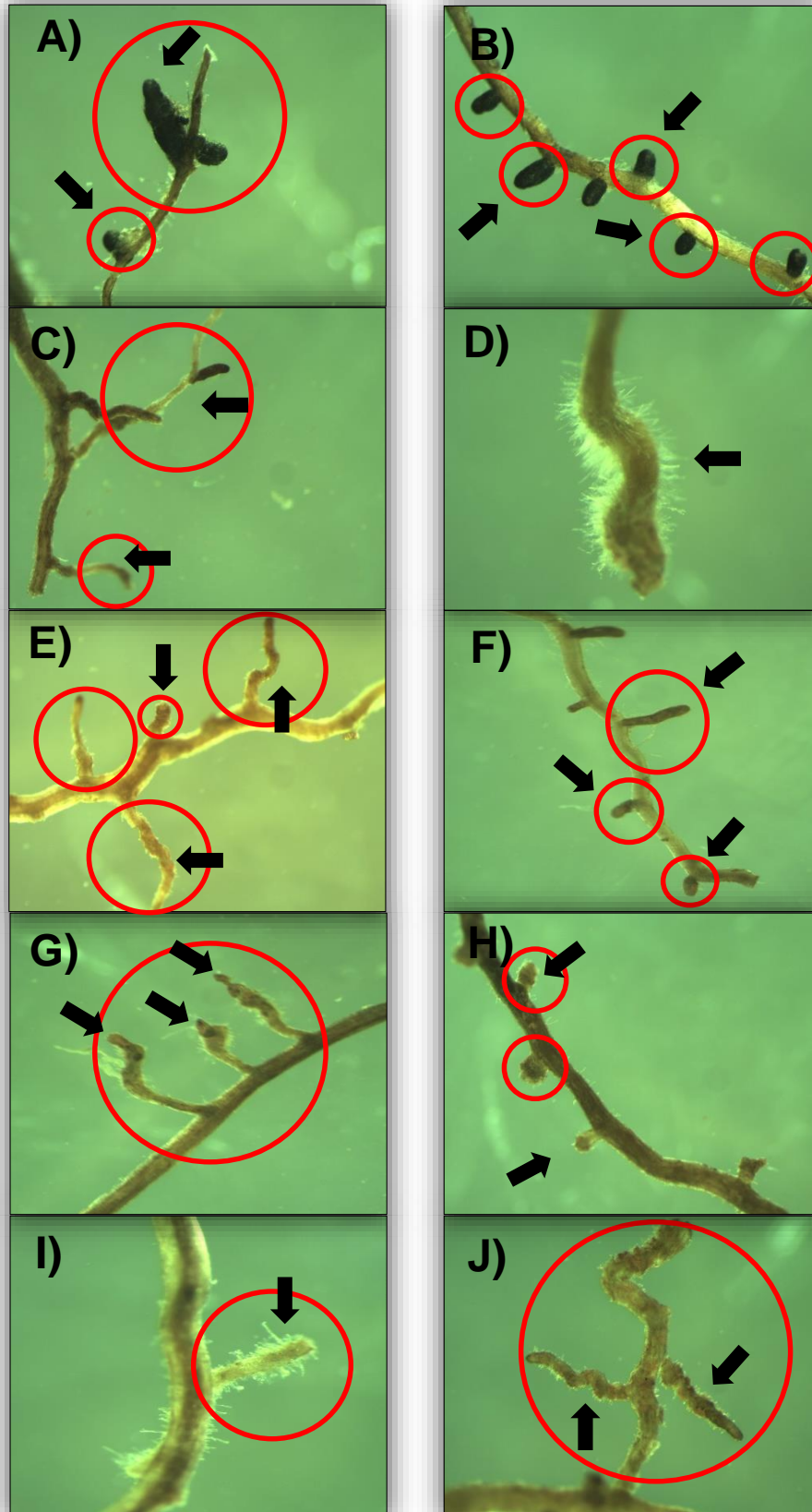
ZANGARO, W.; NISHIDATE, F.; VANDRESEN, J.; ANDRADE, A.; NOGUEIRA, M. A. Root mycorrhizal colonization and plant responsiveness are related to root plasticity, soil fertility and successional status of native woody species in southern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 23, p. 53-62, 2007.

APÊNDICES

Apêndice A - A) Pontos de P1 a P10 (profundidades amostradas); E= espaçamento entre plantas (3 m); L= largura da trincheira (0,6 m) e C= comprimento da trincheira (1,80 m). R1-R4= N° de repetições. B) dimensionamento inicial da trincheira e retirada das primeiras amostras



Apêndice B - Radículas com ramificações curtas modificadas associadas a raízes de *Eucalyptus grandis*. Em A- P1 (0-20 cm); B- P2 (20-50 cm); C- P3 (50-100 cm e assim, a cada um metro, até o P10 (700-800 cm)



ANEXOS

Anexo A - Atributos químicos referentes aos perfis coletados na trincheira dos plantios puros (100A), (100E) e mistos A(A+E) e E(A+E).

Profundidade (cm)	pH (KCl)	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	M
		mg.kg ⁻¹	-----mmolc.kg ⁻¹ -----							%	%
<i>Acacia Mangium</i> (100A)											
P1. 0-20	3,0a	2,4a	<*0,3a	<2a	1a	7a	39a	1,5a	40,4a	4a	29 ^a
P2. 20-50	4,2b	1b	<0,3a	<2a	<1a	5a	20b	1,1b	21,5b	5a	83b
P3. 50-100	4,2b	1b	<0,3a	<2a	<1a	3b	20b	1,1b	21,5b	5a	80b
P4. 100-200	4,3b	1b	<0,3a	<2a	<1a	3b	19b	1,1b	19,7b	6a	74b
P5. 200-300	4,5b	1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	14c	1,3b	15,4c	8b	71c
P6. 300-400	5,1c	1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	11c	1,1b	12,6d	9b	27 ^a
P7. 400-500	5,3c	1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	11c	1,1b	11,8d	10b	1d
P8. 500-600	5,4c	1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	<10d	1,1b	10d	13d	29 ^a
P9. 600-700	5,2c	1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	10d	1,1b	11d	11b	29 ^a
P10. 700-800	5,0c	1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	<10d	1,1b	10d	11b	1d
<i>Acacia mangium x Eucalyptus grandis</i> (A(A+E))											
P1. 0-20	3,1a	1,1a	<0,3a	<2a	2a	7a	38a	3,5a	41,5a	8a	66a
P2. 20-50	3,9b	<1a	<0,3a	<2a	<1b	5a	28b	1,1b	29,4b	4b	80b
P3. 50-100	4,2b	<1a	<0,3a	<2a	<1b	4b	25b	3,1a	25,9b	4b	79b
P4. 100-200	4,3b	<1a	<0,3a	3b	<1b	2b	22c	1,1b	25,2b	12c	43c
P5. 200-300	4,5b	<1a	<0,3a	<2a	<1b	<1c	19c	1,1b	12,6c	6b	45c
P6. 300-400	5,0c	<1a	<0,3a	<2a	<1b	<1c	11d	1,1b	14,4c	9a	29d
P7. 400-500	5,0c	<1a	<0,3a	<2a	<1b	<1c	<10d	1,1b	7,3d	16d	1e
P8. 500-600	5,1c	<1a	<0,3a	<2a	<1b	<1c	<10d	1,1b	9,1d	13c	29d
P9. 600-700	5,1c	<1a	<0,3a	<2a	<1b	<1c	11d	1,1b	11,8c	10c	1e
P10. 700-800	4,9c	<1a	<0,3a	<2a	<1b	<1c	<10d	1,1b	11,8c	10c	29d
<i>Eucalyptus grandis x Acacia mangium</i> (E(E+A))											
P1. 0-20	3,7a	2,3a	<0,3a	<2a	2a	8a	36a	3,6a	41,6a	8a	65a
P2. 20-50	3,9a	1b	<0,3a	<2a	<1a	4b	21b	1,1b	29,2b	4,1b	81b
P3. 50-100	4,1a	<1b	<0,3a	<2a	<1a	4b	25c	3,1a	25,7b	4b	78b
P4. 100-200	4,0a	<1b	<0,3a	<2a	<1a	3b	22b	1,1b	25,1b	11c	42c
P5. 200-300	4,3b	<1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	19b	1,0b	12,3c	6b	45c
P6. 300-400	5,0c	<1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	11d	1,1b	14,3c	9,0a	2d
P7. 400-500	5,1c	<1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	10d	1,1b	7,1d	16d	1e
P8. 500-600	5,2c	<1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	10d	1,1b	9,0d	12c	28d
P9. 600-700	5,2c	<1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	11d	1,1b	11,7c	10c	1e
P10. 700-800	4,9c	<1b	<0,3a	<2a	<1a	<1c	10d	1,1b	11,7c	10c	30d
<i>Eucalyptus grandis</i> (100E)											
P1. 0-20	3,9a	2,1a	0,4a	<2a	2a	6a	32a	4,1a	36,4a	11a	60a
P2. 20-50	3,9a	1a	0,3a	<2a	1a	5a	27b	1,7b	28,7b	6b	74b
P3. 50-100	4,0a	1a	<0,3b	<2a	<1a	4a	23c	1,2c	23,9c	5b	77b
P4. 100-200	4,1a	1a	<0,3b	<2a	<1a	1b	20c	1,2c	21,3c	6b	54c
P5. 200-300	4,7b	1a	<0,3b	<2a	<1a	1b	<10d	1,2c	10,8d	11c	54c
P6. 300-400	5,2c	1a	<0,3b	<2a	<1a	<1b	<10d	1,5b	11,1d	14d	23d
P7. 400-500	5,1c	1a	<0,3b	<2a	<1a	<1b	12d	1,2c	13,4d	9c	1e
P8. 500-600	5,2c	1a	<0,3b	<2a	<1a	<1b	10d	1,2c	11,7d	10c	28f
P9. 600-700	5,2c	1a	<0,3b	<2a	<1a	<1b	10d	1,2c	11,6d	10c	1g
P10. 700-800	4,9b	1a	<0,3b	<2a	<1a	<1b	15e	1,2c	16,0e	7b	28f

*(<) menor que o Limite de Quantificação (LQ). SB: Soma de bases trocáveis; CTC: Capacidade de troca catiônica; V: Percentual de bases saturando a CTC; m: Saturação por Alumínio. Letras minúsculas comparam cada camada do solo pelo teste de Tukey $p>0,05$.

Anexo B – Matéria orgânica e atributos físico-granulométricos referentes aos perfis coletados na trincheira dos plantios puros (100A), (100E) e mistos (A+E), EECFI-Itatinga, São Paulo/Brasil.

Profundidade (cm)	M.O.S	Areia	Silte	Argila*	Classe de textura*
	g.kg ⁻¹	g.kg ⁻¹	g.kg ⁻¹	g.kg ⁻¹	
<i>Acacia Mangium</i> (100A)					
P1. 0-20	13a	846	29	125	Arenosa
P2. 20-50	7b	852	22	125	Arenosa
P3. 50-100	7b	818	53	129	Arenosa
P4. 100-200	5b	792	20	188	Média-Arenosa
P5. 200-300	4c	779	21	200	Média-Arenosa
P6. 300-400	<4c	766	21	213	Média-Arenosa
P7. 400-500	<4c	738	12	251	Média-Argilosa
P8. 500-600	<4c	740	21	239	Média-Arenosa
P9. 600-700	<4c	739	36	226	Média-Arenosa
P10. 700-800	<4c	733	16	251	Média-Argilosa
<i>Acacia mangium x Eucalyptus grandis</i> A(A+E)					
P1. 0-20	10a	896	28	75	Média-Arenosa
P2. 20-50	8a	842	32	125	Média-Arenosa
P3. 50-100	5b	830	19	151	Média-Arenosa
P4. 100-200	5b	792	32	176	Média-Arenosa
P5. 200-300	<4c	786	38	176	Média-Arenosa
P6. 300-400	<4c	777	21	202	Média-Arenosa
P7. 400-500	<4c	749	26	225	Média-Arenosa
P8. 500-600	<4c	772	15	213	Média-Arenosa
P9. 600-700	<4c	740	34	226	Média-Arenosa
P10. 700-800	<4c	749	25	226	Média-Arenosa
<i>Acacia mangium x Eucalyptus grandis</i> E(E+A)					
P1. 0-20	10a	893	29	76	Média-Arenosa
P2. 20-50	9a	839	31	120	Média-Arenosa
P3. 50-100	5b	821	19	152	Média-Arenosa
P4. 100-200	5b	790	30	170	Média-Arenosa
P5. 200-300	<4c	786	37	174	Média-Arenosa
P6. 300-400	<4c	778	20	205	Média-Arenosa
P7. 400-500	<4c	753	29	218	Média-Arenosa
P8. 500-600	<4c	730	14	217	Média-Arenosa
P9. 600-700	<4c	747	34	220	Média-Arenosa
P10. 700-800	<4c	751	22	224	Média-Arenosa
<i>Eucalyptus grandis</i> (100E)					
P1. 0-20	16a	834	16	150	Média-Arenosa
P2. 20-50	<4b	839	11	150	Média-Arenosa
P3. 50-100	<4b	825	24	151	Média-Arenosa
P4. 100-200	9c	793	32	175	Média-Arenosa
P5. 200-300	51d	778	40	182	Média-Arenosa
P6. 300-400	6b	756	29	216	Média-Arenosa
P7. 400-500	<4b	747	69	184	Média-Arenosa
P8. 500-600	<4b	736	33	231	Média-Arenosa
P9. 600-700	<4b	729	43	229	Média-Arenosa
P10. 700-800	<4b	734	28	238	Média-Arenosa

*com dispersante NaOH

*Arenosa (até 14%), Média arenosa (15 a 24%), Argilosa (35 a 59%).

Letras minúsculas comparam cada camada do solo pelo teste de Tukey $p > 0,05$.