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

**Análise da comunidade de fungos em áreas de monoculturas e
consórcio de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium***

Maiele Cintra Santana

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2017**

Maiele Cintra Santana
Licenciada em Ciências Biológicas

Análise da comunidade de fungos em áreas de monoculturas e consórcio de
Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2017

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

Santana, Maiele Cintra

Análise da comunidade de fungos em áreas de monoculturas e consórcio de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* / Maiele Cintra Santana. - - Piracicaba, 2017.

109 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Solo 2. Rizosfera 3. Raiz 4. Micorriza arbuscular 5. Ectomicorriza 6. T-RFLP I. Título

Dedico este trabalho aos meus pais, Neide Cintra e Delival Santana, por terem me dado a vida e me ensinado a vivê-la com dignidade, por terem renunciado aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, por todo amor e carinho e, sobretudo, pelo apoio e incentivo que me deram durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Após dois anos de muito aprendizado, quero aqui deixar meu reconhecimento e gratidão a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão e execução deste trabalho:

A **Deus**, acima de tudo, pois eu acredito na sua existência e foi através da fé que eu tenho nele, que jamais pensei em desistir. Ele foi essencial para que eu pudesse realizar este trabalho, por ter me dado forças e coragem, calma e sanidade nos momentos de desespero;

Ao **Arthur Prudêncio**, pelo incentivo e apoio científico desde o início, por nunca hesitar em me fornecer ajuda, especialmente com o Corel, e por todas as nossas discussões, que foram valiosas e engrandecedoras;

À professora **Elke J. B. N. Cardoso**, pela confiança em mim depositada para realização deste trabalho e, sobretudo, pela sua orientação e valiosas contribuições, que tornaram possível mais esta conclusão;

A todos os meus **colegas de laboratório**: Carolinne Rosa e Maurício Zagatto pela ajuda no campo, Antonio Marcos Miranda por me apresentar o R, Carol Medrado pelo auxílio com as análises, Yasmin Florentino pelo constante incentivo, Tâmara Messias, German Estrada, Thiago Gumiere, Ademir Durrer, Adijailton, e a todos do Laboratório de Microbiologia do Solo;

Aos técnicos **Denise Mescolotti, Fernando Baldesin e Sônia Pires**, por todo auxílio fornecido a este trabalho, com vocês foi possível ir muito mais longe;

Ao professor **José Leonardo Gonçalves** e à Dra **Carolina Brandani**, por fornecerem a área de estudo. Aos funcionários da **Estação experimental de Ciências Florestais de Itatinga**. À **Agnès Robin e Jean-Pierre Bouillet**, por contribuírem com o trabalho;

Ao professor **Marcílio Almeida** por fornecer o seu laboratório, à Dra **Érika Graner** por me ensinar anatomia vegetal e por toda dedicação a este trabalho e a toda **família morfogênese**;

A **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** e ao **Programa de Microbiologia Agrícola**, em especial ao professor Fernando Andreote, pela estrutura e oportunidade de desenvolver este trabalho;

As **agências de fomento**: CAPES, FEALQ e CNPq;

A **minha família**, em especial aos **meus pais**, por todo amor, cuidado, carinho e apoio em minhas decisões, vocês me deram forças para seguir, ao meu irmão **Davi Cintra**, pelo companheirismo;

Ao **Eduardo Cardoso**, pessoa com quem amo partilhar a vida, por sua paciência e toda ajuda, principalmente com as referências, pelos finais de semana “perdidos” e por sua capacidade de me trazer paz nos momentos de correria;

Aos **meus amigos**, pelo incentivo e apoio constante.

NINGUÉM NUNCA CONSEGUIU ALCANÇAR SUCESSO EMINENTE SIMPLEMENTE FAZENDO O QUE LHE É SOLICITADO. É A QUANTIDADE E A EXCELÊNCIA DO QUE ESTÁ ALÉM DO SOLICITADO QUE DETERMINA A GRANDEZA DA DISTINÇÃO FINAL.

Charles Kendall Adams

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. PLANTIOS FLORESTAIS: MONOCULTIVOS E CONSÓRCIO DE <i>EUCALYPTUS</i> SP. E <i>ACACIA</i> SP.....	11
2.2. INTERAÇÃO ENTRE PLANTAS FLORESTAIS E A COMUNIDADE DE FUNGOS.....	12
2.3. ATRIBUTOS FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS COMO INDICADORES DA QUALIDADE DO SOLO.....	15
2.4. TÉCNICAS MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE FÚNGICA NO SOLO.....	16
3. HIPÓTESES.....	17
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5. METODOLOGIA.....	21
5.1. ÁREA DE COLETA.....	21
5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
5.3. COLETA DAS AMOSTRAS.....	22
5.4. DETERMINAÇÃO DOS ATRIBUTOS FÍSICOS E QUÍMICOS.....	23
5.5. DETERMINAÇÃO DOS ATRIBUTOS BIOLÓGICOS DO SOLO.....	24
5.6. AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE DE FUNGOS.....	25
5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1. ATRIBUTOS FÍSICOS DO SOLO.....	31
6.2. ATRIBUTOS QUÍMICOS DO SOLO, DA RIZOSFERA E DAS RAÍZES.....	34
6.3. ATRIBUTOS BIOLÓGICOS DO SOLO.....	41
6.4. COMUNIDADE DE FUNGOS.....	43
7. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICES	103
ANEXOS	109

RESUMO

Análise da comunidade de fungos em áreas de monoculturas e consórcio de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium*

Os fungos representam cerca de 75% da biomassa microbiana em áreas florestais, desempenhando funções importantes, desde a mineralização dos resíduos orgânicos até a disponibilização de nutrientes para plantas por meio das associações micorrízicas, o que influencia a ciclagem de nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento das árvores. O objetivo desse trabalho foi avaliar a comunidade de fungos do solo, da rizosfera e do sistema radicular de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* plantados em monocultivos e em consórcio, e encontrar respostas para os padrões observados por meio da correlação com os atributos físicos, químicos, biológicos e a profundidade do solo. A coleta das amostras foi realizada na Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga, em 2016, quando as plantas estavam com 2 anos de idade. Foram coletadas amostras em quatro tratamentos: monoculturas de *E. grandis* e de *A. mangium* e consórcios de *E. grandis* e de *A. mangium*, nos quais foram construídas trincheiras para coleta das amostras nas camadas de 0-10, 10-20, 20-50 e 50-100 cm de profundidade. Foram caracterizados os atributos físicos e biológicos do solo e os atributos químicos do solo, da rizosfera e das raízes. Para a avaliação micorrízica, foi quantificado o número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e as taxas de colonização radicular por FMA e por fungos ectomicorrízicos. Foi avaliada a morfologia das estruturas das micorrizas arbusculares e ectomicorriza (ECM). A estrutura da comunidade de fungos do solo e da rizosfera foi avaliada por meio da técnica de *Terminal restriction fragment length polymorphism* (T-RFLP). Para isso, o DNA foi amplificado utilizando os *primers* ITS1f-FAM e ITS4 e a restrição dos fragmentos foi realizada com a enzima *Hae*III. A abundância de cópias do gene ITS do solo e da rizosfera foi quantificada por PCR quantitativo (*q*PCR), utilizando os *primers* ITS1f e 5.8s. Os atributos físicos, químicos e biológicos tiveram poucas variações entre os tratamentos avaliados, sendo as maiores diferenças encontradas entre as profundidades. O número de esporos (<29) e as taxas de colonização micorrízica (<48%) foram baixos em todos os tratamentos, e se reduziram com o aumento da profundidade. As plantas de *A. mangium* não formaram micorrizas arbusculares. Nas raízes de *E. grandis*, não houve a formação de arbúsculos, mas foi verificada a presença de hifas enroladas (*hyphal coils*), estrutura de micorriza do tipo *Paris*. A anatomia das ECM confirmou a colonização destes fungos nas raízes das plantas estudadas. O *q*PCR mostrou maior abundância de genes ITS na rizosfera em relação ao solo, assim como nas camadas superficiais (0-10 cm) em relação às mais profundas (10 cm abaixo). A Análise de Coordenadas Principais revelou diferenças na estrutura das comunidades de fungos nos tratamentos estudados, principalmente para a região da rizosfera, diferenciando o perfil de fungos do monocultivo de *E. grandis* dos demais tratamentos, assim como a influência da *A. mangium* na estruturação da comunidade. A análise de redundância mostrou a influência de alguns atributos químicos nas taxas de colonização e estruturação da comunidade. Dessa forma, conclui-se que em sistema de consórcio, uma espécie de planta parece ser mais influente do que a outra na estruturação da comunidade de fungos e essa influência é mais evidente na rizosfera. Além disso, os atributos químicos são fatores importantes na organização da comunidade fúngica.

Palavras-chave: Solo; Rizosfera; Raiz; Micorriza arbuscular; Ectomicorriza; T-RFLP

ABSTRACT

Analysis of the fungal community in monoculture and consortium areas of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium*

The fungi represent about 75% of the microbial biomass in forest areas, performing important functions, from the mineralization of the organic residues to the availability of nutrients to plants through mycorrhizal associations, which influences the nutrient cycling and, consequently, the growth of trees. The objective of this work was to evaluate the community of fungi of the soil, rhizosphere and root system of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* planted in monocultures and consortium, and to find explanations for the observed patterns through the correlation with physical and chemical soil attributes and soil depth. The samples were collected at the Experimental Station of Forest Sciences of Itatinga in 2016, when the plants were 2 years old. Samples were collected in four treatments: monocultures of *E. grandis* and *A. mangium* and consortia of *E. grandis* and *A. mangium*, in which trenches were constructed to collect samples in the 0-10, 10-20, 20 -50 and 50-100 cm deep. The physical and biological attributes of the soil and the chemical attributes of soil, rhizosphere and roots were characterized. For the mycorrhizal evaluation, the number of spores of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and the rates of root colonization by AMF and ectomycorrhizal fungi were quantified. The morphology of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal (ECM) structures was evaluated. The structure of the soil and rhizosphere fungi community by was evaluated by the technique of Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). For this, the DNA was amplified using primers ITS1f-FAM and ITS4 and restriction of the fragments was performed with the enzyme HaeIII. The abundance of ITS gene copies of soil and rhizosphere was quantified by quantitative PCR (qPCR), using primers ITS1f and 5.8s. The physical, chemical and biological attributes had few variations among the evaluated treatments, being the greatest differences found between the depths. The number of spores (<29) and mycorrhizal colonization rates (<48%) were low in all treatments, and reduced with increasing depth. *A. mangium* plants did not form FMA. In the roots of *E. grandis*, there was no formation of arbuscules, but we found the presence of hyphal coils, mycorrhizal structures of the Paris type. The anatomy of the ECM confirmed the colonization of these fungi in the roots of the studied plants. The qPCR showed higher abundance of ITS genes in the rhizosphere in relation to the soil, as well as in the superficial layers (0-10 cm) in relation to the deeper ones (10 cm below). The Principal Coordinates Analysis revealed differences in the structure of the fungal communities in the treatments studied, especially for the rhizosphere region, differentiating the fungal profile of the *E. grandis* monoculture from the other treatments, as well as the influence of *A. mangium* on the structure of the community. The redundancy analysis showed the influence of some chemical soil attributes on the rates of colonization and community structuring. Thus, it is concluded that in a consortium system, one plant species seems to be more influential than the other in structuring the fungal community, and this influence is more evident in the rhizosphere. In addition, chemical attributes are important factors in the organization of the fungal community.

Keywords: Soil; Rhizosphere; Root; Arbuscular mycorrhiza; Ectomycorrhiza; T-RFLP

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Diante da necessidade de minimizar impactos ambientais e reduzir custos, o setor florestal brasileiro de árvores plantadas vem considerando a obtenção de sistemas de plantios mais equilibrados, com a utilização adequada e o uso eficiente dos recursos naturais. Neste contexto, a intensificação ecológica dos cultivos florestais vem sendo buscada, principalmente pela implantação de sistemas de consórcios entre árvores leguminosas e não leguminosas.

Um estudo comparou quatro tipos de manejo ao longo de seis anos: monocultivo de eucalipto com e sem o uso de adubo nitrogenado e dois consórcios de eucalipto com *Acacia mangium* sem uso de adubo nitrogenado. Neste trabalho, o consórcio minimizou a necessidade de aplicação de nitrogênio no solo, isso porque as raízes de *A. mangium* se associam à bactérias fixadoras de nitrogênio, o que aumenta a disponibilidade deste elemento no solo. Além da economia com a compra e aplicação de fertilizantes, o consórcio promoveu uma série de benefícios ecológicos, como o aumento do carbono, da fertilidade e da diversidade de organismos do solo (EMBRAPA, 2017).

Além da Embrapa Agrobiologia, o *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD/França) e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) estão conduzindo, por uma rede de pesquisa, estudos de viabilidade desse tipo de consórcio em larga escala (LACLAU et al., 2008; BOUILLET et al., 2008; BINI et al., 2013; PAULA et al., 2015).

Nosso grupo de pesquisa, que está inserido nesta rede de experimentos, realiza, desde 2012, pesquisas que avaliam os aspectos microbiológicos das áreas de eucalipto plantados em diferentes sistemas de cultivo com *A. mangium*, leguminosa escolhida para compor os estandes com plantações consorciadas no Braisl (LACLAU et al., 2008). O grupo tem obtido resultados interessantes sobre a composição e estrutura da comunidade microbiana, tanto em superfície quanto em profundidade do solo e suas interações com os cultivos (BINI, 2012; BINI et al., 2013, 2013a; PEREIRA, 2014; SANTANA et al., 2016; PEREIRA et al., 2017).

Apesar de alguns trabalhos terem sido realizados, estudos envolvendo a estruturação e diversidade dos micro-organismos nestes sistemas de plantios ainda são incipientes, especialmente sobre a comunidade de fungos, já que estes são os principais decompositores da matéria orgânica complexa (celulose e lignina), amplamente encontrados em áreas florestais, além de serem essenciais na ciclagem de nutrientes e na disponibilização e transporte destes para as plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantios florestais: monocultivos e consórcio de *Eucalyptus* sp. e *Acacia* sp.

O setor brasileiro de árvores plantadas ocupa uma área de 7,74 milhões de hectares, fornecendo matéria prima para as indústrias de papel, celulose, carvão vegetal, lenha, compensados, óleos essenciais, entre outros (IBÁ, 2016). Neste cenário, as principais espécies florestais plantadas no país pertencem ao gênero *Eucalyptus*, que ocupam uma área de 5,56 milhões de hectares (IBÁ, 2016). Assim, fatores como o rápido crescimento, ciclo de curta rotação e alta produtividade florestal têm propiciado essa expansão (ABRAF, 2013; IBÁ, 2016).

Porém, a maior parte dos plantios é estabelecida em sistemas de monocultivos, o que pode trazer impactos negativos ao ambiente em razão da falta de diversificação na produção florestal (VIERA et al., 2013), tais como a redução da estabilidade do ecossistema devido a maior incidência de praga e patógenos (LIU et al., 2010; STRAUSS, 2001), desbalanceamentos e desordens nutricionais (BINKLEY et al., 2004; LIU et al., 2010; VIERA et al., 2013) e, conseqüentemente, maior susceptibilidade a variações do mercado financeiro.

A retirada de grande quantidade de biomassa em ciclos curtos de rotação (~ 7 anos) pode alterar a qualidade e a quantidade de matéria orgânica do solo, acarretando em solos ácidos e com baixa disponibilidade de nutrientes, como N e P (RACHID, 2013). Dessa forma, para manter altos níveis de produtividade, é necessário suprir a demanda de nutrientes das plantas, aplicando fertilizantes minerais no solo (BALIEIRO et al., 2008), o que pode gerar problemas ambientais e econômicos. Assim, a busca por manejos alternativos tem crescido e, dentre as opções, destaca-se a integração do *Eucalyptus* com árvores leguminosas, em sistemas de plantios consorciados (BOUILLET et al., 2008, BINI et al., 2013, PEREIRA et al., 2017).

Leguminosas do gênero *Acacia* tem despertado o interesse do setor florestal para plantio em consórcio com *Eucalyptus*, especialmente a espécie *Acacia mangium* (LACLAU et al., 2008). O interesse por espécies desses gêneros é devido à significativa capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas brasileiras (ANDRADE et al., 2000; ABRAF, 2013), e também à associação de suas raízes com bactérias diazotróficas eficientes em realizar a fixação biológica de N (BOUILLET et al., 2008; VIERA et al., 2013; FONSECA et al., 2017).

Estudos anteriores demonstraram que são indiscutíveis os benefícios oriundos da associação entre essas espécies, tanto para os aspectos associados aos compartimentos físicos e químicos do solo, quanto para a produtividade da madeira (FORRESTER et al., 2004). No entanto, há poucas informações acerca da estrutura e diversidade de fungos e sua importância em ambientes florestais consorciados, especialmente com a utilização integrada de tecnologias de estudo independentes de cultivo.

Recentemente, pesquisas envolvendo a microbiota do solo em plantios de *E. grandis* e *A. mangium* foram desenvolvidas (BINI 2012; BINI et al., 2013a; RACHID, 2013; PEREIRA 2014; SANTANA et al. 2016; PEREIRA et al., 2017), indicando que há influência dos sistemas de consórcio sobre a comunidade microbiana do solo. Nesse sentido, as plantas de *A. mangium* parecem ser importantes na modificação dessas comunidades, principalmente pelo estímulo à ciclagem da matéria orgânica e presença de grupos microbianos associados ao ciclo do N no solo, como as *Proteobacterias* (FONSECA et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).

2.2. Interação entre plantas florestais e a comunidade de fungos

O solo é considerado um dos principais habitats de micro-organismos, cerca de 80% a 90% dos processos que ocorrem no solo são reações mediados por esses organismos (NANNIPIERI et al., 2003). Mudanças no uso do solo podem provocar alterações na comunidade microbiana (ABOIM et al., 2008; PEIXOTO et al., 2006; RACHID et al., 2012, 2013) e influenciar os ciclos biogeoquímicos dos nutrientes e a produtividade dos sistemas (ALEF et al., 1995; VAN DER HEIJDEN et al., 2008).

A comunidade microbiana do solo é constituída por representantes dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (LAMBAIS et al., 2005). Dentre os micro-organismos que compõem a biomassa microbiana (BM) do solo, os fungos são considerados um dos grupos funcionais de grande importância neste ambiente (TEDERSOO et al., 2014). Pertencentes ao domínio *Eukarya*, eles são organismos unicelulares ou filamentosos (MOREIRA et al., 2006), cosmopolitas, com estimativa de uma diversidade fúngica global estimada entre 0,8 a 5,1 milhões de espécies (BLACKWELL, 2011; TEDERSOO et al., 2014).

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). Dentre as interações benéficas destacam-se as micorrízicas, uma

associação simbiótica mutualística que ocorre entre determinados fungos do solo e a maioria das espécies de plantas terrestres (SMITH et al., 2008). Dois tipos de associações micorrízicas são mais estudadas: a formação de micorrizas arbusculares (MA) e de ectomicorrizas (ECM), devido ao seu papel vital para a sustentabilidade da agricultura e seu potencial biotecnológico (BERBARA et al., 2006).

A MA é uma simbiose entre fungos do filo *Glomeromycota* e o sistema radicular das plantas, ocorrendo em mais de 80% das plantas terrestres (MOREIRA-SOUZA et al, 200; CARDOSO et al., 2010). Nessa relação, a planta supre o fungo com cerca de 10% dos fotossintatos produzidos e, em troca, as plantas são beneficiadas por meio da melhoria em seu estado nutricional, especialmente em solos onde os teores de nutrientes são baixos. O efeito da MA sobre o crescimento das plantas é extremamente significativo com relação à absorção de nutrientes de baixa mobilidade no solo, como o fósforo, o qual se move lentamente no solo por difusão (CARDOSO et al., 2010).

As MA não produzem alterações morfológicas visíveis nas raízes do hospedeiro e para que seja possível a visualização das estruturas fúngicas é necessário o processo de coloração e observação ao microscópio. As MA possuem componentes característicos em sua estrutura, tais a presença de vesículas, arbúsculos, hifas, micélios extra radiculares e os esporos nas raízes que estão presentes (SIQUEIRA et al., 1994; CARDOSO et al., 2010). As vesículas são consideradas estruturas de armazenamento dos fungos e podem ser formadas dentro ou fora das células do córtex. Os arbúsculos são formados pela intensa ramificação de hifas intracelulares e são responsáveis pela troca de nutrientes/metabólitos entre os simbiontes. As hifas intra e extra-radiculares são importantes como propágulos para iniciar nova colonização, para gerar novos esporos, para aquisição de nutrientes e ainda podem favorecer a agregação do solo (SIQUEIRA et al., 1994; CARDOSO et al., 2010).

De forma similar aos FMA, os fungos ectomicorrízicos (ECM), geralmente pertencentes aos filos *Basidiomycota* e/ou *Ascomycota*, também são simbiontes radiculares, porém não obrigatórios (TIBBETT et al., 2002; PERSSON et al., 2003; BANDOUD et al., 2006; SMITH et al., 2008). Nesta simbiose, a planta fornece compostos orgânicos necessários à sua sobrevivência (SMITH et al., 1997) e, em troca, os fungos promovem a mineralização de formas orgânicas dos nutrientes e solubilizam minerais por meio da produção de ácidos orgânicos, tornando esses elementos mais disponíveis para as plantas (CARDOSO et al., 2017; COSTA et al, 2003).

A ectomicorriza é caracterizada pela presença de estruturas externas ao sistema radicular que são compostos por hifas e rizomorfos, os quais são essenciais para conexão com o solo e a formação de corpos de frutificação dos ECM (SMITH et al., 1997), do manto constituído pelo “tecido” fúngico que cobre a estrutura radicular e das hifas que penetram entre as paredes celulares das células da epiderme e do córtex (apoplasto), formando a rede de *Hartig*. A caracterização das ECM é de importância em estudos de avaliação e descrição de populações. Dentre as características morfológicas macroscópicas caracterizam-se a cor, a forma das hifas e as dimensões das ECM. Por outro lado, para as características microscópicas, destacam-se a profundidade e a organização das células no manto fúngico, a presença de rizomorfos, além da profundidade da rede de *Hartig* (KASUYA et al., 2010).

Ambos os gêneros de plantas, *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, 2012; PEREIRA, 2014). Satter et al. (2007) demonstraram que a formação de MA em *A. mangium* melhorou o crescimento da planta, assim como a qualidade nutricional das folhas no que diz respeito ao N e P. Além das micorrizas, outros fungos interagem diretamente com o sistema radicular das plantas, em uma região conhecida por rizosfera. A rizosfera é a região do solo que sofre influência direta das raízes e que tem constituição microbiana diferenciada do solo distante das raízes (CARDOSO et al., 1992; HARTMANN et al., 2008; BAKKER et al., 2013). O contraste biológico entre a rizosfera e o solo é marcante, o que pode ser avaliado pela relação entre a densidade de micro-organismos entre esses dois ambientes. Assim, a presença de duas árvores diferentes, cultivadas em um mesmo estande, pode influenciar de forma distinta a comunidade de fungos presente no solo.

Em solos com plantios consorciados de *E. urograndis* e *A. mangium*, foram classificados, por meio de pirosequenciamento, mais de 260 gêneros de fungos. Os filos foram totalmente distintos entre os tratamentos *Eucalyptus* e *Acacia*. Porém, o consórcio entre as espécies vegetais, quando comparado com as monoculturas, não foi divergente, apresentando uma abundância relativa intermediária de filos. *Basidiomycota* e *Ascomycota* foram os filos predominantes em *Eucalyptus* (75 %) e *Acacia* (62 %), respectivamente. Neste estudo, 4 gêneros foram relacionados com *Eucalyptus*, sendo os principais o *Pisolithus* (55,1 %) e *Scleroderma* (17 %), ao passo que no tratamento com plantas de *Acacia*, treze gêneros foram associados, destacando-se *Thelephoraceae* (13,2 %) e *Giberella* (2,6 %) (RACHID, 2013). Na avaliação citada, não foram detectados FMA, estando presentes no solo pouco menos de 0,1 % de organismos pertencentes ao filo *Glomeromycota* (RACHID, 2013).

2.3. Atributos físicos, químicos e biológicos como indicadores da qualidade do solo

Segundo Doran et al. (1994), a qualidade dos atributos físicos e químicos do solo propiciam condições adequadas para o crescimento e o desenvolvimento das plantas e para a manutenção da diversidade de organismos que habitam o solo. Assim, qualquer modificação no solo pode alterar diretamente sua estrutura e sua atividade biológica e, conseqüentemente, sua fertilidade, com reflexos na qualidade ambiental e produtividade das culturas (BROOKES, 1995).

Além dos componentes físicos e químicos do solo, a manutenção da estabilidade do componente biológico é de primordial importância para a saúde do solo (CARDOSO et al., 2013). A biomassa microbiana (BM), ou a parte viva da MO, incluindo bactérias e fungos, exerce diversas funções essenciais para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas terrestres e contém, em média, de 2 a 5% do C orgânico (Jenkinson e Ladd, 1981) e de 1 a 5% do N total do solo (Smith e Paul, 1990). Nesse sentido, os fungos representam em média $\frac{2}{3}$ da biomassa microbiana e converte cerca de 44% do C prontamente decomponível a tecidos microbianos (MOREIRA et al., 2002).

Os fungos apresentam, quando comparados às bactérias, menor abundância de células no solo (DIONÍSIO, 1996). Porém, devido ao elevado comprimento e diâmetro das hifas, podem contribuir com uma maior BM (BRANDÃO, 1992). Os micélios fúngicos representam uma importante parte da MO em solo florestal (BALDRIAN et al., 2013, SOUDZILOVSKAIA et al., 2015). As estimativas da biomassa micelial para ECM, que representam a maior parte da BM do solo em florestas, geralmente variam de 100 a 600 kg ha⁻¹ (WALLANDER et al., 2004; CAIRNEY, 2012; HENDRICKS et al., 2016). Em uma revisão de Ekblad et al. (2013), foi mostrado que a produção anual de micélios fúngicos em florestas de *Picea abies*, na camada 0-10 cm do solo, variou entre 100 e 300 kg ha⁻¹ ano⁻¹. Wallander et al. (2004) também observaram quantidades significativas de biomassa de ECM, sendo 406, 488 e 125 kg ha⁻¹, nas camadas de 20-30, 30-50 e 50-70 cm profundidade do solo, respectivamente.

O conjunto de funções dos micro-organismos do solo pode ser chamado de atividade microbiana e esta pode ser medida por meio da quantificação da BM, do carbono da biomassa microbiana (Cmic), da respiração basal do solo (RBS) e da atividade enzimática. Por meio desses dados, alguns quocientes podem ser obtidos, como o quociente metabólico (qCO_2), que indica o nível de estresse e/ou atividade da biomassa; e o quociente microbiano ($qMIC$), que expressa o quanto do CO do solo está imobilizado na BM (CARDOSO et al., 2013).

2.4. Técnicas moleculares para avaliação da comunidade fúngica no solo

As técnicas de biologia molecular permitiu o emprego de análises genéticas nos estudos da composição e estrutura das comunidades de micro-organismos do solo. Com isso, foi possível, por exemplo, estudar aspectos da relação entre as leguminosas e seus simbioses fixadores de nitrogênio, da interação entre patógenos do solo e seus hospedeiros e até da manipulação genética de micro-organismos para que atuem de acordo com o interesse humano, quer seja como simbioses de plantas, agentes de controle biológico de pragas e doenças, ou como condicionadores dos solos para o cultivo agrícola (LAMBAIS et al., 2005).

O desenvolvimento e a adaptação de técnicas da biologia molecular, como as baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), para a pesquisa com fungos tem permitido sua identificação de forma independente da morfologia, e também de forma independente de cultivo, levando a um maior conhecimento dos organismos constituintes deste grupo (AVIO et al., 2009).

Existem diversas metodologias para estudo da comunidade microbiana no ambiente, sendo o ponto de partida a extração do DNA e/ou RNA total diretamente das amostras ambientais. A técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP), uma tradicional metodologia de *Fingerprint*, é geralmente utilizada para análises da estrutura das comunidades microbianas (LIU et al., 1997) e tem sido aplicada no estudo da comunidade de fungos no solo (MENDES, 2009; GUMIERE et al., 2016). A técnica utiliza *primers* (iniciadores) marcados com fluoróforos, o que possibilita o uso de um sequenciador automático de DNA, e resultando em tamanhos específicos dos fragmentos terminais de restrição.

Outra metodologia amplamente difundida é o PCR quantitativo (*qPCR*) (WEIS et al., 1992), na qual os genes alvos estudados são amplificados e quantificados ao mesmo tempo, obtendo-se ao final valores de número de cópias do gene por grama de solo amostrado em cada ambiente. Uma revisão sobre estas ferramentas e sua aplicação para a análise da diversidade de comunidades microbianas foi publicada por Andreote et al. (2009).

3. HIPÓTESES

As árvores florestais selecionam grupos fúngicos para formar a sua microbiota e esta é diferente entre as plantas da mesma espécie, dependendo das características do solo (física e química) e, principalmente, do sistema de plantio adotado (monocultivo ou consórcio). Além disso, há uma correlação entre os atributos químicos e a comunidade de fungos micorrízicos nas raízes, de forma que quanto maior a concentração de nutrientes, menor as taxas de colonização. Além disso, com o aumento da profundidade, a abundância de fungos é reduzida no solo, na rizosfera e nas raízes.

4. OBJETIVOS

Avaliar a comunidade de fungos do solo, da rizosfera e do sistema radicular de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* plantados em monocultivos e em consórcio, e correlacionar com os atributos físicos, químicos e biológicos do solo.

4.1. Objetivos específicos

- Caracterizar os atributos físicos e biológicos do solo;
- Caracterizar os atributos químicos do solo, da rizosfera e das raízes;
- Determinar as taxas de colonização radicular por FMA e ECM;
- Avaliar a morfologia de MA;
- Quantificar o número de esporos de FMA no solo;
- Identificar as estruturas das ECM por meio da anatomia;
- Quantificar a abundância de fungos do solo e da rizosfera por *q*PCR;
- Avaliar a estrutura da comunidade de fungos do solo e da rizosfera por T-RFLP;
- Correlacionar os fatores avaliados.

5. METODOLOGIA

5.1. Área de coleta

As amostras foram coletadas na Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga (EECFI), localizada na cidade de Itatinga-SP (23°03'10"S - 48°37'50"W), a 857 metros de altitude em relação ao nível do mar. O uso da área nos últimos 30 anos se restringiu a sucessivas rotações de *E. grandis*. O local possui relevo plano a suave ondulado, típico do platô do Oeste paulista. O solo foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, tipicamente distrófico, de textura médio-arenosa (EMBRAPA, 2013) e a vegetação natural como Cerrado *stricto sensu*. O clima da região é Cfa (clima subtropical húmido com verão quente), segundo a classificação de Köppen-Geiger (LACLAU et al., 2008), com precipitação anual de 1.272 mm, temperatura média de 20°C e umidade relativa média de 86% no primeiro semestre de 2016 (Figura1).

Figura 1. Valores de Precipitação mensal (mm), Temperatura (°C) e Umidade Relativa (%) durante os meses de Janeiro a Junho na área experimental da EECFI, 2016.

5.2. Delineamento experimental

O experimento foi instalado seguindo o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), com dez tratamentos (T) e quatro repetições (B). Cada tratamento está instalado em

uma área de 36 m² (parcela), contendo 144 árvores dispostas em 12 linhas. Nos tratamentos referentes aos plantios consorciados, as plantas estão dispostas em duas linhas de *A. mangium* seguidas por duas linhas de *E. grandis*, na proporção 1:1 (Figura 2). Para este trabalho, foram selecionados três blocos e três tratamentos, sendo:

T1: monocultivo de eucalipto (E); T2: monocultivo de acácia (A); T3: consórcio de eucalipto (CE) e acácia (CA).

Figura 2. Desenho indicando a distribuição dos tratamentos (T) entre os blocos (B) na área experimental. As coletas foram realizadas nas áreas que estão em negrito: B2, B3 e B4, e nos tratamentos T1 (monocultivo de *Eucalyptus grandis*), T2 (monocultivo de *Acacia mangium*) e T3 (consórcio de *E. grandis* e *A. mangium*).

5.3. Coleta das amostras

As coletas foram realizadas durante os meses de março, abril e maio de 2016, quando as árvores estavam com dois anos de implantação. Foram construídas trincheiras na base das árvores centrais de cada parcela, sendo coletadas amostras de solo, de rizosfera e de raízes.

Nas parcelas com plantio consorciado, foram abertas duas trincheiras, uma entre as árvores de eucalipto e a outra entre as árvores de acácia. As trincheiras apresentavam tamanho de 1,5 x 0,75 m e 1,0 m de profundidade e as amostras foram coletadas nas camadas de 0-10, 10-20, 20-50 e 50-100 cm (Figura 3).

Figura 3. Esquema de coleta nos monocultivos de *E. grandis* e *A. mangium* (A) nos consórcios de *E. grandis* e *A. mangium* (B).

5.4. Determinação dos atributos físicos e químicos

As amostras de *bulk soil* (solo) e do solo rizosférico (rizosfera) foram secas ao ar e peneiradas (2 mm), sendo determinados o potencial de hidrogeniônico (pH), acidez potencial (H+Al), alumínio (Al), potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg), nitrogênio (N), amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-), carbono orgânico total (COT), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), a soma de bases (SB), a saturação por bases (V%), capacidade de troca catiônica (CTC) e saturação por alumínio (m%) de acordo com as metodologias

propostas por Raij (1987). A determinação da textura (areia total, silte e argila) foi realizada conforme metodologia proposta pela Embrapa (1997).

Para a determinação da densidade do solo (DS) foram coletadas amostras indeformadas com auxílio do anel de Kopeck, com capacidade interna de 10 cm³, sendo calculada por meio da relação entre massa de solo seco e o volume da amostra (EMBRAPA, 1997). A umidade (%) foi calculada segundo a equação: massa do solo úmido – massa do solo seco / massa do solo seco x 100 (EMBRAPA, 1997).

As amostras de raízes foram lavadas em água corrente, para retirada das partículas de solo aderidas, sendo secadas a 60°C em estufa com circulação forçada de ar até obter peso constantes, e posteriormente moídas em moinhos tipo Willey para uma maior homogeneização das amostras. A determinação dos elementos P, K, Ca, Mg, enxofre (S), Cu, Fe, Mn e Zn no tecido vegetal foi realizada por meio da solubilização com ácidos nítrico e perclórico, sendo os teores quantificados por meio da espectrofotometria ótica (P), da espectrofotometria por absorção atômica (K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn) e da solubilização sulfúrica (N), onde os teores foram, neste último caso, quantificados pelo método de Kjeldahl (MALAVOLTA et al. 1997).

5.5. Determinação dos atributos biológicos do solo

O método da fumigação-extração foi utilizado para estimar o carbono da biomassa microbiana (Cmic) (VANCE et al., 1987). Nesse método, o carbono liberado pela morte dos micro-organismos pelo clorofórmio foi determinado por extração em solução de K₂SO₄, oxidação e digestão química, seguidas de titulação.

A respiração basal do solo (RBS) foi determinada a partir da incubação de 100 g de solo, em frascos de vidro, contendo potes com 10 mL de NaOH (1,0 mol L⁻¹) em sala escura e climatizada a 28 °C. Os frascos de vidro foram hermeticamente fechados e o C liberado na forma de C-CO₂ foi quantificado por titulação do NaOH a cada 7 dias por um período de 30 dias. A titulação do NaOH remanescente foi realizada com solução de HCl (0,5 mol L⁻¹), usando fenolftaleína como indicador e precipitação prévia do carbonato pela adição de BaCl₂ (4 mol L⁻¹) (ANDERSON, 1982; ALEF et al., 1995).

A partir da razão entre a RBS e Cmic foi obtido o quociente metabólico (*q*CO₂), índice que expressa a quantidade de C-CO₂ produzido por unidade de C da BM (ANDERSON et al.,

1993). O quociente microbiano ($qMIC$), calculado pela razão entre C_{mic} e o COT, foi estimado de acordo com Sparling (1992).

5.6. Avaliação da comunidade de fungos

5.6.1. Fungos micorrízicos arbusculares

Para avaliação da colonização radicular por FMA foram selecionadas raízes finas (< 2 mm de diâmetro), as quais foram lavadas em água corrente e imersas em solução de KOH (10%) por 24 horas em temperatura ambiente, para serem diafanizadas. Após esse período, os segmentos foram imersos em nova solução de KOH (10%), permanecendo em água a 90°C por cerca de 30 minutos. Em seguida, com as raízes ainda quentes, foi adicionado peróxido de hidrogênio H_2O_2 (10%) para branquear totalmente os segmentos (KOSKE et al., 1989). Os segmentos foram lavados em água corrente e receberam uma solução de coloração com tinta azul (Paker Quink®) e ácido acético (5%) (40ml:1L) em água a 90°C por 15 segundos (VIERHEILIG et al., 1998). As raízes foram novamente lavadas em água corrente e conservadas em solução de lactoglicerol (1:1:1 ácido láctico, glicerol e água) a temperatura ambiente.

A avaliação da porcentagem de colonização micorrízica foi realizada por meio do método da placa quadriculada (GIOVANNETTI et al., 1980). Neste método, foram considerados positivos os segmentos de raízes que apresentavam estruturas típicas de MA, como esporos, vesículas, hifas e arbúsculos. Além disso, para cada amostra de raiz, foram montadas cinco lâminas de microscopia, cada uma com dez segmentos selecionados aleatoriamente, onde foram observadas em microscópio óptico para identificação das estruturas características da colonização e fotografadas com auxílio do programa Motic Images Plus 2.0.

5.6.2. Extração de esporos de FMA no solo

Os esporos foram extraídos de 50 g de solo, por meio da técnica do peneiramento úmido (GERDEMAM et al., 1963), seguido por centrifugação em solução de sacarose (70%) (JENKINS, 1964). Nesse procedimento, foram utilizadas duas peneiras sobrepostas de malha 0,71 e 0,045 mm para reter os esporos. Ao final, os esporos foram lavados em água corrente

para a retirada do excesso de sacarose, transferidos para tubo falcon (15 mL) e armazenados a -20°C até o momento da avaliação.

Para a quantificação, todo o material do tubo foi transferido para uma placa canelada. Os esporos foram observados com o auxílio de microscópio estereoscópico (40x) e apenas esporos que resistiam ao toque da agulha histológica foram contados (NOVAIS, 2010). Após a observação, alguns esporos foram fixados em lâminas semipermanentes com resina de álcool polivinílico e glicerol (1:1) e identificados com base na informação contida no site da Coleção Internacional de Fungos Arbusculares e Vesiculares de Micorrizas (INVAM), disponível em <http://invam.wvu.edu> (MORTON et al., 1993), sendo posteriormente fotografados por meio do programa Motic Images Plus 2.0.

5.6.3. Fungos ectomicorrízicos

Para a avaliação da colonização por ECM, as raízes foram separadas do solo e lavadas em água corrente, em seguida, cortadas em segmentos de aproximadamente 2 cm. O percentual de colonização radicular foi determinado pelo método de intersecção em placa com fundo quadriculado, através do microscópio estereoscópico com aumento de 40x (BRUNDRETT et al., 1996). Nesse método, foram avaliados 100 segmentos de raízes de cada amostra, que fizerem intersecção com as linhas verticais e horizontais, registrando-se o número de segmentos colonizados conforme descrito por Giovanetti et al (1980), modificada por Brundrett et al. (1996). As raízes foram consideradas colonizadas quando apresentaram radículas com ramificações modificadas, normalmente emaranhadas por hifas, as quais, na maioria das vezes, apresentam coloração característica do fungo simbionte formando o manto fúngico (CAMPOS, 2011), sendo a porcentagem de colonização (%) calculada (número de seguimentos de raízes colonizadas $\times$ 100 / total de seguimentos de raízes analisados) segundo Danielsen et al. (2013).

5.6.4. Análise estrutural de ECM

Amostras teciduais de ECM e de raízes sem aparente colonização fúngica, presentes nos diferentes tratamentos e na profundidade de 0-10 cm do solo foram fixadas em solução Karnovsky (1965). Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação em série alcoólica-etífica em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 e 100% v v⁻¹),

seguido pela inclusão em resina de hidróxietil metacrilato (Historesin, Leica®, Heidelberg, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Secções transversais a 5 µm de espessura foram realizadas nos blocos contendo as amostras radiculares empregando navalhas de aço do tipo C acopladas a micrótomo rotativo manual.

Para a detecção das estruturas de ECM (manto fúngico, rede de *Hartig* e hifas) os cortes obtidos foram corados com solução de azul de algodão (0,05 %) em lactofenol conforme a técnica descrita por Marques et al. (2013), modificada pela ausência do reagente safranina O e montados em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®). Como resultado, a quitina, a celulose e os elementos da parede celular dos fungos foram corados em azul, exceto para os fungos que apresentaram coloração escura nas hifas devido a presença de melanina. As estruturas de ECM foram identificadas conforme descrito na literatura (INGLEBY et al., 1990; AGERER, 1987-1993; GOODMAN et al., 1996-1998).

As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio óptico (OLYMPUS BX40) e em estereomicroscópio Micronal, sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera Motic® Images Plus 2.0.

5.6.5. Extração de DNA genômico

O DNA das amostras de solo e rizosfera foi extraído com o kit comercial PowerSoil® DNA Isolation (MoBio, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, exceto pela quantidade de material que foi modificada para 0,4 g e pela etapa de lise que foi modificada com a utilização do equipamento Bead Ruptor 12 (Omni International) em frequência média por 60 segundos.

O resultado das extrações foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x, onde foram aplicados 5 µl do produto de DNA, acrescido de 1 µl da mistura do tampão de corrida Loading buffer 6x (Sinapse) com o GelRed (Biotium, EUA) para cada amostra. Como padrão molecular foi utilizado 3 µl de 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80V por aproximadamente 35 minutos e foto documentado sob luz ultravioleta.

5.6.6. Análise de T-RFLP: amplificação e purificação dos fragmentos de DNA

O DNA das amostras foi submetido à amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) da região ITS (*Internal Transcribed Sequences*), utilizando os *primers* ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') (GARDES et al., 1993), marcado com a fluorescência FAM (RANJARD et al., 2001; MOESENEDER et al., 2001) e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATC3') (WHITE et al., 1990). As reações de PCR foram realizadas com o Kit Sinapse Inc, exceto a *Taq* utilizada na reação de amplificação de fungos do solo (Tabela 1).

Tabela 1. Produtos e concentrações utilizados em uma reação de 50 µl para amplificação (PCR) da região ITS nas amostras de solo e rizosfera

	Concentração estoque	Solo (µl)	Rizosfera (µl)
MilliQ		31,35	32,60
DNA	100x	1,0	1,0
BSA	10mg/µl	1,25	-
PCR buffer	10X	5,00	5,00
MgCl ₂	25,0 mM	6,00	6,00
dNTP's	2,5 mM	4,00	4,00
Primer forward	100,0 pmol/µl	0,20	0,20
Primer reverse	100,0 pmol/µl	0,20	0,20
Taq polymerase	5,0 U/µl	0,50	0,50

(Platinum Taq - Invitrogen)

O volume final de cada reação por amostra foi de 50 µl. As condições de termociclagem foram: 94°C por 1 min e 30 s; 13 ciclos de 94°C por 35 s; 55°C por 55 s; 72°C por 45 s; 13 ciclos de 94°C por 35 s; 55°C por 2 min; 72°C por 45 s; 9 ciclos de 94°C por 35 s; 55°C por 3 min; 72°C por 45 s e uma extensão final a 72°C por 10 min (GARDES et al., 1993). O resultado das amplificações foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%.

Os produtos de PCR foram purificados com isopropanol (200 µl por amostra), seguido de incubação por 2 horas à temperatura ambiente e centrifugação (4.500 rpm por 1 hora e 30 min). O sobrenadante foi descartado e a placa foi seca naturalmente (invertida sobre um papel toalha) por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 250 µl de etanol absoluto, sendo as amostras centrifugadas (4.500 rpm por 1 hora e 30 minutos) e o sobrenadante descartado. A placa foi seca naturalmente por 15 minutos e o produto purificado foi ressuspendido em 50 µl de água esterilizada e visualizado em gel de agarose 1,5%.

Após a purificação, as amostras foram submetidas a uma reação de restrição utilizando as endonucleases *HaeIII*, gerando fragmentos terminais de restrição (T-RFs). Após a reação de restrição, as amostras foram precipitadas (com água) e então levadas ao sequenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Os arquivos gerados foram analisados previamente no programa Genemapper v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) para a avaliação da qualidade as corridas no sequenciador e uma matriz foi exportada para o programa Excel (Microsoft), onde as planilhas de dados foram organizadas para as análises estatísticas pertinentes.

5.6.7. Quantificação dos fungos *q*PCR

As reações foram realizadas no StepOne, utilizando o sistema SYBR Select Master Mix. Todas as reações foram realizadas em volume de 25 µL, contendo do kit SYBR® Select Master Mix, e os primers ITS1f (5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3') e 5.8S (5' CGCTGCGTTCTTCATCG 3').

As amplificações foram realizadas com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de amplificação 95°C por 30s, 53°C por 30s e 72 °C por 1 min, sendo realizada uma extensão final de 72°C por 45s (FIERER et al., 2005; RASCHE et al., 2010). Em todas as reações, uma curva de desnaturação foi realizada no final, com temperatura variando entre 72°C a 96°C para verificar a especificidade da amplificação. Para a quantificação, curvas padrões foram obtidas, realizando amplificações com o número de cópias conhecidos do DNA molde adicionado nas reações. Desta maneira, os dados da amplificação do DNA extraído das amostras de solo e de rizosfera foram interpolados na curva padrão para determinar o número de cópias do gene de interesse por grama de solo.

5.7. Análise estatística

Os dados foram analisados nos programas estatísticos PAST 2.14 (Copyright Hammer and Harper 1999-2012), Canoco for Windows 4.51 (Copyright C 1997-2003 Biometris) e R 2.15.1, por meio do pacote *Agricolae* (Copyright C 2012 The R Foundation for Statistical Computing).

As variações na estrutura da comunidade de fungos foram avaliadas por meio de Análises de Coordenadas Principais (PCoA), que preserva qualquer distância relativa entre os

dados amostrados; Análise de redundância (RDA), que usa regressão múltipla para a correlação de dados microbiológicos com dados ambientais (químicos, físicos e biológicos); Análise de Similaridade (ANOSIM), que é um método não paramétrico (baseado em randomização) de análise multivariada. Na análise de ANOSIM, 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. Foi realizado a Análise de variância (ANOVA) e a comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey a um nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Atributos físicos do solo

O solo apresentou textura média-arenosa (EMBRAPA, 2006) em todos os tratamentos. Os teores de silte e areia foram maiores nas camadas superficiais do solo (0-10 cm), enquanto que o teor de argila foi menor nessa mesma camada (Anexo A).

Solo médio arenoso possui textura leve, composto principalmente por areia (>70%), apresenta poros, pelos quais a água e o ar circulam com relativa facilidade. Nesses solos, geralmente o escoamento de água é rápido e com isso, a água pode levar consideráveis quantidades de nutrientes minerais, contribuindo para um solo pobre em nutrientes (REINERT et al., 2006). Segundo Azevedo et al. (2006), a textura do solo influencia o fluxo da água e também o comportamento dos elementos químicos. Gonçalves et al. (2000) afirmam que em solos arenosos os níveis de N, P, K, Ca, Mg, S, Z, Cu e B são baixos ou muito baixos, indicando que a qualidade física do solo afeta diretamente a qualidade química (CARDOSO et al. 2010).

Plantas e micro-organismos se desenvolvem com mais dificuldade em solos arenosos (ROCHA et al., 2015). Porém estes mesmos autores observaram relação entre a recuperação da estrutura do solo e o desenvolvimento e crescimento do sistema radicular do *Eucalyptus* sp, assim como da atividade dos organismos. Especialmente neste tipo de solo, a ação do micélio de fungo é importante para manter os macroagregados unidos, possibilitando sua imobilização e posterior ligação das partículas intermediada por componentes orgânicos (READ, 1989; FORSTER et al., 1981).

De acordo com Zonta et al. (2006), as mucilagens exsudadas pelas raízes, fungos e bactérias edáficos envolvem as partículas do solo atuando como agentes cimentantes, promovendo a estruturação e aumento da estabilidade dos agregados (ROZANE et al., 2010; ZINN et al., 2011; BRANDÃO et al., 2012). Um dos exemplos desses compostos é a glomalina, uma glicoproteína produzida por FMA que tem sido associada à formação e estabilização de agregados do solo e à dinâmica no estoque de C no solo (VASCONCELLOS et al., 2016).

Os valores de DS variaram de 0,91 a 1,52 g cm⁻³, ficando abaixo dos valores considerados restritivos ao crescimento radicular para solo médio arenoso em culturas agrícolas conforme Reichert et al. (2003), que é de 1,70 a 1,80 g m⁻³. No entanto, em todos os tratamentos, houve menores valores de DS nas camadas superficiais (0-10 cm), não havendo diferenças entre os tratamentos da mesma camada ($p < 0,05$) (Figura 4).

Figura 4. Distribuição dos valores médios da densidade do solo entre os tratamentos monocultivos de *Eucalyptus grandis* (E) e *Acacia mangium* (A) e consórcios de *E. grandis* (CE) e *A. mangium* (CA), nas profundidades de 0-10 cm (a), 10-20 cm (b), 20-50 cm (c) e 50-100 cm (d).

Os resultados das camadas mais profundas (10-100 cm) foram semelhantes aos verificados por Rocha et al (2015) em plantações de *E. grandis* nas profundidades de 10-20; 20-30 e 30-40 cm, com valores médios de 1,44, 1,48 e 1,51 g cm⁻³, respectivamente e por Rigatto et al. (2005) na camada de 0-10 cm, com valores médios entre 0,94 e 1,4 Mg m⁻³ em florestas de *Pinus taeda*. Nesses trabalhos, os autores também observaram menor densidade nas camadas superficiais (0-10 cm) em relação as camadas mais profundas, abaixo de 10 cm do solo.

As menores densidades nas camadas superficiais, observada em nosso trabalho, podem estar relacionadas com a cobertura vegetal encontrada nas áreas (Anexo B) (VEZZANI et al., 2009). Miranda (2005) verificou que solo com cultivos florestais possuem alto conteúdo de matéria orgânica (MO), devido à maior deposição de serapilheira. Rocha et al. (2015) observaram correlação positiva entre o aumento da matéria orgânica e a menor densidade do solo nas áreas com *E. grandis*.

O acúmulo de MO geralmente está associado a uma melhora das condições físicas do solo (CARPENEDO et al., 1990; CAMPOS et al., 1995; ARVIDSSON, 1998), especialmente pelos benefícios que esta pode trazer à sua estrutura (BAUMGARTL et al., 1991). Segundo Laurindo et al. (2009), a MO age na floculação do solo, proporcionando maior macroporosidade e, por isso, diminui a relação massa volume, causando a redução da DS.

O solo apresentou valores de umidade maiores nas camadas superficiais, que variaram de 11,29 a 17,05 %, e menores nas camadas mais profundas, que variaram de 9,45 a 12,10 % (Figura 5). Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos quando comparadas as mesmas camadas ($p < 0,05$). Souza (2016) encontrou em áreas de *E. grandis*, nas profundidades de 0-20, 20-40 e 40-60 cm, valores de umidade de 12,68, 10,16 e 15,14% respectivamente.

Figura 5. Distribuição da umidade do solo entre os tratamentos monocultivos de *Eucalyptus grandis* (E) e *Acacia mangium* (A) e consórcios de *E. grandis* (CE) e *A. mangium* (CA), nas profundidades de 0-10 cm (a), 10-20 cm (b), 20-50 cm (c) e 50-100 cm (d).

Assim como para DS, a umidade do solo pode ser influenciada pelo acúmulo de matéria orgânica. Braida et al., (2006) comprovaram essas relações em Nitossolos e Argissolos, onde verificaram aumento do teor de COT, redução da densidade e aumento da umidade. Comportamento similar também foi observado nos trabalhos de Silva et al. (1986), Aragón et al. (2000) e Ball et al. (2000).

A umidade é um dos fatores que afetam a ocorrência e distribuição dos micro-organismos no solo (ZANG et al., 2013). Eggleton (1934) mostraram que os fungos se desenvolvem melhor em solos de alta umidade. Assim como Wilkins et al. (1940) e Wilkins et al. (1946), que verificaram correlação positiva entre a produção de corpo de frutificação de basidiomicetos com a umidade do solo. Burke et al. (2009) também constataram correlação positiva entre a abundância fungos em raízes de plantas florestais o teor de umidade do solo.

6.2. Atributos químicos do solo, da rizosfera e das raízes

Foram encontradas maiores concentrações de nutrientes na camada superficial do solo (0-10 cm), ao contrário do pH e do m%, que apresentaram menores valores em superfície (Tabela 2). Atributos como S, Ca, K, Mg e Mn não puderam ser detectados, devido aos seus baixos teores, nas camadas abaixo de 10 cm do solo. Os tratamentos apresentaram valores de V menores que 15% na profundidade de 0 a 50 cm e 0% na camada de 50-100 cm, em todos os tratamentos. As camadas de 10 a 20 cm apresentaram baixos valores de SB em relação a camada de 0-10 cm de todos os tratamentos e, alto valor de CTC na camada de 0-10 cm, também em todos os tratamentos avaliados.

Na camada 0-10 cm, houve maior concentração de COT, 30,23 g dm⁻³, em E ($p < 0,05$), ao passo que houve maior concentração de NH₄⁺ em CA e NO₃⁻ em A (Tabela 2). Já na camada 10-20 cm, houve diferenças significativas nos teores de NH₄⁺, H+Al e CTC, com valores maiores em A e CA (63 e 67 mg kg⁻¹), em CE (38 mmol_c dm⁻³) e em A (39,77 mmol_c dm⁻³), respectivamente (Tabela 2). Não houve diferenças dos atributos químicos entre os tratamentos na camada de 20-50 cm, porém foi verificado diferenças no teor de NH₄⁺ na camada de 50-100, sendo o maior valor no tratamento A (57,67 mg kg⁻¹).

Neto et al., (2013) verificaram os estoques de serapilheira através de folhas, galhos e material reprodutivo de *E. urograndis* e *A. mangium* aos 3,5 e 4,5 anos após o plantio. Os resultados mostraram maior deposição da serapilheira nos plantios de eucalipto, com teores de 8,83 e 13,32 Mg ha⁻¹ em relação à acácia, que apresentou teores de 6,39 e 6,85 Mg ha⁻¹ nos respectivos anos. Sabe-se que a serapilheira das plantas é o principal responsável pela formação da MO do solo nos ecossistemas florestais (FREIXO et al., 2000). Balieiro et al., (2004) verificaram maior quantidade de serapilheira acumulada sobre o solo de povoamento de *E. grandis* (11,84 Mg ha⁻¹) quando comparado a plantios de *Pseudosamanea guachapele*. Os autores observaram que a elevada contribuição de material lenhoso na composição da

serapilheira do eucalipto aumentou o tempo médio de decomposição do material no solo, promovendo desta forma um maior acúmulo deste.

Contudo, o resultado encontrado pode ter sido devido a época de coleta ou ao próprio histórico da área e a idade de plantio, visto que resultados contrários a este foram reportados por Voigtlaender et al. (2012) em sistema de cultivo semelhante.

A maior parte do N do solo está ligada a MO e geralmente o teor total desse elemento é de 0,05 a 0,5% nesse compartimento, sendo que aproximadamente 5% do N se apresenta na forma inorgânica como NH_4^+ e NO_3^- (RACHID, 2013). Sabe-se que as raízes *A. mangium* se associam a bactérias fixadoras de N_2 , sendo esse o principal fator que contribui para maior acúmulo de N nos tecidos das plantas deste gênero. A deposição do material vegetal no solo, por essas plantas, pode ter favorecido os maiores teores de NH_4^+ e NO_3^- encontrados nos tratamentos A e CA no presente trabalho.

Na rizosfera, na camada de 0 a 10 cm, foram verificadas diferenças entre os tratamentos nos teores de NO_3^- , sendo este maior em CA (7,4 mg kg^{-1}); de Mn, com maior teor no A (19,5 mg dm^{-3}) e Zn, sendo maior em E (1,7 mg dm^{-3}). Na camada 10-20 cm, houve diferença significativa nos teores de N, com maiores valores em A (572,6 mg kg^{-1}) e CA (519,4 mg kg^{-1}), NO_3^- e Mn, com teores maiores em CA (4,2 mg kg^{-1}) e A (1,9 mg dm^{-3}) respectivamente. Para a camada 20-50 cm, houve diferenças nos teores de COT, que apresentou maior valor em CA (13,5 g dm^{-3}), e no teor de Cu, sendo o tratamento A apresentou maior teor desse nutriente (1,2 mg dm^{-3}). Em 50-100 cm, o pH, N, NH_4^+ , V e Mn apresentaram diferenças significativas, sendo o pH (4,5) e o NH_4^+ (30 mg kg^{-1}) maiores em CA, o N (259 mg kg^{-1}) e o Mn (1,2 mg dm^{-3}) maiores nos tratamentos de A e CA respectivamente e o V, maior no tratamento A (11,6%) (Tabela 3) ($p < 0,05$).

Os teores da maioria dos nutrientes, na camada de 0-10 cm, foram maiores na rizosfera em relação ao solo (Tabelas 2 e 3). O COT foi maior na rizosfera independente da profundidade, com valores que variaram entre 63,6 a 7,7 g dm^{-3} , e para o solo entre 30,3 a 4,6 g dm^{-3} . Cordeiro et al. (2012) também verificaram maiores valores de COT em solo rizsférico em relação ao não rizsférico. Neste trabalho os teores de COT foram, em média, 21 % maiores na rizosfera.

Tabela 2. Teores dos atributos químicos do solo em monocultivos de *Eucalyptus grandis* (E) e *Acacia mangium* (A) e nos consórcio de *E. grandis* (CE) e *A. mangium* (CA) nas diferentes profundidades (cm)

Tratamento	pH	COT	P	S	N	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	Ca	K	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	m	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	CaCl ₂	g dm ⁻³	-mg dm ⁻³ -			-----mg kg ⁻¹ -----						-----mmolc dm ⁻³ -----			-----%-----			-----mg dm ⁻³ -----			
0-10 cm																					
E	3,73	30,23a	10,67	4,67	1365,00	28,33b	15,33b	8,00	0,70	5,67	13,67	144,33	10,37	154,70	6,67	57,67	0,43	1,33	144,67	4,13	1,13
A	3,93	26,16ab	5,67	4,00	1411,67	43,67ab	49,00a	4,67	0,40	7,00	10,67	109,00	12,07	121,07	11,33	42,33	0,24	0,70	113,67	6,77	1,27
CE	3,97	22,48ab	4,00	4,00	1094,33	14,33b	14,33b	4,00	0,23	6,67	11,00	102,33	9,90	112,23	9,33	53,00	0,54	0,73	84,00	2,07	0,33
CA	3,80	18,80b	4,33	4,33	1036,00	72,33a	34,00ab	4,00	0,30	5,67	15,67	126,33	9,30	135,63	6,67	63,67	0,24	0,50	169,00	1,53	0,40
10-20 cm																					
E	4,03	7,36	6,67	-	630,00	40,00b	20,33	-	-	-	8,00	25,33b	1,00	26,33b	4,33	88,67	0,34	0,87	49,00	-	0,37
A	4,27	9,88	3,67	-	774,67	67,00a	30,67	-	-	2,00	9,00	27,33ab	1,40	28,73ab	5,67	86,00	0,22	0,83	50,67	0,33	0,23
CE	4,17	8,91	2,67	-	800,33	23,67b	16,67	-	-	2,00	9,33	38,00a	1,77	39,77a	4,67	84,33	0,29	0,90	52,67	0,40	0,23
CA	4,13	8,91	4,00	-	588,00	63,00a	44,33	-	-	-	9,33	30,67ab	1,07	31,73ab	3,67	89,67	0,25	0,87	49,00	0,30	1,30
20-50 cm																					
E	4,10	6,40	5,00	-	560,33	27,33	12,00	-	-	-	6,00	24,67	0,70	25,37	3,33	88,33	0,63	0,87	38,67	-	0,17
A	4,23	8,14	2,33	-	606,67	50,67	21,33	-	-	-	7,33	23,67	0,67	24,33	3,00	91,33	0,19	0,83	36,33	-	0,25
CE	4,20	7,75	1,33	-	546,00	32,00	14,00	-	-	-	7,33	27,33	1,00	28,33	3,67	88,00	0,25	0,83	34,00	-	0,17
CA	4,17	7,95	2,00	-	560,00	47,00	32,00	-	-	-	7,00	24,33	0,03	24,37	0,00	99,33	0,19	0,87	35,00	-	0,10
50-100 cm																					
E	4,10	4,65	1,67	-	455,00	22,33b	15,33	-	-	-	4,67	18,67	0,00	18,67	0,00	100,00	0,40	0,80	17,33	-	0,17
A	4,27	5,81	1,33	-	450,33	57,67a	23,67	-	-	-	4,67	20,67	0,00	20,67	0,00	100,00	0,34	0,73	17,67	-	0,20
CE	4,20	5,81	1,00	-	786,33	28,33ab	8,33	-	-	-	5,33	23,00	0,00	23,00	0,00	100,00	0,20	0,70	17,33	-	0,10
CA	4,20	6,20	1,00	-	536,67	49,33ab	35,33	-	-	-	5,33	21,00	0,03	21,03	0,00	99,33	0,30	0,73	17,33	-	-

(-) Leitura abaixo do nível de detecção. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma camada (Tukey $p < 0,05$)

Tabela 3. Teores dos atributos químicos da rizosfera em monocultivos de *Eucalyptus grandis* (E) e *Acacia mangium* (A) e nos consórcio de *E. grandis* (CE) e *A. mangium* (CA) nas diferentes profundidades (cm)

Tratamento	pH	COT g dm ⁻³	P mg dm ⁻³	N -----mg kg ⁻¹ -----	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	Ca	K	Mg	H+AL	SB	CTC	V %	Cu -----mg dm ⁻³ -----	Fe	Mn	Zn
	CaCl ₂																
0-10 cm																	
E	3,6	63,6	7,2	2553,1	39,9	1,4 b	8,8	1,3	12,5	156,0	22,7	178,7	12,9	0,8	254,7	5,1 b	1,7 a
A	4,4	59,6	4,3	2691,3	94,0	4,4 ab	13,5	2,3	15,9	69,7	31,7	101,4	31,5	1,1	89,2	19,5 a	0,8 b
CE	4,1	54,5	5,5	2269,4	24,5	1,5 b	22,6	1,3	23,8	107,7	47,7	155,3	33,7	0,6	93,0	8,8 b	1,1 ab
CA	4,1	52,7	7,9	2258,2	65,5	7,4 a	31,0	1,7	20,8	71,3	53,5	124,8	46,3	0,8	149,1	8,9 b	1,0 ab
10-20 cm																	
E	3,9	15,1	2,6	309,4 c	13,3	1,9 b	1,4	0,6	2,6	44,3	4,6	48,9	9,1	1,1	55,7	0,8 b	8,2
A	4,2	14,9	6,1	572,6 a	35,8	2,3 ab	1,4	1,6	4,6	45,0	7,6	52,6	14,8	1,2	42,9	1,9 a	2,8
CE	3,9	15,2	5,1	390,6 b	9,1	0,6 b	1,9	0,8	7,4	55,3	10,1	65,4	15,0	1,0	44,6	1,0 ab	0,7
CA	4,1	15,7	4,6	519,4 a	30,1	4,2 a	2,8	1,0	5,3	55,7	9,1	64,7	13,9	1,1	50,2	1,3 ab	1,1
20-50 cm																	
E	3,9	9,5 ab	2,4	264,6	9,3	1,0	0,6	0,5	1,0	41,7	2,1	43,7	4,6	0,9 ab	30,6	0,4	0,7
A	4,3	9,1 b	2,8	406,5	28,6	0,7	4,8	1,8	3,0	36,7	9,6	46,3	18,5	1,2 a	26,9	1,2	1,1
CE	4,0	11,1 ab	3,3	183,4	6,5	1,3	0,1	0,8	1,8	46,3	2,8	49,1	5,6	0,8 b	26,0	0,5	0,5
CA	4,3	13,5 a	2,7	328,1	32,8	2,9	0,6	1,4	2,7	45,3	4,7	50,0	10,0	1,0 ab	28,7	1,2	0,8
50-100 cm																	
E	3,9 c	7,7	0,8	111,5 b	9,2 b	1,2	0,2	0,3	0,5	34,7	1,0	35,7	3,0 b	0,9	14,2	0,5 b	0,8
A	4,4 ab	8,7	3,5	259,0 a	24,2 ab	1,4	0,6	1,8	1,6	29,7	4,0	33,7	11,6 a	1,0	13,3	1,2 a	1,0
CE	3,9 bc	8,8	1,6	180,7 ab	9,7 b	4,1	0,0	0,8	0,8	37,7	1,6	39,3	4,2 ab	0,8	14,1	0,7 ab	0,4
CA	4,5 a	9,5	2,4	259,0 a	30,0 a	2,9	0,2	1,5	1,7	35,0	3,4	38,4	8,8 ab	0,8	12,6	1,2 a	0,6

Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma profundidade (Tukey p<0,05)

As raízes de *A. mangium* apresentaram maiores teores de nutrientes em relação às plantas de *E. grandis*, independente o sistema de cultivo (Tabela 4). Os teores de N foram maiores nas raízes de acácia em ambos os tratamentos (A e CA), em todas as profundidades avaliadas (Tabela 4). Na camada 0-10 cm, além do N, foi verificada diferenças nos teores de S e Cu, com maiores valores em CA (2,1 g kg⁻¹ e 14,2 mg kg⁻¹, respectivamente). Na camada 10-20 cm, houve diferenças nos teores de Ca, S e Cu, com maiores concentrações em CA (2,8 e 1,7 g kg⁻¹ e 10,6 mg kg⁻¹ respectivamente). Em 20-50 cm, as concentrações de Ca, Cu e Fe foram maiores em A (2,5 g kg⁻¹, 8,1 e 2998 mg kg⁻¹ respectivamente), enquanto que os teores de S foram maiores A (1,3 g kg⁻¹) e CA (1,7 g kg⁻¹). Na camada de 50-100 cm, os valores de S e Fe foram maiores em CA (1,8 g kg⁻¹ e 3301 mg kg⁻¹).

Tabela 4. Teores dos atributos químicos das raízes de *Eucalyptus grandis* (E) e *Acacia mangium* (A) em monocultivos e em consórcio (CE e CA respectivamente) nas diferentes profundidades (cm) do solo

Tratamento	P	N	Ca	K	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
-----g kg ⁻¹ -----						-----mg kg ⁻¹ -----				
0-10 cm										
E	0,4	3,1b	3,6	61	2,7	0,7c	4,6ab	1037	21	14
A	0,3	6,6a	4,0	42	2,0	1,5b	13,1ab	2010	32	17
CE	0,1	2,4b	4,6	65	3,4	0,6c	3,8b	1017	24	10
CA	0,4	6,8a	5,0	48	3,0	2,1a	14,2 ^a	2608	32	11
10-20 cm										
E	0,3	2,3b	1,5c	44	1,2	0,8bc	4,5c	1824	12	13
A	0,3	6,6a	2,6ab	56	1,2	1,4ab	8,5ab	2916	17	13
CE	0,3	2,1b	1,8b	60	1,7	0,6c	4,8bc	1345	18	11
CA	0,5	6,6a	2,8a	41	1,6	1,7a	10,6 ^a	3096	16	16
20-50 cm										
E	0,3	2,0b	1,5b	44	0,7	0,9b	5,3bc	2136ab	12	13
A	0,2	6,2a	2,5a	52	1,0	1,3a	8,1 ^a	2998a	15	19
CE	0,3	1,8b	1,6ab	62	1,1	0,6b	4,1c	1082b	13	12
CA	0,4	6,4a	2,3ab	53	1,2	1,7a	7,6ab	2743ab	15	12
50-100 cm										
E	0,4	1,8b	1,2	48	0,4	0,7c	5,3	1984bc	15	15
A	0,2	4,7ab	2,6	44	1,6	1,1b	9,0	2406ab	17	12
CE	0,2	1,6b	1,4	62	0,7	0,6c	4,1	1116c	16	12
CA	0,3	5,9a	1,9	38	0,8	1,8a	6,8	3301a	19	12

Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma profundidade (Tukey p<0,05)

O acúmulo de nutrientes nas raízes (VALE, 2009), assim como a distribuição das mesmas (BAKKER et al., 2006), estão relacionados com a disponibilidade de nutrientes no solo. Gonçalves (1994) verificou que as concentrações de N, P, K, Ca e Mg nas raízes finas de povoamentos de *E. grandis* diminuíram das camadas superiores para as camadas inferiores do solo. Isto evidencia uma relação direta e negativa da composição química das raízes com o nível de fertilidade da camada do solo.

O desenvolvimento de raízes finas na camada superficial em área florestal é visto como uma estratégia para adquirir nutrientes em solos de baixa fertilidade (LACLAU et al., 2004). Coelho et al. (2007) verificaram maior densidade de raízes finas de *E. grandis* na camada de 0-10 cm de profundidade e, abaixo dessa camada, a densidade de raízes diminuiu. Segundo Gonçalves et al. (2001) e Laclau et al. (2004), este efeito se deve à maior

concentração de nutrientes na camada superficial, enriquecida pela ciclagem biogeoquímica de nutrientes.

Com teores de nutrientes próximos aos encontrados nas folhas, as raízes finas desempenham papel de igual magnitude na ciclagem de nutrientes (GONÇALVES et al 2000). Em povoamentos de eucalipto, o sistema radicular pode conter 25 a 34% dos nutrientes (REIS et al., 1987). Enquanto a decomposição da serapilheira promove a liberação de nutrientes nas camadas superficiais do solo, a decomposição de raízes finas forma no solo microrregiões mais férteis (GONÇALVES et al 2000), especialmente em profundidade.

Harmand et al. (2004), trabalhando com *Acacia polyacantha*, *Senna siamea*, *E. camaldulensis*, observaram diferentes concentrações de N nos sistemas radiculares de todas essas espécies, sendo o acúmulo maior em *A. polyacantha*, seguido de *S. siamea* e de *E. camaldulensis* (2, 1 e 0,9 %, respectivamente). Esses dados se assemelham aos nossos, nos quais a maior concentração de N ocorreu nas plantas de acácia, independente do tratamento (Tabela 4).

Os maiores teores de N nessas plantas ocorrem, provavelmente, devido a associação de suas raízes com bactérias diazotróficas capazes de fixar N (Harmand et al. 2004). De acordo com Freitas et al. (2008), o grande acúmulo de N pelas raízes de acácia pode ser vantajoso em consórcios agrofloretais, havendo disponibilização do nutriente para as demais espécies consorciadas. Bauhus et al. (2000), Binkley et al. (2000) e Rodrigues et al. (2003) verificaram que plantas de eucalipto consorciadas com leguminosas apresentaram maior concentração de N nas raízes, quando comparadas com as do monocultivo, sugerindo que este N seja proveniente das leguminosas via fixação biológica de nitrogênio.

Paula (2015) demonstrou, em condições de campo, a transferência de N em curto prazo e abaixo do solo a partir de árvores de *A. mangium* para árvores de *E. grandis*. A transferência foi observada dentro de um raio de 6,2 m. Esse estudo sugere que este processo pode ocorrer quando as raízes finas, das plantas fixadoras de N por meio de bactérias e das não fixadoras, estão entrelaçadas ou diretamente conectadas por meio de redes de micorrizas em comum.

No entanto, não foi constatado neste experimento aumento no acúmulo de N pois, as plantas de eucalipto em consórcio apresentaram teores de N semelhantes ao encontrado no monocultivo (Tabela 4). Esses dados se assemelham aos de Schiavo et al., (2009), que também não observaram influência das leguminosas no acúmulo de nutrientes nas plantas de eucalipto.

6.3. Atributos biológicos do solo

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, quando comparados na mesma camada, para os teores Cmic, RBS, qCO_2 e o $qMIC$ ($p < 0,05$) (Figura 6). O Cmic, em todos os tratamentos, foi maior na profundidade de 0-10 cm, nas qual apresentou valores de 530,5 e 548,8 mg C kg solo⁻¹ em E e A respectivamente, e valores de 309,9 mg C kg solo⁻¹ em CE e 439,4 mg C kg solo⁻¹ em CA (Figura 6).

O conteúdo de Cmic pode variar muito entre os ecossistemas naturais brasileiros, como no cerrado (39 a 1434 $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo) (OLIVEIRA et al., 2001), na floresta amazônica (54 a 942 $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo) (FEIGL et al., 1995; SOTTA et al., 2008) em florestas de araucária (169 a 1520 $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo) (BARRETA et al., 2005; BERTINI, 2011) ou mesmo em florestas de *Eucalyptus* sp. (43,39 a 401,06 $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo) (GAMA-RODRIGUES et al., 2005).

Figura 6. Atributos biológicos do solo: carbono da biomassa microbiana (Cmic), respiração basal do solo (RBS) e quocientes metabólicos (qCO_2) e microbianos ($qMIC$), avaliados nos tratamentos: monocultivos de *Eucalyptus grandis* (E) e *Acacia mangium* (A) e consórcios de *E. grandis* (CE) e *A. mangium* (CA) nas diferentes profundidades do solo (cm).

Bini (2012), analisando monoculturas e consórcio de *E. grandis* e *A. mangium*, aos 2, 7, 14 e 20 meses de plantio, encontrou valores entre 100 e 1100 $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo para monocultivos de eucalipto, 250 e 1300 $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo para monoculturas de acácia, 200 e 900

$\mu\text{g C g}^{-1}$ solo para consórcio de eucalipto, e 150 e 1350 $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo para consórcio de acácia, sendo os maiores valores encontrados aos 14 meses.

Nossos valores estão dentro do limite do que foi encontrado por estes autores nas diferentes áreas. Nas camadas mais profundas do solo (10-20, 20-50 e 50-100 cm), em todos os tratamentos, nossos resultados apresentaram valores entre 187,16 e 325,88 mg C kg solo^{-1} . Esses valores são baixos, comparativamente aos encontrados em outras culturas, sendo, portanto, indicadores de pobre crescimento microbiano nessas condições (BEHERA et al., 2003).

O Cmic pode ser afetado por diversos fatores, tais como umidade, pH, MO e o tipo de solo (KASEL, 2007; FORD et al., 2007; LUXHØI et al., 2008). Como visto anteriormente, as variáveis físicas e químicas do solo estudado são melhores nas camadas superficiais (0-10 cm) o que pode explicar os valores de Cmic nessas camadas.

Em todos os tratamentos avaliados, os maiores teores de RBS foram encontrados na camada superficial do solo (29 $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg solo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ no tratamento E, 25 $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg solo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ no A, 23 $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg solo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ no CE e 44 $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg solo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ no CA). Skorupa (2001), estudando a acumulação e decomposição de serapilheira em povoamentos de eucalipto na região do Baixo Rio Doce, constatou que a RBS foi afetada principalmente pela presença de fragmentos de folhas sobre o solo, o que contribuiu para aumentar a quantidade de C-CO_2 liberada, mostrando que a atividade microbiana é influenciada pelo substrato orgânico. Os resultados encontrados neste trabalho, na camada de 0-10 cm, também estão de acordo com Gama-Rodrigues et al. (2005), em solos plantados com eucalipto, e com Paulino (2003), em solo degradado também cultivados com essa essência, que encontraram médias de respiração de 45,2 e 26 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Apesar de ter sido verificado maiores quocientes metabólicos nas camadas superficiais, de modo geral, os valores de $q\text{CO}_2$ foram baixos em todos os tratamentos e profundidade, indicando uma biomassa microbiana eficiente, ou seja, perde menos C na forma de CO_2 com a respiração. Bini (2012) também encontrou nas áreas de monocultivo e consórcio de *E. grandis* e *A. mangium* baixos valores de $q\text{CO}_2$ aos 7 e 14 meses.

De acordo com Anderson et al. (1993), quocientes metabólicos elevados são um indicativo de comunidades microbianas em estádios iniciais de desenvolvimento, com maior proporção de micro-organismos ativos em relação aos inativos, ou ainda um indicativo de populações microbianas sob algum tipo de estresse metabólico.

O $q\text{MIC}$, apresentou valores maiores que 1,4%, sendo mais elevados nas camadas profundas do solo, chegando a 6,3%. Essa observação evidencia a eficiência dos micro-

organismos na imobilização do C. De acordo com Colozzi Filho et al. (1999), valores de q_{MIC} que expressam uma condição de equilíbrio do C no solo seriam de 2,3% para monoculturas.

Diante das condições físicas e químicas limitantes nas camadas mais profundas do solo, podemos sugerir que a biomassa microbiana esteja economizando energia (baixa atividade metabólica) e alocando mais carbono (alto q_{MIC}).

6.4. Comunidade de fungos

6.4.1. Colonização, análise morfológica e número de esporos de FMA

A colonização diferiu significativamente, separando os tratamentos com eucalipto dos tratamentos com acácia ($p < 0,05$) (Figura 7). Não foi verificada colonização por FMA nas raízes de *A. mangium*. Observamos redução da colonização com o aumento da profundidade do solo.

Figura 7. Colonização por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) nos tratamentos consórcio de *Eucalyptus grandis* (CE), consórcio de *A. mangium* (CA), monocultivo de *E. grandis* (E) e monocultivo de *Acacia mangium* (A) ao longo da profundidade do solo (cm).

Schiavo (2003), Caproni (2005) e Founoune (2002) reportaram esse tipo de colonização em diferentes espécies do gênero, indicando que a acácia é uma potencial formadora de MA. Segundo Cardoso et al., (2010) a colonização por FMA podem variar de acordo com fatores edafoclimáticos, atributos químicos e físicos do solo e a idade do plantio.

A *A. mangium*, além de formar simbiose com FMA, se associa a bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL), formando uma simbiose tripartites: BFNNL – Leguminosa – FMA (Carvalho et al., 2010). Como ambos os simbiontes dependem das fontes de C oferecidas pela planta para a sua sobrevivência, os custos de manutenção da simbiose tripartite para a planta são consideráveis (MORTIMER et al., 2008). Deste modo, a planta necessita de mecanismos que lhe permitam controlar ambas as simbioses de acordo com suas necessidades (Carvalho et al., 2010).

Existe um controle de *feedback*, denominado autorregulação, que consiste em um processo no qual o estabelecimento de um nódulo suprime a formação subsequente de outros nódulos, evitando que a planta seja nodulada indefinidamente (CATFORD et al., 2003). Mecanismos similares de autorregulação foram também observados para o processo de micorrização (VIERHEILIG, 2004).

Em um estudo com plantas de soja inoculadas com FMA ou BFNNL, no qual a inoculação com o segundo simbionte foi feita 20 dias após a primeira inoculação, mostrou-se que o pré estabelecimento das BFNNL suprimia a formação subsequente das micorrizas e vice-versa (BETHLENFALVAY et al., 1985).

Foi observada a formação de nódulos nas raízes das plantas de *A. mangium* (Anexo C) e também, houve maior concentração de nutrientes na rizosfera dessas plantas (Tabela 3). Além disso, por meio da análise de redundância (RDA), com os eixos 1 e 2 explicando 39,4 e 24,9% dos dados respectivamente, os atributos químicos das raízes, especialmente o N e em menor proporção o P, tiveram correlação negativa com a colonização por FMA (Figura 8). Como já descrito (Tabela 4), as plantas de *A. mangium*, em todos os tratamentos, apresentaram maior concentração de nutrientes em relação as de *E. grandis*.

Esses dados podem explicar a não formação de micorriza nas raízes de *A. mangium*, indicando não haver a necessidade de colonização por FMA neste estágio de desenvolvimento.

Figura 8. Análise de redundância (RDA), sendo os atributos químicos as variáveis explicativas e as colonizações micorrízica arbuscular (FMA) e ectomicorrízica (ECM) as variáveis resposta.

Existe um balanço entre o P do solo e o dos tecidos da planta que controla a associação simbiótica (MIRANDA et al., 1989). Já o mecanismo que regula a relação fungo-planta parece estar relacionado com o nível crítico de P para o crescimento da planta hospedeira (COSTA et al., 2001). Paula et al. (1987) observaram redução da micorrização em soja por níveis de N na planta superiores a 2,5%.

Pereira (2014) verificou baixa colonização nos tratamentos com monocultura e consorcio de *E. grandis* e *A. mangium*, sendo a monocultura do eucalipto o tratamento que apresentou a maior taxa de colonização por FMA: 7,1% na camada de 0-100 cm; 0,4% para as camadas de 100-800 cm. O contrário foi encontrado nos resultados de Bini (2012), que verificou, nos mesmos sistemas de plantios, altas taxas de colonização por FMA em todos os tratamentos: 53 e 45% no monocultivo de acácia; 45 e 38% no monocultivo de eucalipto; 52 e 44% no consórcio de acácia; 50 e 42% no consórcio de eucalipto. Contudo, no trabalho

realizado por Bini (2012), foram avaliadas raízes até 15 cm de profundidade do solo e os plantios encontrava-se com 2 e 20 meses de implantação. Já no trabalho de Pereira (2014) as avaliações das raízes foram feitas até 8 metros de profundidade e os plantios estavam com 4 ano.

Os nossos resultados de colonização micorrízica apontaram porcentagens variando nas camadas superficiais de 26% a 30% para o CE e E respectivamente, e nas camadas mais profundas de 9% a 15% para E e CE. De acordo com a escala de colonização estabelecida por Carneiro (1998), as camadas superficiais apresentaram média colonização, enquanto que as camadas profundas apresentaram baixa colonização.

Com relação à profundidade do solo, trabalhos mostram que o aumento da profundidade reduz significativamente a taxa de colonização nas raízes, sendo este fator mais agravante nas camadas abaixo de 100 cm de profundidade (PEREIRA, 2014). Resultados semelhantes, nos quais os percentuais de colonização por FMA diminuíram com o aumento da profundidade do solo também foram encontrados em outros sistemas de plantios: Oehl et al. (2005), em áreas de pastagem, milho e vinhedo; Jakobsen et al. (1983), em plantios de ervilhas e trigo; e Bonfim (2011) em árvores da Mata Atlântica. Na medida em que aumenta a profundidade do solo, ocorre redução nos níveis de matéria orgânica e nos teores de nutrientes minerais, conforme foi mostrado nas tabelas 2 e 3. Esses fatores podem interferir diretamente na taxa de colonização micorrízica (MENDES, 2009), além das características físicas e biológicas do solo e rizosfera.

Em nosso estudo não foi encontrado arbúsculos nas raízes de *E. grandis* (Figura 9). Essa estrutura é fundamental para a troca de nutrientes entre a planta e o fungo (SMITH et al, 1997). A ausência de arbúsculos nas raízes colonizadas por FMA vem sendo documentada por diversos autores. Souza et al. (2013) verificaram em todas as variedades de *Anemopaegma arvense* estudadas, a colonização através da presença de hifas, não sendo observada a formação de arbúsculos e/ou vesículas nas raízes. Silva et al. (2009) também não observaram a presença de arbúsculos no sistema radicular de diversas plantas avaliadas Rio Grande do Sul. Campos et al. (2011), não encontraram arbúsculos nas raízes de diferentes espécies de eucalipto.

Duas classes morfológicas importantes da simbiose micorrízica arbuscular foram identificadas por Gallaud (1904). As classes, que diferem em estruturas, foram nomeadas micorrizas *Arum* e *Paris*. A maioria das plantas cultivadas formam colonização do tipo *Arum*, que apresentam hifas, arbúsculos e em alguns casos vesículas, enquanto muitas plantas de ambientes naturais formam micorriza do tipo *Paris*, característico por não formar arbúsculos

(REQUENA et al., 2007), mas por apresentarem hifas intracelulares chamadas de *coil* (DICKSON, 2004).

O tipo *Arum* é considerado o mais comum devido ao fato de a maioria dos estudos experimentais usarem plantas cultivadas (DICKSON, 2004). Brundrett et al. (1990) sugeriram que o tipo *Paris* pode ser tão comum em comunidades naturais como o tipo *Arum*. Em uma revisão de literatura, Smith et al. (1997) compilou uma lista de famílias de plantas e o tipo de colonização micorrízica observada nelas, e mostrou que micorrizas do tipo *Paris* eram mais comuns, com 39 famílias comparadas com 26 com tipo *Arum*, e 21 com ambas as morfologias. Malajczuk et al. (1981) observaram em *E. diversicolor* e *E. marginata* a formação dos dois tipos de micorrizas por meio da presença de arbúsculos e hifas *coils*. Também encontramos este tipo de estrutura (hifas *coils*) nas nossas amostras (Figura 9).

Dickson (2004) mostra que a diferenciação em micorriza *Arum* e *Paris* depende da planta e do fungo que a coloniza. Além disso, segundo Cavagnaro et al. (2001), fatores ambientais, como condições de solo e nutrientes, também podem contribuir para a variabilidade morfológica.

Figura 9. Colonização micorrízica arbuscular. A, B e C presença hifas (h), vesículas (v), esporos (e) e ausência de arbúsculos; D, E, F hifas *coils* (hc); G raiz de *A. mangium* sem colonização. A, C e G aumento de 10x; B, D, E e F aumento de 40x.

O número de esporos de fungos micorrízicos presentes no solo não diferiram entre os tratamentos, quando comparada a mesma camada ($p < 0,05$), mas houve redução com o aumento da profundidade do solo (Figura 10). Mesmo não havendo formação de MA nas plantas de acácia, encontramos esporos viáveis no solo em que estas estavam inseridas.

Analisando o número total de esporos e a colonização das raízes de *A. mangium*, foi observado que a presença dos esporos no solo não foi suficiente para colonizar as raízes. Este resultado está de acordo com os dados de Steffen et al. (2010), em que observaram que o número de esporos no substrato não correspondeu ao grau de colonização das raízes de *E. grandis*. Douds (1994) descreveu que não há correlação entre colonização micorrízica e a esporulação no solo. Segundo Moreira et al. (2006) e Smith et al. (2008), a presença de esporos micorrízicos no solo ou substrato resultará em benefícios nutricionais e adaptativos a planta hospedeira, se as condições bióticas e abióticas do meio permitirem a colonização.

Figura 10. Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em 50g de solo, nos tratamentos consórcio de eucalipto (CE), consórcio de acácia (CA), monocultivo de eucalipto (E) e monocultivo de acácia (A) ao longo da profundidade (cm).

Os esporos constituem as principais unidades de sobrevivência das espécies de FMA, conhecidos pelo caráter de biotróficos obrigatórios. Considerando que os esporos constituem uma estrutura de resistência nos ciclos de vida dos FMAs, a germinação é, por excelência, etapa crucial para garantir a sobrevivência e a propagação da espécie. (SIQUEIRA et al., 1985). Diversos fatores físicos, químicos e biológicos do solo afetam a germinação e o crescimento micelial assimbiótico, devendo ser fornecidas condições edáficas ideais para garantir o desenvolvimento dessas etapas do ciclo de vida dos FMA. Os esporos podem

também passar por período de dormência caracterizado pela ausência de germinação, mesmo em condições ideais ao processo (SIQUEIRA et al., 1985; MOREIRA et al., 2002).

Lima et al. (2007) verificaram que o aumento nos teores de COT favoreceu a ocorrência de mais esporos viáveis, assim como a intensidade da colonização micorrízica. Nossos resultados se assemelham a esses, pois verificamos maior número de esporos (Figura 10) e taxa de colonização (Figura 7) nas camadas superficiais do solo, onde verificamos maiores teores de COT (Tabela 2). Porém, apesar da taxa de colonização ter sido maior no E, o número de esporos viáveis não correspondeu ao maior teor de COT neste tratamento.

A germinação dos esporos é também afetada pelo pH do solo. Espécies de FMA requerem faixas ótimas para a germinação e crescimento micelial, a faixa mais propícia para a maioria das espécies está entre pH 6,0 e 7,0 (MOREIRA et al., 2002). Porém, autores relatam que algumas espécies como a *Gigaspora margarita*, *A. scrobiculatata* (SIQUEIRA et al., 1994), *Racocetra coralloidea* e *F. heterogama*, *A. laevis* (MOREIRA et al., 2002) germinam bem em condições de solo com pH ácido. A nossa área de estudo apresenta solo com pH ácido (Tabela 2), esse talvez seja o fator responsável pela baixa densidade de esporos nos tratamentos. Além disso, por meio da análise morfológica dos esporos de FMA, seguindo o manual de identificação do INVAM (disponível em <https://invam.wvu.edu/>), foi possível determinar alguns gêneros, e até mesmo algumas espécies de fungo nos diferentes tratamentos e profundidades: *Glomus macrocarpum* (Figura 11), *Acaulospora mellea* (CA 10-20 cm), *Racocetra* sp. (A 50-100 cm) e *Gigasporales* sp. (Figura 11).

Figura 11. Esporos de fungos micorrízicos arbusculares. A) Esporo de *Gigasporales* sp encontrado no tratamento CE, na camada de 0-10 cm do solo (20x). B) Esporos de *Glomus macrocarpum*, encontrado no tratamento CE, na camada de 10-20 cm do solo (10x).

A espécie *Glomus macrocarpum* têm sido considerados de comum ocorrência no Estado de São Paulo, como em plantas ornamentais (TRUFEM et al. 1990; GRANDI et al., 1991), em vegetação de Mata Atlântica (TRUFEM et al. 1990), em culturas de citros (CARRENHO, 1993) e de amendoim (BONONI et al. 1988), e em plantações de eucalipto (GOMES; TRUFEM, 1998). Caproni et al. (2005) também observaram a presença deste taxón em áreas com *A. mangium*, além de verificarem alta densidade de esporos de *Acaulospora mellea* nessas áreas.

Cavagnaro et al. (2001) verificaram em um experimento com plantas de *Lycopersicon esculentum* (tomate) que diferentes espécies do gênero *Glomus* podem formar tanto micorriza do tipo *Arum* como do tipo *Paris*. Os mesmos autores também verificaram neste experimento que os gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora* formaram o tipo *Paris*. Este e outros trabalhos demonstraram que um fungo pode formar qualquer tipo de colonização dependendo da planta hospedeira e das condições do ambiente (BARRETT, 1958; GERDEMANN, 1965; JACQUELINET-JEANMOUGIN et al., 1983; BEDINI et al., 2000).

6.4.1. Colonização e análises histológicas e histoquímicas de ECM

A colonização por ECM apresentou diferenças entre os tratamentos na camada 20-50 cm de profundidade ($p < 0,05$), sendo E o tratamento que apresentou maior taxa de colonização, 28%, seguido do CE e CA com valores de 26% e 22% respectivamente, e por último o tratamento A com 12%. Não houve diferenças entre os tratamentos nas demais camadas do solo (Figura 12). Seguindo a escala de Zangaro et al. (2002) (adaptado por Silva et al, 2009), a colonização por ECM foi de média a baixa na camada de 0-10cm, e de baixa a muito baixa nas camadas de 10-20, 20-50 e 50-100 cm. Nesse sentido, verificamos redução da colonização com o aumento da profundidade do solo.

Figura 12. Colonização por fungo ectomicorrízico nos tratamentos consórcio de eucalipto (CE), consórcio de acácia (CA), monocultivo de eucalipto (E) e monocultivo de acácia (A) ao longo da profundidade do solo (cm).

Nossos dados são semelhantes aos reportados por Pereira (2014), em plantios puros e mistos de *E. grandis* e *A. mangium*, com quatro anos de implantação. Neste trabalho, foram encontrados maiores valores de colonização nos tratamentos com eucalipto puro, em todas as camadas de solo avaliadas (de 0 a 8 metros). O autor verificou ainda, maiores valores de ECM em relação aos FMAs.

Em *Eucalyptus* spp., pesquisadores tem constatado maior dependência e investimento 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 florestais com mais idade, é comum haver predominância ECM. Contudo, é válido ressaltar que não apenas a idade da planta pode interferir na colonização, mas diversos fatores edafoclimáticos podem estar envolvidos (CARDOSO et al., 2010). Talvez, por serem considerados plantios de pouca idade, 2 anos de implantação, essa sucessão (micorriza arbuscular-ectomicorriza) ainda não está evidente (de acordo com as escalas de colonização de Carneiro (1998) e Zangaro et al. (2002).

A colonização por ECM foi correlacionada com os dados químicos das raízes, por meio da análise de redundância (RDA), com os eixos 1 e 2 explicando 39,4 e 24,9% dos dados respectivamente (Figura 8). Foi verificado que a colonização tendeu a ser maior nos

tratamentos com *E. grandis*, e que o Mg e o K foram os atributos que apresentaram correlação positiva com a ECM, sendo o Zn o atributo que apresentou forte correlação negativa. O Zn é um elemento essencial para o metabolismo do fungo (BABICH et al., 1978; ANSARI et al., 2004; GADD et al., 2001; JI et al. , 1995) contudo, concentrações elevadas deste metal podem ser inibitórias ou tóxicas para as atividades celulares e de crescimento causando inibição da respiração e da germinação dos esporos (BABICH et al. 1978), apesar dos teores de zinco nas plantas avaliadas terem sido baixos (10 a 17 mg kg⁻¹) em relação ao observado por Silva et al. (2015) em *Eucalyptus* spp., (213,3 a 477 mg kg⁻¹).

Na área de coleta, foi encontrado corpos de frutificação de fungos formadores de ECM. Além disso, foi observada a simbiose destes com as raízes (Figura 13). Por meio do estudo morfológico, foi possível identificar os fungos como pertencentes aos gêneros *Pisolithus* sp. e *Scleroderma* sp. (Figura 13).

Figura 13. Fungos formadores de ectomicorriza: *Pisolithus* sp (A) e *Scleroderma* sp (C). Formação de ectomicorriza nas raízes de *E. grandis* pelos fungos *Pisolithus* sp (B) e *Scleroderma* sp (D) e nas raízes de *A. mangium*, tanto em monocultivo (E) como no consórcio (F).

Diversos trabalhos têm reportado a formação de ECM por estes gêneros em plantas de *Eucalyptus* spp. (KRÜGNER et al., 1981; TOMAZELLO FILHO et al., 1982; GIACHINI et al., 2000; CAMPOS, 2004; GURGEL et al., 2008; PAGANO; SCOTTI, 2008). A maioria das plantas de interesse florestal se associam com ECM sob condições naturais. Desta forma, a comunidade micorrízica pode ser composta por um ou vários tipos de fungos dependendo de fatores ambientais e da especificidade fungo hospedeiro (KASUYA et al., 2010).

As análises estruturais efetuadas nas secções transversais das ECM evidenciaram a presença de manto fúngico ao redor das células epidérmicas e rede de *Hartig* entre as células do córtex radicular em todos os tratamentos avaliados (Figura 14 C-J), confirmando esse tipo de colonização nas plantas de *E. grandis* e *A. mangium*, semelhante ao relatado por Ducousso

et al. (2012) que observaram a formação de ECM nas árvores de *Eucalyptus* sp na África e em Madagascar. Da mesma forma, Bonnassis (2007) verificou a formação de ECM em plantas de *E. dunnii*, porém, em nosso trabalho, as plantas foram inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos, em condições assépticas de síntese *in vitro*.

Silva et al. (2007) estudando isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus* sp., observaram que este fungo foi capaz de formar ECM típicas quando associados com *E. grandis* sob condições de casa de vegetação. Embora tenhamos verificado a presença do corpo de frutificação e colonização pelo *Pisolithus* sp. na área de estudo (Figura 13 A e B), os resultados não nos permite afirmar que as estruturas observadas nas secções de ECM referem-se a este fungo.

Além de identificar as estruturas características das ECM, as secções histológicas evidenciaram variações na espessura do manto fúngico, sendo que as ECM nas raízes de eucalipto, em ambos os tratamentos (Figuras 14 C, D, G e H), apresentaram o manto mais espesso, que nas plantas de acácia, onde a espessura é menor (Figuras 14 E, F, I e J), fato este visto por Ostonen et al. (2003) que verificaram variações na espessura do manto fúngico entre as ECM em *Picea abies*.

De acordo com Kasuya et al. (2010) a espessura do manto varia entre a espécie vegetal, bem como entre os isolados fúngicos. As variações na estrutura do manto, as ornamentações da superfície, bem como a coloração são usados para a caracterização das ectomicorrizas e identificação do fungo associado (INGLEBY et al., 1990; SMITH et al., 1997). Entretanto, poucos são os fungos que podem ser identificados com base somente nessas características, necessitando-se do corpo de frutificação para este fim (PETERSON et al., 1994).

A maioria das secções histológicas realizadas evidenciaram a presença de manto fúngico e rede de *Hartig* com hifas de coloração escura (Figura 14 C-J). Alguns fungos, como os pertencentes aos gêneros *Cenococcum* e *Thelephora* apresentam hifas com este tipo de coloração. Na literatura, já foi reportada a formação de ECM entre estes fungos e raízes de *Eucalyptus* sp. (TRAPPE, 1962; GIACHINI, 2000; SANTANA et al., 2016). Secções de raízes também foram realizadas (Figura 14 A e B), a fim de evidenciar as diferenças (ausência hifas) entre os cortes de ECM.

A rede de *Hartig*, especialmente nas ECM dos monocultivos (Figura 14 C-J) ocupou todos os espaços intercelulares do córtex radicular. Segundo Kasuya et al. (2010) essa estrutura pode se estender por várias camadas do córtex sem, no entanto, ultrapassar o limite imposto pela endoderme radicular. De acordo com Kottke et al. (1987) a rede de *Hartig*

constitui o sítio onde acontecem as trocas de metabólitos entre a planta hospedeira e o fungo, que se beneficia da associação obtendo carboidratos da planta (RAVEN et al., 1996).

Figura 14. Fotomicrografia de secções transversais de raízes de *Eucalyptus grandis* em sistema de consórcio (A e B) e de ectomicorizas em raízes de *E. grandis* e *Acacia mangium* em sistemas de monocultivos (B-C e E-F respectivamente) e consórcio (G-H e I-J respectivamente). Ep = Epiderme; C = Córtex; CV = Cilindro vascular; M = Manto; Asteriscos vermelhos = Rede de Hartig. Barras = 10 µm.

6.4.2. Abundância da comunidade de fungos no solo e na rizosfera

Os fungos do solo e da rizosfera foram quantificados por meio do número de cópias da região ITS específica para este grupo em cada grama de solo. O tamanho do fragmento amplificado foi de 300 bp com uma eficiência de 102% e valor de R^2 de 0,99. Esta determinação resultou em valores que variam de 10^3 (mil) a 10^6 (um milhão) cópias do fragmento alvo por grama de solo, e de 10^5 (cem mil) a 10^7 (dez milhões) cópias do fragmento alvo por grama de rizosfera (Figura 15).

Pereira (2014) verificou nas camadas de 0 a 20 cm do solo valores de 10^9 para monocultivos e 10^{10} para consórcio de *E. grandis* e, 10^9 para monocultivos e consórcio de *A. mangium*, quando os plantios estavam com quatro anos de implantação. Porém, este autor não encontrou diferenças significativas no número de cópias do gene ITS, entre os tratamentos, nas camadas de 0-20 cm. Os valores de abundância de cópias do gene ITS no solo estão abaixo dos encontrados nesta pesquisa. Também não foram encontradas diferenças entre os tratamentos na mesma camada, apenas entre as camadas do mesmo tratamento ($p < 0,05$), sendo a abundância reduzida com o aumento da profundidade, o que também foi reportado por Pereira (2014).

Rachid (2013) observou que o *qPCR* do solo mostrou uma maior abundância de cópias do gene ITS ($p < 0,05$) no tratamento *Eucalyptus* sp quando comparado ao tratamento de *Acacia* sp, que apresentou um número de cópias aproximadamente 55% menor. O tratamento de consórcio entre essas duas plantas não apresentou diferença significativa entre os dois outros tratamentos.

Figura 15. Frequência da quantidade logarítmica de cópias do gene ITSA por grama de solo (A) e rizosfera (B) nas amostras avaliadas, sendo os tratamentos: E – monocultivo de *E. grandis*; A – monocultivo de *A. mangium*; CE – consórcio de *E. grandis* e CA – consórcio de *A. mangium*.

Na rizosfera, foram encontradas diferenças significativas no número de cópias do gene ITS. A entre as profundidades dentro do mesmo tratamento, exceto para o consórcio de *A. mangium* (CA), sendo as camadas superficiais (0-10 cm) as que apresentaram maior abundância ($p < 0,05$). O tratamento CA apresentou maiores teores de N e NH_4^+ nas camadas mais profundas (50-100cm), assim como maior teor de Mn (Tabela 3). Talvez essa melhor condição química tenha favorecido a abundância de fungo em profundidade.

A abundância de fungo na rizosfera foi maior em relação ao solo. Segundo Cardoso et al (1992) o número de micro-organismos na rizosfera é maior que o número de micro-organismos no solo. Rouatt et al, (1960) verificaram que a relação rizosfera-solo, para a comunidade de bactérias e de fungos é de 23:1 e 12:1, respectivamente. A microbiota do solo, devido a seu caráter oligotrófico, é pobre em compostos orgânicos energéticos para sua nutrição. As plantas, porém, secretam até 40% dos seus fotossintatos na rizosfera elevando a densidade microbiana na rizosfera em relação ao solo (CARDOSO et al., 2016).

A exsudação de moléculas de baixo peso molecular oriunda da raiz resulta na seleção e na atração da biomassa microbiana que, em comparação com o solo distante de raízes, encontra condições de alta disponibilidade de nutrientes nesta região, aumentando sua abundância (BAIS et al., 2006). Segundo Moreira et al. (2006), devido não só a quantidade, mas também a diversidade de compostos orgânicos depositados na rizosfera, assim como as condições físicas e químicas do ambiente, a quantidade de diversos tipos de micro-organismos na rizosfera pode exceder mais de mil vezes aquela do solo.

6.4.3. Estrutura da comunidade de fungos no solo

Os perfis de fungos do solo quando plotados em uma PCoA (Figura 16-A) apresentaram uma explicação dos eixos de 27,68% para a PCo1 e 16,30% para a PCo2. De modo geral, o perfil de fungo apresentou comportamento disperso entre os tratamentos, isto é, com estruturação pouco definida, exceto para os tratamentos com *E. grandis*. Para confirmar e tornar mais clara a similaridade e o agrupamento dos perfis de fungos obtidos foi realizada a análise de similaridade de ANOSIM ($p < 0,05$). Comparando todas as profundidades e tratamentos estudados, o monocultivo de *E. grandis* (E) foi, quando comparada aos demais tratamentos, significativamente diferente ($p < 0,0026$). Porém, houve sobreposição de grupos do tratamento E com o tratamento de *E. grandis* em sistema de consórcio (CE) ($R_{\text{ANOSIM}} = 0,3771$; $p < 0,0006$), não havendo, portanto, diferenças entre os demais tratamentos.

Nas camadas 0-10 e 10-20 cm não houve, quando comparado os tratamentos, separação significativa de E ($p > 0,5152$ e $p > 0,2141$, respectivamente) (Figura 16-B e C). Por outro lado, na camada 20-50 cm, quando feita esta mesma comparação, houve separação significativa do tratamento E para os demais ($p > 0,0401$) mas com sobreposição de grupos ($R_{\text{ANOSIM}} = 0,4568$) (Figura 16-D). Em 50-100 cm, foi percebido o mesmo efeito da camada 20-50 cm, onde o tratamento E apresentou separação significativa dos demais tratamentos ($p > 0,0078$), sem sobreposição de grupos ($R_{\text{ANOSIM}} = 0,8333$) (Figura 16-E).

O monocultivo de *E. grandis*, por meio da ANOSIM, mostrou-se, apesar das sobreposições, o tratamento com maior separação de grupos fúngicos em todas as profundidades. De acordo com Wakelin et al. (2008), mudanças na estrutura da comunidade microbiana ocorrem devido, principalmente, as práticas agrícolas adotadas e por intermédio da vegetação na área. As espécies de plantas 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 et al., 1990, WARDLE, 1992).

Figura 16. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) do perfil de fungos do solo obtido por T-RFLP. Agrupamentos foram baseados na dissimilaridade de *Bray-Curtis*. Sendo os tratamentos: monocultivo de *Eucalyptus grandis* (E); monocultivo de *Acacia mangium*; consórcio de *E. grandis* (CE) e consórcio de *A. mangium* (CA). Figura A - todas as camadas; B - camada de 0-10 cm; C - 10-20 cm; D - 20-50 cm e E - 50-100 cm.

Os dados de T-RFLP foram correlacionados com os valores das propriedades químicas e biológicas do solo por meio da análise de redundância (RDA), com o intuito de estabelecer quais variáveis se correlacionam de maneira mais íntima com a variância dos perfis de fungos observados. As análises foram realizadas considerando todos os tratamentos e profundidades (Figura 17). Algumas variáveis químicas foram excluídas desta análise para remover o efeito de multicolinearidade (fator de inflação > 20) (ter BRAAK et al., 1998).

A RDA explicou 51,1% da variação contida nos dados, sendo 27,1% e 24,0% incidentes sobre os eixos canônicos 1 e 2, respectivamente (Figura 17). Dentre os atributos, o COT apresentou índice de significância de 0.018 (p) e porcentagem de explicação de 6% (λ), sendo esta variável fortemente correlacionada com a comunidade de fungos do tratamento E na camada de 0-10 cm. Além disso, as variáveis NO_3^- , N, P, Cmic, RBS apresentaram correlação positiva com os tratamentos nesta camada, sendo o NO_3^- e o N fortemente correlacionados com os tratamentos de *A. mangium*. O pH apresentou correlação negativa com o perfil da comunidade de fungos de todos os tratamentos da camada superficial do solo (0-10 cm).

Figura 17. Análise de redundância (RDA) entre os perfis da comunidade de fungos do solo e os atributos químicos e biológicos, de todos os tratamentos e profundidades de 0-10, 10-20, 20-50 e 50-100 cm.

Em solos de ecossistemas florestais, o material orgânico depositado são os principais responsáveis pela a nutrição de toda a comunidade viva. Hoogh et al. (1979) salientam que a disponibilidade de nutrientes para as plantas depende das características biológicas do solo, sendo estas influenciadas pelo conteúdo de matéria orgânica e taxa de mineralização, tendo a atividade microbiana um papel importante na nutrição de plantas. A atividade biológica (CARTER, 1986; FOLLET et al., 1989) está relacionada diretamente com o teor de COT e a biomassa microbiana do solo (HENDRIX et al., 1988), sendo os fungos, os principais responsáveis pela decomposição dos resíduos orgânicos no solo, e consequentemente pela ciclagem de nutrientes, podendo ter influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto na estocagem do carbono e nutrientes minerais como o N e P (JENKINSON et al., 1981).

Estudos têm demonstrado que tanto a quantidade quanto a qualidade da matéria orgânica do solo podem afetar significativamente a diversidade microbiana e a estrutura de suas comunidades (KIM et al., 2002; ZHOU et al., 2002; GIRVAN et al., 2003; BANU et al., 2004; LECKIE et al., 2004).

O NH_4^+ mostrou correlação positiva com o tratamento CE nas camadas mais profundas do solo (abaixo de 10 cm), sendo esta variável preponderante para a separação entre os tratamentos de *E. grandis* (E e CE) (Figura 17). A análise química do solo mostrou um leve aumento no teor de NH_4^+ no tratamento CE, na camada de 50 a 100 cm (Tabela 2). Possivelmente esse incremento no teor de amônio ocorreu devido ao consórcio com a *A. mangium*. De acordo com Silva et al (2008), o uso de leguminosas em consórcios pode aumentar os teores nitrogênio, consequentemente do amônio, via fixação biológica.

Como mostrado, os teores de pH são maiores nas camadas mais profundas (10-20, 20-50 e 50-100cm) enquanto que a maior abundância de fungos é encontrada na camada superficial (0-10 cm) (Figura 15). Pereira (2014) encontrou valores de pH baixos, entre 3,0 e 3,9, nas camadas de 0 a 20 cm dos solos plantados com *E. grandis* e *A. mangium* em sistemas de consórcio e monocultivos. Neste último trabalho, o autor encontrou correlação entre a comunidade de fungos no solo e o teor de pH ($\lambda = 2\%$), além de maior abundância de fungo (de 10^9 a 10^{10}) nesta camada do solo.

Essa situação, típica de solos florestais, ocorre, possivelmente, devido à maior liberação de ácidos orgânicos pelas raízes das plantas (SILVA et al., 2001) e pela capacidade dos fungos em produzir grande quantidade de diferentes enzimas extracelulares e ácidos orgânicos durante a decomposição da MO (BALDRIAN et al., 2011). Na literatura é descrito que os fungos são comumente encontrados em pH ácidos ou próximos a neutralidade (TRATCH et al., 1997). ALLISON et al. (2007) mostraram que uma pequena diferença no pH por si só pode influenciar significativamente a composição de fungos do solo. Assim, os valores de pH avaliados podem ser considerados como um dos fatores determinantes para as diferenças encontradas na composição das comunidades de fungos obtidos.

6.4.1. Estrutura da comunidade de fungos na rizosfera

Por meio da PCoA, em que foi analisado todos os tratamentos e camadas estudados, a estrutura da comunidade de fungos da rizosfera do monocultivo de *E. grandis* (E) foi, quando comparada aos demais tratamentos, significativamente diferente ($p < 0,0001$) (Figura 18-A). Porém, houve sobreposição do tratamento E com o perfil de grupos de fungos da rizosfera do

tratamento de *E. grandis* em sistema de consórcio (CE) ($R_{ANOSIM} = 0,5013$; $p < 0,0006$) (Figura 18-A). Os tratamentos com *A. mangium* (A e CA), apresentaram um perfil disperso que, apesar de significativo ($p < 0,003$), não houve separação de grupos quando comparados entre si ($R_{ANOSIM} = 0,1212$).

Na camada 0-10 cm houve, quando comparado aos demais tratamentos, separação significativa de E ($p > 0,0166$). Contudo, este último tratamento teve sobreposição, ou seja, apresentou compartilhamento de grupos de fungos da rizosfera com as demais áreas estudadas ($R_{ANOSIM} = 0,4397$) (Figura 18-B). Na camada 10-20 cm, quando feita esta mesma comparação, não houve separação significativa do tratamento E para os demais ($p > 0,0928$) (Figura 18-C). Por outro lado, na camada 20-50 cm, houve forte separação do tratamento E para os demais (A, CE e CA) ($R_{ANOSIM} = 0,7265$; $p < 0,0041$) (Figura 18-D). Em 50-100 cm, o efeito rizosférico das plantas sobre a estrutura da comunidade de fungos parece ser mais diluído, não apresentando diferenças significativas ($p > 0,1045$) (Figura 18-E).

Figura 18. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) do perfil de fungos da rizosfera obtido por T-RFLP. Agrupamentos foram baseados na dissimilaridade de *Bray-Curtis*. Sendo os tratamentos: monocultivo de *Eucalyptus grandis* (E); monocultivo de *Acacia mangium*; consórcio de *E. grandis* (CE) e consórcio de *A. mangium* (CA). Figura A - todas as camadas; B - camada de 0-10 cm; C - 10-20 cm; D - 20-50 cm e E - 50-100 cm.

A diversidade microbiana no solo pode ser perturbada por diversos fatores, desde aqueles relacionados ao manejo, como aqueles induzidos pela presença das raízes das plantas. Estudos têm mostrado que a estrutura da comunidade microbiana do solo é distinta da encontrada na rizosfera, conforme mostrado para a comunidade de fungos neste trabalho (Figuras 17 e 18), sendo a rizosfera comumente composta por uma maior abundância de organismos, porém com uma menor diversidade biológica (FIERER et al., 2007; BARRET et al., 2011). Esta característica ocorre devido ao fato da comunidade biológica da rizosfera ser composta de organismos recrutados a partir da biodiversidade total encontrada no solo adjacente (CARDOSO et al., 2016).

As plantas de *E. grandis* mostraram-se selecionar a comunidade de fungos para compor a sua microbiota na rizosfera, porém, com a presença *A. mangium* no sistema de consórcio, essa seleção passa a sofrer influência, indicando que as plantas de acácia são dominantes neste processo. Este fato sugere que as plantas sejam capazes de moldar a composição da microbiota na sua rizosfera (BAIS et al., 2006; BERG et al., 2009; GARBEVA et al., 2011; MICALLEF et al., 2009).

Pereira (2014) verificou comportamento semelhante entre plantas de *E. grandis* e *A. mangium* para a comunidade de bactérias do solo. Neste trabalho, em sistema de consórcio, a *A. mangium* talvez seja a espécie de maior influência na estruturação da comunidade bacteriana do solo, o que sugere que plantas de *E. grandis*, quando plantadas na ausência de plantas de acácia, selecionem grupos distintos de bactérias. Em sistemas de consórcio entre *E. urograndis* e *A. mangium*, com desenho experimental semelhante ao de Pereira (2014), Rachid et al. (2013) verificaram que a comunidade bacteriana na camada superficial do solo (0-15 cm), apresentou estruturação intermediária entre as comunidades presentes nas monocultivos avaliados, expressando características de ambos plantios.

As espécies de plantas, bem como os tipos de comunidades vegetais, como o consórcio entre plantas, por exemplo, podem afetar a estrutura e a diversidade funcional da comunidade microbiana da rizosfera, principalmente devido a variações na composição dos exsudatos radiculares e dos sinais bioquímicos neles contidos (CARDOSO et al., 2016). A comunidade microbiana da rizosfera exerce efeitos sobre a comunidade vegetal, atuando na produtividade e nas características das plantas, resultando em uma resposta de retroalimentação (ZAK et al., 2003).

A seleção de micro-organismos específicos pelas plantas é caracterizada pelo genótipo da planta e o tipo de solo. Assim, as comunidades microbianas nas rizosferas de diferentes espécies de plantas que crescem no mesmo solo são diferenciadas. A planta pode determinar a

composição da microbiota da raiz por secreção ativa de compostos, os quais estimulam ou reprimem especificamente alguns membros da comunidade microbiana (DOORNBOS et al., 2012)

Foi realizada uma análise de correlação entre o perfil da comunidade de fungos da rizosfera, obtidos por T-RFLP, com os atributos químicos da rizosfera, na tentativa de identificar atributos chaves, os quais podem ter participação importante na distribuição desses grupos nesse ambiente.

Por meio da RDA, com todos os tratamentos e camadas da rizosfera avaliados, foi possível explicar 58,5% da variação contida nos dados, sendo 40,2% e 18,3% referentes aos eixos canônicos 1 e 2, respectivamente. Dentre os atributos, o pH ($p < 0,002$ e $\lambda = 9\%$) e o Zn ($p < 0,034$ e $\lambda = 28\%$) foram as variáveis que apresentaram maior correlação com a comunidade de fungos dos tratamentos de *A. mangium* (A e CA) e monocultivo de *E. grandis* respectivamente. De modo geral, a maioria dos atributos estão correlacionados positivamente com os tratamentos de acácia (A e CA) (Figura 19).

Figura 19. Análise de redundância (RDA) entre os perfis da comunidade de fungos da rizosfera e os atributos químicos e biológicos, de todos os tratamentos e profundidades de 0-10, 10-20, 20-50 e 50-100 cm.

Na camada de 0-10 cm, o NO_3^- ($p < 0,006$ e $\lambda = 28\%$) e Mg ($p < 0,032$ e $\lambda = 15\%$) (Figura 20-A) foram os atributos que apresentaram correlação positiva com os tratamentos A e CA, e correlação negativa com o tratamento E, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Rachid et al. (2013) ao avaliar os teores de nitrato em tratamentos com *A. mangium*. Contudo, neste último trabalho, foi analisado o solo não rizosférico, o que sugere que a influência de *A. mangium* na modificação da comunidade de fungos pode ocorrer nesses dois ambientes.

Na camada de 10-20 cm, os atributos de maior índice de significância e porcentagem de explicação com a comunidade de fungos foram o Mn ($p < 0,002$ e $\lambda = 27\%$), o K ($p < 0,028$ e $\lambda = 15\%$) e o Zn ($p < 0,004$ e $\lambda = 16\%$), que mostraram correlação negativa com os tratamentos E e CE (Figura 20-B). Na camada de 20-50 cm, respectivamente, os atributos K ($p < 0,024$ e $\lambda = 22\%$) e Zn ($p < 0,032$ e $\lambda = 18\%$) apresentaram maior correlação negativa com os

tratamentos de eucalipto (Figura 20-C). Na camada de 50-100 cm, o Mg ($p < 0,002$ e $\lambda = 25\%$) foi o atributo que apresentou correlação negativa com a estrutura da comunidade de fungos no tratamento CE (Figura 20-D).

Figura 20. Análise de redundância (RDA) entre os perfis da comunidade de fungos da rizosfera e os atributos químicos e biológicos, de todos os tratamentos nas profundidades de 0-10 cm (A), 10-20 cm (B), 20-50 cm (C) e 50-100 cm (D).

Não foi possível encontrar um padrão entre os atributos que melhor explicam as diferenças na estrutura da comunidade de fungos da rizosfera nas camadas abaixo de 10 cm. Porém, mesmo não apresentando correlação significativa, a maioria dos atributos encontram-

se relacionados positivamente com os tratamentos de *A. mangium*, indicado que essa espécie possui a capacidade de melhorar nutricionalmente sua rizosfera, e isso pode ter promovido uma separação na estruturação da comunidade de fungos. O tratamento E apresentou uma estrutura distinta, enquanto que o CE mostrou uma tenência de estrutura intermediária, conforme visto na figura 18, confirmando a influência da *A. mangium* na estruturação da comunidade. 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).

Na camada mais profunda (50-100 cm), a influência da planta sobre a comunidade de fungo parece ser menor, visto que nesta profundidade as condições físicas, químicas e biológicas passam a ser limitantes para o desenvolvimento desses micro-organismos. Além disso, como já discutido, há uma redução na abundância de fungos com o aumento da profundidade do solo, o que também pode reduzir a abundância na rizosfera, já que a comunidade biológica da rizosfera é composta de organismos recrutados a partir de biodiversidade total encontrada no solo adjacente.

7. CONCLUSÃO

Os sistemas de monocultivos e consórcio de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium*, aos 2 anos de implantação, apresentaram poucas variações nos atributos físicos, químicos e biológicos entre os tratamentos. As principais mudanças encontradas nos atributos avaliados se deram quando foram comparadas as profundidades do solo. As camadas superficiais apresentam condições físicas, com menor densidade e maior umidade; químicas, com maiores concentrações de nutrientes; e biológicas, como menor atividade metabólica (qCO_2) e maior alocação de carbono na biomassa ($qMIC$), favoráveis ao desenvolvimento fúngico em relação as camadas abaixo de 10 cm. A rizosfera também apresentou maiores teores de nutrientes nas camadas acima de 10 cm, e as concentrações de nutrientes foram maiores em relação ao solo.

A *A. mangium* promoveu maiores concentrações nos teores de N, NH_4^+ e NO_3^- no solo e na rizosfera, porém não foi observado esse efeito nas áreas de consórcio com *E. grandis*. Não houve a formação de micorriza arbuscular nas plantas de *A. mangium*, a qual teve correlação negativa com a maior concentração de nutrientes nas raízes de *A. mangium* (A e CA). Não houve correlação entre a presença de esporos de FMA viáveis no solo e a colonização das raízes.

A ausência de arbúsculos e presença de hifa *coils* indicaram que a colonização micorrízica arbuscular nas plantas de *E. grandis* é do tipo *Paris*. Tanto a *A. mangium* quanto o *E. grandis* formaram associação com fungos ectomicorrízicos e esta apresentou variações estruturais de acordo com as características dos simbiontes. Tanto a colonização micorrízica quanto o número de esporos no solo reduziram com o aumento da profundidade, porém foi encontrada a presença destes em todas as camadas avaliadas (0-10, 10-20, 20-50 e 50-100 cm).

A abundância de cópias do gene ITS no solo foi menor do que na rizosfera. Em ambos ambientes (solo e rizosfera) houve redução da abundância com o aumento da profundidade, porém para rizosfera esse efeito foi menor. Plantas de *A. mangium* tem maior influência sobre a comunidade de fungos, pois o monocultivo de *E. grandis* apresentou, mesmo com sobreposição, diferenciação de grupos quando comparados aos demais tratamentos, sendo esse efeito mais evidente na região da rizosfera. A maior influência na estruturação da comunidade de fungos, incluindo os micorrízicos, foi devido às condições químicas do ambiente (solo, rizosfera e raiz) promovidas pelas espécies vegetais.

Desta maneira, as hipóteses propostas neste trabalho foram confirmadas, fornecendo uma visão ecológica sobre os aspectos microbiológicos do solo associados à comunidade de

fungos em monocultivos e em consórcio entre *E. grandis* e *A. mangium*. Informações obtidas de pesquisas como estas podem contribuir na compreensão das interações que ocorrem entre o solo, a rizosfera e a planta, e esses conhecimentos possibilitam a manipulação do microbioma de forma benéfica, podendo auxiliar na produção florestal e no uso mais sustentável do meio ambiente. Vale ressaltar a importância de trabalhos futuros que adotem tecnologias de sequenciamento de DNA em larga escala, para melhor entendermos sobre a diversidade taxonômica e funcional dos principais grupos de fungos aqui estudados.

REFERÊNCIAS

- ABOIM, M. C. R. et al. Soil bacterial community structure and soil quality in a slash-andburn cultivation system in Southeastern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 38, n. 2, p. 100–108, 2008.
- ABRAF. **Yearbook statistical ABRAF 2013 base year 2012**. Brasília, 2013.
- AGERER, R. **Colour atlas of ectomycorrhizae**, 1st-7th edn, Einhorn, Schwäbisch Gmünd, 1987–1993.
- ALEF, K. et al **Methods in applied soil microbiology and biogeochemistry**. 1st ed. London: Academic, 1995.
- ALLISON, V. J. et al. Changes in enzyme activities and soil microbial community composition along carbon and nutrient gradients at the Franz Josef chronosequence, New Zealand. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1779-1781, 2007.
- ANDERSON, J. P. E. et al. The metabolic quotient for CO₂ ($q\text{CO}_2$) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental condition, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p. 393- 395, 1993.
- ANDERSON, J. P. E. Soil Respiration. In: PAGE, A.L. et al. (Eds.) **Methods of Soil Analysis**, part 2, 2^a ed. Madison: ASA/SSSA, p. 837-871, 1982.
- ANDRADE, A. B. et al. Deposição e decomposição da serapilheira em povoamentos de *Mimosa caesalpinifolia*, *Acacia mangium* e *Acacia holosericea* com quatro anos de idade em Planossolo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 777-785, 2000.
- ANDREOTE, F. D. et al. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 417-432, 2009.
- ANSARI, T. M. et al. Heavy metals in marine pollution perspective: a mini review. **Journal of Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2004.

- ARAGÓN, A. et al. Maximum compactibility of Argentine soils from the Proctor test; the relationship with organic carbon and water content. **Soil & Tillage Research**, v. 56, p.197-204, 2000.
- ARVIDSSON, J. Influence of soil texture and organic matter content on bulk density, air content, compression index and crop yield in field and laboratory experiments. **Soil & Tillage Research**, v. 49, p. 159-170, 1998.
- AVIO, L. et al. Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 242-253, 2009.
- AZEVEDO, A.C. et al. **Solos e ambiente: Uma introdução**. 2.ed. Santa Maria, Pallotti, 100p., 2006.
- BABICH, H. et al. Toxicity of zinc to fungi, bacteria and coliphages: Influence of chloride ions. **Applied and environmental microbiology**, v. 36, p. 906-914, 1978.
- BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 233–266, 2006.
- BAKKER, M. R. et al. Fine root distribution of trees and understory in mature stands of maritime pine (*Pinus pinaster*) on dry and humid sites. **Plant Soil**, v. 286, p. 37-51, 2006.
- BAKKER, PETER A. H. M. et al. “The Rhizosphere Revisited: Root Microbiomics.” **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 165, 2017.
- BALDRIAN P. et al. Estimation of fungal biomass in forest litter and soil. **Fungal Ecology**, v. 6, p. 1–11, 2013.
- BALDRIAN, P. et al. Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. **Plant Soil**, v. 338, p. 111–125, 2011.

- BALIEIRO, F. et al. Dinâmica da serapilheira e transferência de nitrogênio ao solo, em plantios de *Pesudosamanea guachapele* e *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 597–601, 2004.
- BALIEIRO, F. et al. Soil carbon and nitrogen in pasture soil reforested with *Eucalyptus* and *Guachapele*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1253–1260, 2008.
- BALL, B. C. et al. Soil compactibility in relation to physical and organic properties at 156 sites in UK. **Soil & Tillage Research**, v. 57, p. 83-91, 2000.
- BANDOU, E. et al. The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt stress in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. **Mycorrhiza**, v. 16, p. 559-565, 2006.
- BANU, N. A. et al. Soil microbial biomass and microbial biodiversity in some soils from New South Wales, Australia. *Australian Journal of Soil Research*, v. 42, p. 777-782, 2004.
- BARETTA, D. Análise multivariada de atributos microbiológicos e químicos do solo em florestas com *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2683-2691, 2008.
- BARRET, M. et al. Functional genomic analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, p. 729–743, 2011.
- BARRETT, J. T. Synthesis of mycorrhiza with pure cultures of *Rhizopagus*. **Phytopathology**, v. 48, p. 391, 1958.
- BAUHUS, J. et al. Aboveground and belowground interactions in mixed plantations of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Canadian Journal Forestry Research**, v. 30, p. 1886-1894, 2000.
- BAUMGARTL, T. et al. Effect of aggregate stability on soil compaction. **Soil & Tillage Research**, v. 19, p. 203-213, 1991.
- BEDINI, S. et al. Paris-type mycorrhizas in *Smilax aspera* L. growing in a Mediterranean sclerophyllous wood. **Mycorrhiza**, v. 10, p. 9–13, 2000.

- BEHERA N. et al. Soil microbial biomass and activity in response to *Eucalyptus* plantation and natural regeneration on tropical soil. **Forest Ecology & Management**, v. 174, p. 1–11, 2003.
- BERBARA, R.L.L. et al. III - Fungos Micorrízicos Arbusculares: Muito Além da Nutrição. **Nutrição Mineral de Plantas**, SBCS, 432p., 2006.
- BERG, G. et al. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, p. 1–13, 2009.
- BERTHRONG, S. T. et al. Afforestation alters the composition of functional gene in soil and biogeochemical processes in South American Grasslands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6240-6248, 2009.
- BERTINI, S. C. B. Indicadores microbiológicos de qualidade do solo em Florestas de Araucária no Estado de São Paulo. 2010. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- BETHLENFALVAY, G. J. et al. Glycine–Glomus–Rhizobium symbiosis II. Antagonistic effects between mycorrhizal colonization and nodulation. **Plant Physiology**, v. 79, p. 1054–1058, 1985.
- BINI, D. **Atributos microbianos e químicos do solo e da serapilheira em plantios puros e mistos de *Eucalyptus* e *Acacia mangium***. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- BINI, D. et al. 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**, v. 37, p. 76-85, 2013a.

- BINI, D. et al. *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**, v. 63, p. 57-66, 2013.
- BINKLEY, D. et al. Soil phosphorus pools and supply under the influence of *Eucalyptus saligna* and nitrogen-fixing *Albizia falcataria*. **Forest Ecology and Management**, v. 128, p. 241-247, 2000.
- BINKLEY, D. et al. Sustainable management of *Eucalyptus* plantations in a changing world. In BORRALHO, N. et al. IUFRO Conference – *Eucalyptus* in a changing world. **Anais**. p. 7, 2004.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.
- BONFIM, J. A. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas restauradas de Mata Atlântica, São Paulo, Brasil**. Dissertação - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- BONNASSIS, P. A. P. **Caracterização de isolados fúngicos ectomicorrízicos na promoção do crescimento e na colonização radiculat de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. Dissertação - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- BONONI, V.L.R. et al. Micorrizas vesículo-arbusculares em amendoim e em plantas invasoras da cultura. **Hoehnea**, v. 15, p. 1-9, 1988.
- BOUILLET, J. P. et al. Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil 2: Nitrogen accumulation in the stands and biological N₂ fixation. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 12, p. 3918–3930, 2008.
- BRAIDA, J. A. et al. Resíduos vegetais na superfície e carbono orgânico do solo e suas relações com a densidade máxima obtida no ensaio proctor. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, v. 30, p. 605-614, 2006.

- BRANDÃO, E. D. et al. Formação e estabilização de agregados pelo sistema radicular de braquiária em um Nitossolo Vermelho. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1193-1199, 2012.
- BRANDÃO, E. M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N. et al. (Eds.). **Microbiologia do solo**. Campinas: SBSCS, p. 1-15, 1992.
- BROOKES, P. C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and fertility of Soils**, v. 19, p. 269-279, 1995.
- BRUNDRETT M. et al. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. **ACIAR Monograph**, v. 32, 374 p., 1996.
- BRUNDRETT, M. et al. The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants. II. Structural aspects of morphology. **New Phytologist**, v. 114, p. 469-479, 1990.
- BURKE D. J. et al. Vegetation and soil environment influence the spatial distribution of root-associated fungi in a mature beech-maple forest. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7639-7648, 2009.
- CAIRNEY J. W. G. Extramatrical mycelia of ectomycorrhizal fungi as moderators of carbon dynamics in forest soil. **Soil Biology and Biochemistry** v. 47, p. 198-208, 2012.
- CAMPOS, B. C. et al. Estabilidade estrutural de um Latossolo Vermelho-Escuro distrófico após sete anos de rotação de culturas e sistemas de manejo de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 19, p. 121-126, 1995.
- CAMPOS, D. T. D. S. et al. Colonização micorrízica em plantios de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 35, p. 965-974, 2011.
- CAMPOS, D.T.S. **Diversidade de fungos ectomicorrízicos em povoamentos de eucalipto**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- CAPRONI, A. L. et al. Fungos micorrízicos arbusculares em estéril revegetado com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita. **Revista Árvore**, v. 29, p. 373-381, 2005.

- CARDOSO, E. J. B. N et al. **Microbiologia do Solo**. 2º ed., Piracicaba: ESALQ, 221 p., 2016.
- CARDOSO, E. J. B. N. et al. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 360 p., 1992
- CARDOSO, E. J. B. N. et al. Soil health : looking for suitable indicators . What should be considered to assess the effects of use and management on soil health ? **Scientia Agricola**, v. 70, p. 274–289, 2013.
- CARDOSO, E.J.B.N et al. Importance of Mycorrhizae in Tropical Soils. In Azevedo et al. (Eds.). **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, p.245 – 268, 2017.
- CARDOSO, E.J.B.N. et al. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In. SIQUEIRA, J.O. et al (Eds.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**, Lavras: Ed. UFLA, v. 1, p. 153-215, 2010.
- CARNEIRO, M. A. C. et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. **Cerne**, v. 4, n. 1, p. 129-145, 1998.
- CARPENEDO, V. et al. Estado de agregação e qualidade de gregados de Latossolos Roxos, submetidos a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, p. 99-105, 1990.
- CARRENHO, R. **Efeitos dos fungicidas sistêmicos fosetil-AI e metalaxil-mancozeb sobre as populações nativas de fungos micorrízicos arbusculares e sobre o estabelecimento natural da associação micorrízica em mudas cítricas (combinação varietal *Citrus sinensis* Osbeck *Citrus limonia* L.)**. Dissertação – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1993.
- CARTER, M. R. Microbial biomass as an index for tillage-induced changes in soil biological properties. **Soil & Tillage Research**, v. 7, p. 29-40, 1986.

- CARVALHO, T. S. et al. Simbiose tripartites: leguminosas, fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Eds.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA, p. 383-413, 2010.
- CATFORD, J. G. et al. Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors, **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 1481–1487, 2003.
- CAVAGNARO, T.R. et al. Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. **New Phytologist**, v. 151, p. 469–475, 2001.
- COELHO, S. R. F. et al. Crescimento, nutrição e fixação biológica de nitrogênio em plantios mistos de eucalipto e leguminosas arbóreas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 6, p. 759-768, 2007.
- COLOZZI FILHO, A. et al. Microrganismos e processos biológicos no sistema plantio direto. In: SIQUEIRA, J.O. et al. (Eds). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, p.487-508, 1999.
- CORDEIRO, M. A. S. et al. Atributos bioquímicos e químicos do solo rizosférico e não rizosférico de culturas em rotação no sistema de semeadura direta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 6, p. 1794-1803, 2012.
- COSTA, C. M. C. et al. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 893–901, 2001.
- COSTA, C. M. C. et al. Inoculum density of arbuscular mycorrhizal fungi need to promote growth of *Hancornia speciosa* Gomes seedlings. **Fruits**, v. 58, p. 247–254, 2003.
- DANIELSEN L. et al. Ectomycorrhizal colonization and diversity in relation to tree biomass and nutrition in a plantation of transgenic poplars with modified lignin biosynthesis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59207, 2013.

- DICKSON, S. The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. **New Phytologist**, v. 163, p. 187- 200, 2004.
- DIONÍSIO, J. A. **Atividades microbianas em diferentes sistemas de cultivo de *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex Maiden)**. Tese (Doutorado) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.
- DOORNBOS, R. F . et al. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 32, p. 227-243, 2012.
- DORAN, J. W. et al. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W. et al. (Eds.) **Defining soil quality for sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, p.3-21, 1994.
- DOUDS D. D. Jr. Relationship between hyphal and arbuscular colonization and sporulation in a mycorrhiza in *Paspalum notatum* Flugge. **New Phytologist**, v. 126, p. 233-237, 1994.
- DUCOUSSO, M. et al. Diversity of Ectomycorrhizal Fungi Associated with *Eucalyptus* in Africa and Madagascar. **International Journal of Forestry Research**, 2012.
- EGGLETON, W. Studies on the microbiology of grassland soil. Part I. General chemical and microbiological features. *The Journal of Agricultural Science*, v. 24, n. 3, p.416-434, 1934.
- EKBLAD A. et al. The production and turnover of extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi in forest soils: role in carbon cycling. **Plant and Soil**, v. 366, p. 1–27, 2013.
- EMBRAPA. Leguminosas eliminam aplicação de nitrogênio em florestas de eucalipto - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/23827807/legumes-eliminate-need-to-apply-nitrogen-in-eucalyptus-forests>>. Acesso em: 4 out. 2017.
- EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro, 212 p., 1997.

- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2 ed. Rio de Janeiro, 2006.
- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília, 353p., 2013.
- FEIGL, B. J. et al. Soil microbial biomass in Amazonian soils: evaluation of methods and estimates of pool sizes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p. 1467-1472, 1995.
- FIERER, N. et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4117-4120, 2005.
- FIERER, N. et al. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7059–7066, 2007.
- FISHER, D. B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, p. 92–96, 1968.
- FOLLET, R. F. et al. Effect of tillage practices on microbial biomass dynamics. **Soil Science Society of America Journal**, v. 53, p. 1091-1096, 1989.
- FONSECA, E. D. S. et al. The Microbiome of *Eucalyptus* Roots under Different Management Conditions and Its Potential for Biological Nitrogen Fixation. **Microbial Ecology**, p. 1–9, 2017.
- FORD, D. J. et al. Role of soil drying in nitrogen mineralization and microbial community function in semi arid grasslands of north-west Australia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1557-1569, 2007.
- FORRESTER, D. I. et al. Growth dynamics in a mixed-species plantation of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Forest Ecology and Management**, v. 193, p. 81–95, 2004.
- FORSTER, S. M. et al. Aggregation of sand from a maritime embryo sand dune by microorganisms and higher plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 13, p. 199-203, 1981.

- FOUNOUNE, H. et al. Influence of the dual arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal symbiosis on the growth of *Acacia holosericea* (A. Cunn. ex G. Don) in glasshouse conditions. **Annals of Forest Science**, v. 59, n.1, p. 93-98, 2002.
- FREITAS, T. A. S. et al. Dynamics of roots of arboreal species: vision of the literature. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 1, p. 133-142, 2008.
- FREIXO, A. A. et al. Quantificação de microorganismos em solos sob plantio puro de *Pseusamanea guachapele* (Kunth) Harms e em consórcio com *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Comunicado Técnico – Embrapa Agrobiologia**, n. 39, p. 1-8, jul. 2000.
- GADD, G. M. et al. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, p. 311- 316, 2001.
- GALLAUD, I. **Études sur les Mycorrhizes Endotrophes**. Lille, France: le Bigot Frères, 1904.
- GAMA-RODRIGUES E. F. et al. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 393–901, 2005.
- GARBEVA, P. et al. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 233-246, 2006.
- GARBEVA, P. et al. Transcriptional and antagonistic responses of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 to phylogenetically different bacterial competitors. **The ISME Journal**, New York, v. 5, p. 1–13, 2011.
- GARDES, M. et al. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 113–118, 1993.
- GERDEMANN, J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhizae formed on maize and tuliptree by *Endogone fasciculata*. **Mycologia**, v. 57, p. 562-575, 1965.

- GIACHINI, A. J. et al. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycologia**, v. 92, p. 1166-1177, 2000.
- GIOVANETTI, M. et al. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, v. 84, p. 489-500, 1980.
- GIOVANNETTI, M. et al. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500, 1980.
- GIRVAN, M. S. et al. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1800-1809, 2003.
- GOMES, S. P. et al. Fungos micorrízicos arbusculares (Glomales, Zygomycota) na Ilha dos Eucaliptos, Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n.3, p. 393-401, 1998.
- GONÇALVES, J. L. de M. et al. **Nutrição e Fertilização Florestal**. Piracicaba: IPEF, 427 p., 2000.
- GONÇALVES, J. L. M. et al. Mineralização de nitrogênio em ecossistemas florestais naturais implantados do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 601-616, 2001.
- GONÇALVES, J. L. M. **Características do sistema radicular de absorção do *Eucalyptus grandis* sob diferentes condições edáficas**. Tese (Livre Docência em Ciências Agrárias) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- GONZALEZ, J. A. Z. et al. 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**, v. 33, p. 555-562, 2009.

- GOODMAN, D. M. et al. **A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae**. Sidney: Mycologue Publications, 110 p., 1996-1998.
- GRANDI, R. A. P. et al. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em Marantaceae cultivadas no Instituto de Botânica, São Paulo, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 14, n. 2, p. 89-95, 1991.
- GRAYSTON, S. J. et al. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, 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**, v. 57, p. 2-12, 2006.
- GUMIERE, T. et al. Biogeographical patterns in fungal communities from soils cultivated with sugarcane. **Journal of Biogeography**, v. 43, p. 2016–2026, 2016.
- GURGEL, F.E. et al. New records of Scleroderma from Northeastern Brazil. **Mycotaxon**, n. 105, p. 399 – 405, 2008.
- HARMAND, J. M. et al. Aboveground and belowground biomass, productivity and nutrient accumulation in tree improved fallows in the dry tropics of Cameroon. **Forest Ecology and Management**, v. 188, p. 249-265, 2004.
- HARTMANN, A. et al. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1-2, p. 7-14, 2008.
- HENDRICKS J. J. et al. Ectomycorrhizal fungal mycelia turnover in a longleaf pine forest. **New Phytologist**, v. 209, p. 1693– 1704, 2016.
- HENDRIX, P. F. et al. Soil respiration in conventional and no-tillage agroecosystems under different winter cover crop rotations. **Soil & Tillage Research**, v. 12, p.135-148, 1988.
- HOOGH, R. et al. Avaliação de sítio para *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze em povoamentos artificiais. **Brasil Florestal**, v. 10, n. 37, p. 19-92, 1979.

- IBÁ. **Relatório Anual**. Indústria Brasileira de Árvores, p. 100, 2016.
- INGLEBY, K. et al. **Identification of ectomycorrhizas**. ITE Research Publication, n. 5, London: Her Majesty's Stationary Office Publications Centre, 1990.
- JACQUELINET-JEANMOUGIN, S. et al. "Endomycorrhizas in the Gentianaceae. I. The Fungi Associated with *Gentiana Lutea* L.". **The New Phytologist**, v. 95, no. 4, p. 663–666, 1983.
- JAKOBSEN I. et al. 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.
- JENKINS, W. R. A rapid centrifugal – flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 692, 1964.
- JENKINSON, D. S. et al. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E. A. et al. (Eds). **Soil Biology and Biochemistry**. v. 5, p. 415-471, 1981.
- Jl, G. et al. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 2707- 2708, 1995.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137–138, 1965.
- KASEL, S. et al. Land uses influences soil fungal community composition across central Victoria, south-eastern Australia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 1724- 1732, 2008.
- KASEL, S. et al. Land-use history, forest conversion, and soil organic carbon in pine plantations and native forests of south eastern Australia. *Geoderma*, v. 137, p. 401–413, 2007.
- KASUYA, M. C. et al. Ectomicorrizas no Brasil: biologia e nutrição de plantas. In: SIQUEIRA, J. O. et al. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, p. 153–214, 2010.

- KIM, J. S. et al. FAME analysis to monitor impact of organic matter on soil bacterial populations. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 382-388, 2002.
- KOSKE, R. E. et al. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v.92, p.488-505, 1989.
- KOTTKE, I. et al. The cellular structure of the Hartig net: coenocytic and transfer cell-like organization. **Nordic Journal of Botany**, v. 7, p. 5–95, 1987.
- KOURTEV, P. S. et al. Enzyme activities during litter decomposition of two exotic and two native plant species in hardwood forests of New Jersey. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 1207-1218, 2002.
- KRÜGNER, T. L. et al. Efeito dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris* e de fertilização mineral no crescimento e sobrevivência de *Pinus caribaea* var. *bahamensis*, em condições de campo, no litoral sul da Bahia. **IPEF**, v. 21, p. 41-63, 1980.
- LACLAU, J. P. et al. Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil 1. Growth dynamics and aboveground net primary production. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 12, p. 3905–391, 2008.
- LACLAU, J. P. et al. The function of the superficial root mat in the biogeochemical cycles of nutrients in Congolese Eucalyptus plantations. **Annals of Botany**, v. 93, p. 249-261, 2004.
- LAMBAIS, M.R. et al. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Eds.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: SBCS, v. 4, p. 43-84, 2005.
- LAURINDO, M. C. O. et al. Atributos físicos do solo e teor de carbono orgânico em sistemas de plantio direto e cultivo mínimo. **Engenharia na agricultura**, n. 17, p. 367-374, 2009.

- LECKIE, S. E. et al. Characterization of humus microbial communities in adjacent forest types that differ in nitrogen availability. **Microbial Ecology**, v. 48, p. 29-40, 2004.
- LIMA, R. L. F. A. et al. Propágulos de fungos micorrízicos arbusculares em solos deficientes em fósforo sob diferentes usos, da região semi-árida no nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 257-268, 2007.
- LIU, H. et al. The study of the ecological problems of *Eucalyptus* plantation and sustainable development in Maoming Xiaoliang. **Journal of Sustainable Development**, v. 3, p. 197–201, 2010.
- LIU, W. T. et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4516-4522, 1997.
- LORENZO P. et al. Alelopatía: una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales. **Ecosistemas**, v. 19, n. 1, p. 79-91, 2010.
- LUXHØI, J. et al. Carbon and N turnover in moist sandy soil following short exposure to a range of high soil temperature regimes. **Australian Journal of Soil Research**, v. 46, p. 710–718, 2008.
- LYNCH, J. M. et al. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant Soil**, v. 129, p. 1–10, 1990.
- MALAJCZUK, N. et al. Presence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Eucalyptus* spp. and *Acacia* sp. and their absence in *Banksia* sp. after inoculation with *Glomus fasciculatum*. **New Phytologist**, v. 87, p. 567–572, 1981.
- MALAVOLTA, E. et al. **Avaliação do Estado Nutricional das Plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 319p., 1997.

- MARQUES, J. P. R. New staining technique for fungal-infected plant tissues. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, p. 784-787, 2013.
- MENDES, L. W. **Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso - SP**. Dissertação – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- MICALLEF, S. A. et al. Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 1729–1742, 2009.
- MIRANDA, C. C. **Caracterização da matéria orgânica do solo em fragmentos de Mata Atlântica e em plantios abandonados de eucalipto Reserva Biológica União-RJ**. Dissertação - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos do Goytacazes, 2005.
- MIRANDA, J. C. C. et al. Effects of soil and plant phosphorus concentrations on vesicular-arbuscular mycorrhiza in sorghum plants. **New Phytologist**, v. 112, p. 405-410, 1989.
- MOESENEDER, M. M. et al. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 159-172, 2001.
- MOREIRA, F. M. S. et al. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 626p., 2002.
- MOREIRA, F. S. et al. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 729 p., 2006.
- MOREIRA-SOUZA, M. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Mycorrhiza**, v. 13, p. 211-215, 2003.

- MORTIMER, P. E. et al. The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. **Soil Biol Biochem**, v. 40, p. 1019-1027, 2008.
- MORTON, J.B. et al. Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. **Mycotaxon**, v. 48, p. 491-528, 1993.
- NANNIPIERI, P. et al. Biological processes. In: BEMBI, D.K.; NIEDER, R. (Eds.). **Processes in the soil-plant system: modelling concepts and applications**. Binghamton: The Haworth Press, in press, 2003.
- NEHLS, U. et al. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. **Plant Biology**, v. 12, p. 292-301, 2010.
- NETO, F. V. C. et al. Acúmulo e decomposição da serapilheira em quatro formações florestais. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 3, p. 379-387, 2013.
- Novais, C. B. et al. Caracterização fenotípica e molecular de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em banco de germoplasma. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 886-896, 2010.
- OEHL, F. et al. A. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. **The New Phytologist**, v. 165, p. 273-83, 2005.
- OLIVEIRA, J. R. A. et al. Carbono da biomassa microbiana em solos de cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo: avaliação dos métodos fumigação-incubação e fumigação-extração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 863-871, 2001.
- OSTONEN, I. et al. Proportion of fungal mantle, cortex and stele of ectomycorrhizas in *Picea Abies* (L.) Karst. in different soils and site conditions. **Plant and Soil**, v. 257, n. 2, p. 435-42, 2003.
- PAGANO, M. et al. Arbuscular and ectomycorrhizal colonization of two *Eucalyptus* species in semiarid Brazil. **Mycoscience**, v. 49, p. 379-384, 2008.

- PAULA, M. A. et al. Efeito da adição de superfosfato, cultivos e densidade de esporos na infectividade e efetividade de fungos micorrízicos vesicular-arbuscular em solo sob cerrado. **Ciência e Prática Lavras**, v. 11, n. 1, p. 54-64, 1987.
- PAULA, R. R. et al. Evidence of short-term belowground transfer of nitrogen from *Acacia mangium* to *Eucalyptus grandis* trees in a tropical planted forest. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 91, p. 99–108, 2015.
- PAULINO, G. M. Cobertura florestal e qualidade de solo em terras degradadas do Norte Fluminense. Dissertação - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2003.
- PEIXOTO, R. S. et al. A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, p. 403-413, 2010.
- PEIXOTO, R. S. et al. Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados. **Soil and Tillage Research**, v. 90, n. 1-2, p. 16–28, 2006.
- PEREIRA, A. P. A. **Influência da profundidade do solo e do manejo de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* na estrutura das comunidades microbianas do solo.** Dissertação - Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- PEREIRA, A. P. de A. et al. Shifts in the bacterial community composition along deep soil profiles in monospecific and mixed stands of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0180371, 2017.
- PERSSON, J. et al. Nitrogen acquisition from inorganic and organic sources by boreal forest plants in the field. **Oecologia**, v. 137, p. 252–257, 2003.
- PETERSON, R. L. et al. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. **Plant and Soil**, v. 159, p. 79-88, 1994.

- RACHID, C.T.C.C . et al. Mixed plantations can promote microbial integration and soil nitrate increases with changes in the N cycling genes. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 18. p. 146-153, 2013.
- RACHID, C.T.C.C. **Biodisponibilidade de nutrientes e estrutura microbiana do sistema solo-serapilheira em floresta plantada mista de Eucalyptus urograndis e Acacia mangium**. Tese (Doutorado) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- RACHID, C.T.C.C. et al. Physical-chemical and microbiological changes in Cerrado soil under differing sugarcane harvest management systems. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 170, 2012.
- RAIJ, B. van. et al. **Análise química do solo para fins de fertilidade**. Campinas: Fundação Cargil, 170p., 1987.
- RANJARD, L. et al. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4479-4487, 2001.
- RASCHE, F. et al. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. **ISME Journal**, v. 5, p. 1-14, 2010.
- RAVEN, P. H. et al. **Biologia vegetal**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 728p., 1996.
- READ, D. J. **Mycorrhizas and nutrient cycling in sand dune ecosystems**. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, p. 89-110, 1989.
- REICHERT, J. M. et al. Qualidade dos solos e sustentabilidade de sistemas agrícolas. **Ciência & Ambiente**, v. 27, 2003.
- REINERT, D.J. et al. Coluna de areia para medir a retenção de água no solo: protótipos e teste. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1931-1935, 2006.

- REQUENA, N. et al. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhizal establishment. **Phytochemistry**, v. 68, p. 33–40, 2007.
- RIGATTO, P. A. et al. Influência dos atributos do solo sobre a produtividade de *Pinus taeda*. **Revista Árvore**, v. 29, n. 5, p. 701-709, 2005.
- ROCHA, S. P. et al. Propriedades físicas do solo e crescimento de eucalipto implantado em diferentes métodos de preparo do solo. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 43, n. 108, p. 965-977, 2015.
- RODRIGUES, L. A. et al. Uso de micorrizas e rizóbio em cultivo consorciado de eucalipto e sesbânia. I. Crescimento, absorção e transferência de nitrogênio entre plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 4, p. 583-591, 2003.
- ROUATT, J. W. et al. Statistical Evaluation of the Rhizosphere Effect. **Soil Science Society of America Journal**, v. 24, p. 271-273, 1960.
- ROZANE, D. E. et al. Estoque de carbono e estabilidade de agregados de um Latossolo vermelho distrófico, sob diferentes manejos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 1, p. 24-32, 2010.
- SANTANA, M. C. et al. Eucalypt as trap plant to capture associative fungi in soil samples from great depth. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v. 2, n. 5, p. 191–194, 2016.
- SATTER, M. A. et al. Performance of arbuscular mycorrhiza inoculated *Acacia mangium* seedlings on degraded land with different rates of phosphorus. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v. 24, p. 9-13, 2007.
- SCHIAVO, J. A. et al. Recovery of degraded areas revegeted with *Acacia mangium* and *Eucalyptus* with special reference to organic matter humification. **Scientia Agricola**, v. 1, p. 353–360, 2009.
- SCHIAVO, J. A. et al. Produção de mudas de acácia colonizadas com micorrizas e rizóbio em diferentes recipientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 173-178, 2003.

- SILVA, A. P. et al. Influência da compactação nas propriedades físicas de dois Latossolos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 10, p. 91-95, 1986.
- SILVA, E. C. et al. Utilização do nitrogênio da palha de milho e de adubos verdes pela cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2853-2861, 2008.
- SILVA, F.A.M. et al . Exsudação de ácidos orgânicos em rizosfera de plantas daninhas. **Planta daninha**, v. 19, n. 2, p. 193-196, 2001.
- SILVA, M. A. et al . Formação de ectomicorrizas por monócários e dicários de *Pisolithus* sp. e interações nutricionais em *Eucalyptus grandis*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 5, p. 917-929, 2007.
- SILVA, R. F. da. et al . Acumulação e translocação de zinco em mudas de espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 11, p. 1114-1120, 2015.
- SILVA, R. F. et al. Mycorrhizal fungi occurrence in forestry species on of rio grande do sul state the central region. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 15, n. 1-4, p. 65-70, 2009.
- SILVA, R. F. Ocorrência de fungos micorrízicos em espécies florestais na região central do estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 15, n. 1-4, p. 65-70, 2009.
- SIQUEIRA, J. O. Micorrizas arbusculares. In: ARAUJO, R. S. et al. (Eds.) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, p.151-194, 1994.
- SIQUEIRA, J.O. et al. Spores germination and germ tube growth of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Botany**, v. 31, p. 965-972, 1985.
- SKORUPA, A. L. A. **Acumulação e decomposição de serapilheira em povoamentos de eucalipto, na região do Baixo Rio Doce-MG**. Dissertação - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

- SMITH, S. et al. **Mycorrhizal symbiosis**. 3rd ed. Boston: Academic Press, 787 p., 2008.
- SMITH, S.E & READ, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2nd ed. London: **Academic Press**, 605 p., 1997.
- SOTTA, E. D. et al. Soil CO₂ efflux in a tropical forest in central Amazon. **Global Change Biology**, v. 10, p. 601-617, 2004.
- SOUDZILOVSKAIA N. A. et al. Quantitative assessment of the differential impacts of arbuscular and ectomycorrhiza on soil carbon cycling. **New Phytologist**, v. 208, p. 280–293, 2015.
- SOUZA, A. V. et al. Ocorrência de fungos micorrízicos em catuaba (*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza - Bignoniaceae), uma planta medicinal do Cerrado em risco de extinção. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 646-654, 2013.
- SOUZA, J. M. Propriedades físicas do solo de áreas cultivadas com pastagem e eucalipto convertidas de área da floresta atlântica. **Scientia Agraria**, v. 15, n. 4, p. 487-492, 2016.
- SPARLING G. P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. **Australian Journal of Soil Research**, v. 30, p. 195–207, 1992.
- STEFFEN, R. et al. Micorrização das mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden comercializadas no município de Santa Maria, RS. **Ciência e Natura**, v. 32, p. 25-35, 2010.
- STRAUSS, S. Y. Benefits and risks of biotic exchange between *Eucalyptus* plantations and native Australian forests. **Austral Ecology**, v. 26, n. 5, p. 447–457, 2001.
- TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, p. 6213, 2014.
- ter BRAAK, C. J. F. et al. **CANOCO Reference Manual User's Guide to Canoco for Windows**. Microcomputer Power, 352 p, 1998.

- TIBBETT, M. et al. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. **Annals of Botany**, v. 89, p. 783-789, 2002.
- TOMAZELLO FILHO, M. et al. Formação de ectomicorrizas e crescimento de mudas de *Pinus oocarpa*, *P. caribaea* var. *hondurensis* e *P. kesyia* em solo infestado artificialmente com *Thelephora terrestris* e *Pisolithus tinctorius*. **Summa phytopathologica**. 1981.
- TRAPPE, J. M. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. **Botanical Review**, v. 28, p. 538-606, 1962.
- TRATCH, R. et al. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos patogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1131-1139, 1997.
- TRUFEM, S. F. B. et al. Fungos vesículo-arbusculares em plantas ornamentais do Jardim Botânico de São Paulo, SP. **Hoehnea**, v. 17, n. 1, p. 85-89, 1990.
- VALE, D. W. **Efeito da aplicação de nitrogênio nos atributos químicos do solo, na nutrição e na produção de cana-de-açúcar**. Dissertação - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, 2009.
- VAN DER HEIJDEN, M. G. A. et al. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology letters**, v. 11, n. 3, p. 296–310, 2008.
- VANCE, E. D. et al. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 9, p. 703-707. 1987.
- VASCONCELLOS, R. L. F. et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Glomalin-Related Soil Protein as Potential Indicators of Soil Quality in a Recuperation Gradient of the Atlantic Forest in Brazil. **Land Degradation & Development**, v. 27, p. 325–334, 2016.
- VEZZANI, F. M. et al. Uma visão sobre qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 743-755, 2009.

- VIERA, M. et al. Plantio misto de *Eucalyptus* spp. com leguminosas arbóreas fixadoras de nitrogênio. **Floresta Ambient**, v. 20, n. 1, 2013.
- VIERHEILIG, H. et al. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 5004–5007, 1998.
- VIERHEILIG, H. Regulatory mechanisms during the plant-arbuscular mycorrhizal fungus interaction. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, p. 1166-1176, 2004.
- VOIGTLAENDER, M. et al. Introducing *Acacia mangium* trees in *Eucalyptus grandis* plantations: consequences for soil organic matter stocks and nitrogen mineralization. **Plant Soil**, p. 352: 99, 2012.
- WAKELIN, S. A. et al. Pasture management clearly affects soil microbial community structure and N-cycling bacteria. **Pedobiologia**, v. 52, p. 237-251, 2009.
- WALLANDER, H. et al. Production, standing biomass and natural abundance of ¹⁵N and ¹³C in ectomycorrhizal mycelia collected at different soil depths in two forest types. **Oecologia**, v. 139, p. 89–97, 2004
- WARDLE, D. A. Comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biology Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 67, p. 321-358, 1992.
- WEHNER, J. et al. Indigenous arbuscular mycorrhizal fungal assemblages protect grassland host plants from pathogens. **PLoS ONE**, v. 6, p. 27-81, 2011.
- WEIS, J. H. et al. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. **Trends in Genetics**, v. 8, p. 263–264, 1992.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis (Ed.); **PCR protocols a guide to methods and applications**, p. 315–322, 1990.

- WILKINS, W. H. et al. The ecology of the larger fungi. IV. The seasonal frequency of grassland fungi with special reference to the influence of environmental factors. **Annals of Applied Biology**, v. 27, n. 1, p. 17-34, 1940.
- WILKINS, W. H. et al. The ecology of the larger fungi. V. An investigation into the influence of rainfall and temperature on the seasonal production of fungi in a beechwood and a pinewood. **Annals of Applied Biology**, v. 33, n. 2, p. 179-188, 1946.
- ZAK, D. R. et al. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? *Ecology*, v. 84, n. 8, p. 2042-2050, 2003.
- ZANGARO, W. et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Itabagi, Paraná, **Cerne**, v. 8, n.1, p.77-87, 2002.
- ZANGARO, W. et al. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from South Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 19, p. 315-324, 2003.
- ZANGARO, W. et al. 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**, v. 23, p. 53-62, 2007.
- ZHANG, X.F. et al. Soil moisture effect on bacterial and fungal community in Beilu River (Tibetan Plateau) permafrost soils with different vegetation types. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 1054–1065, 2013.
- ZHOU, J. Z. et al. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 326-334, 2002.
- ZINN, Y. L. et al. Eucalypt plantation effects on organic carbon and aggregation of three different-textured soils in Brazil. **Soil Research**, v. 49, n. 7, p. 614–624, 2011.

ZONTA, E. et al. O sistema radicular e suas interações com o ambiente edáfico.
In: FERNANDES, M.S. (Ed). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS,
p.7-52, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Análise de redundância (RDA) entre os perfis da comunidade de fungos do solo e os atributos químicos e biológicos, de todos os tratamentos nas profundidades de 0-10 cm (A), 10-20 cm (B), 20-50 cm (C) e 50-100 cm (D).

APÊNDICE B.

Análise de Coordenadas Principais (PCoA) do perfil de fungos do solo e da rizosfera obtido por T-RFLP. Os agrupamentos foram baseados na dissimilaridade de *Bray-Curtis*. A = todos os tratamentos avaliados; B = monocultivo de *Eucalyptus grandis*; C = monocultivo de *Acacia mangium*; D = consórcio de *E. grandis* e E = consórcio de *A. mangium*.

APÊNDICE C. Coleta das raízes e rizosfera nas áreas de monocultivos e consórcios de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium*.

APÊNDICE D. Diferenças morfológicas entre as raízes de *E. grandis* e *A. mangium* no plantio consorciado.

APÊNDICE E. A = Trincheira com 1 metro de profundidade; B = Coleta de amostra para a análise de densidade do solo; C = Amostra de solo no anel de Kopeck, sendo envolta com papel alumínio para evitar a perda da umidade.

Análises histoquímicas de ECM

Amostras teciduais de ECM e de raízes sem aparente colonização fúngica, presentes nos diferentes tratamentos e na profundidade de 0-10 cm do solo foram fixadas em solução Karnovsky (1965). Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação em série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 e 100% v/v), seguido pela inclusão em resina de hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica®, Heidelberg, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Secções transversais a 5 µm de espessura foram realizadas nos blocos contendo as amostras radiculares empregando navalhas de aço do tipo C acopladas a micrótomo rotativo manual.

Para o monitoramento do status metabólico das ECM, as secções histológicas foram submetidas à dupla coloração com o reagente ácido periódico de Schiff e naphtol blue black (FISHER, 1968) e montadas em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®). Como resultado, os polissacarídeos presentes nas paredes celulares, no citoplasma e os amiloplastos foram corados em cor-de-rosa e os compostos fenólicos corados em laranja para o reagente ácido periódico de Schiff, ao passo que as proteínas foram coradas em azul para o naphtol blue black.

As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio óptico (OLYMPUS BX40) e em estereomicroscópio Micronal, sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera Motic® Images Plus 2.0.

As análises histoquímicas com os reagentes PAS e naphtol blue black realizadas nas ECM em todos os tratamentos avaliados (Apêndice F) evidenciaram a presença elevada de amiloplastos e polissacarídeos nas células do córtex e da epiderme das plantas de *E. grandis* e *A. mangium*, independente do sistema de manejo (Apêndice F, figuras C-J). Também foi possível identificar a presença de hifas e manto fúngico (Apêndice F, figuras C-J).

Comparando as secções das raízes (Apêndice F, figuras A-B) com as de ECM (Apêndice F, figuras C-J) foi possível observar que a simbiose é a responsável por aumentar a concentração de carboidratos (amido e outros polissacarídeos) nas raízes. Nehls et al (2010) reportou que a presença do fungo ectomicorrízico, assim como a formação da simbiose (planta + fungo) aumenta a demanda de carboidratos nas raízes das plantas. Além disso, as plantas hospedeiras controlam e restringem o fluxo de carboidratos em relação ao fungo para evitar o parasitismo. Fato este decorrente do controle da exportação de sacarose e hidrólise se o fungo simbionte não fornecer nutrientes minerais suficientes.

APÊNDICE F. Fotomicrografia de secções transversais de raízes de *Eucalyptus grandis* em sistema de consórcio (A e B), de ectomicorizas em raízes de *E. grandis* e *Acacia mangium* em sistemas de monocultivos (B-C e E-F respectivamente) e consórcio (G-H e I-J respectivamente). Ep = Epiderme; C = Córtex; M = Manto; h = Hifas; Setas pretas = Compostos fenólicos, Setas brancas = Polissacarídeos; Setas verdes = Amiloplastos; Setas azuis = Proteinoplastos. Barras = 10 µm.

ANEXOS

ANEXO A. Atributos físicos do solo, sendo as profundidades (cm): a = 0-10; b = 10-20; c = 20-50; d = 50-100 e os tratamentos: E = monocultivo de eucalipto; A = monocultivo de acácia; CE = consórcio de eucalipto; CA = consórcio de acácia.

ANEXO B. Profundidade de 0 a 10 cm da trincheira, mostrando a maior presença de raízes e o acúmulo de material vegetal nesta camada.

ANEXO C. Nódulos formados por bactérias fixadoras de N₂ nas raízes das plantas de *Acacia mangium*.