

UFRRJ
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E FLORESTAIS

TESE

***Topsoil florestal como fonte de microrganismos
promotores de crescimento no reflorestamento de
áreas degradadas***

Thainá Alves dos Santos

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
FLORESTAIS**

***Topsoil florestal como fonte de microrganismos promotores de crescimento
de plantas na restauração florestal de áreas degradadas***

THAINÁ ALVES DOS SANTOS

*Sob a Orientação do Professor
Guilherme Montandon Chaer*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Conservação da Natureza.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237t Santos, Thainá Alves dos, 08/01/1991-
Topsoil florestal como fonte de microrganismos promotores
de crescimento de plantas na restauração florestal de áreas
degradadas / Thainá Alves dos Santos. - Seropédica, 2023.
110 f.: il.

Orientador: Guilherme Montandon Chaer.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e
Florestais, 2023.

1. Restauração florestal. 2. Transplante de microbioma do
solo. 3. *Topsoil* florestal. 4. Fixação biológica de nitrogênio. 5.
Fungos micorrízicos arbusculares. I. Chaer, Guilherme
Montandon, 1975-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais
e Florestais. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS**

THAINÁ ALVES DOS SANTOS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Conservação da Natureza.

TESE APROVADA EM 28/02/2023

Guilherme Montandon Chaer. Dr. Embrapa
(Orientador)

José Carlos Arthur Junior. Dr. UFRRJ

Fabiano de Carvalho Balieiro. Dr. Embrapa

Juliana Müller Freire. Dr^a. Embrapa

Luiz Fernando Duarte de Moraes. Dr. Embrapa

Irene da Silva Coelho. Dr^a. UFRRJ



Emitido em 2023

TERMO N° 212/2023 - PPGCAF (12.28.01.00.00.00.27)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 10/03/2023 12:12)

IRENE DA SILVA COELHO

DMIV (12.28.01.00.00.00.54)

Matrícula: ###157#3

(Assinado digitalmente em 10/03/2023 11:27)

JOSE CARLOS ARTHUR JUNIOR

DeptSil (12.28.01.00.00.00.31)

Matrícula: ###700#6

(Assinado digitalmente em 10/03/2023 11:18)

LUIZ FERNANDO DUARTE DE MORAES

CPF: ####.###.058##

(Assinado digitalmente em 10/03/2023 16:44)

GUILHERME MONTANDON CHAER

CPF: ####.###.036##

(Assinado digitalmente em 28/03/2023 10:56)

FABIANO DE CARVALHO BALIEIRO

CPF: ####.###.027##

(Assinado digitalmente em 10/03/2023 16:03)

JULIANA MÜLLER FREIRE

CPF: ####.###.787##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **212**, ano: **2023**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **10/03/2023** e o código de verificação: **6e96c26455**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus passos, conceder-me saúde e sabedoria para alcançar os meus objetivos. Em 1 Coríntios 16:14, na Bíblia Sagrada, está escrito: “e tudo quanto fizerem, façam com amor”. Agradeço-te pela minha motivação em estudar a natureza, encantando-me em todos os detalhes.

Aos meus pais, Neusa Alves Honório e Adilson Ferreira dos Santos (na memória e no coração), por todos os valores e ensinamentos difundidos, apoio, amor e por me incentivarem a realizar os meus sonhos. Não somente os meus, mas obrigada por terem transformado a vida de muitas pessoas graças à educação. A educação liberta.

As minhas irmãs (Thaíza Alves dos Santos, Aline Alves dos Santos e Márcia dos Santos Reis), ao meu irmão Sergio Ferreira dos Santos, aos meus avós (Nizete, Maurilho [*in memoriam*] e Maria [*in memoriam*]), ao meu tio-avô Genésio (*in memoriam*) e aos meus sobrinhos (Alice, Agnes, Yasmin, Lis, Vinícius e Fernando), pela minha construção pessoal, pelo amor e apoio, por cada sorriso, ensinamento e oração.

Ao meu companheiro, Felipe Ferreira da Silva, pelo amor, incentivo e parceria em todos os momentos. Obrigada por me ajudar ao longo de todo o estudo.

Aos meus sogros, Altivo e Mariulzete, por todo o carinho e o apoio.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais dessa instituição, pela infraestrutura e docentes excelentes, obrigada pela contribuição em minha formação.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Unidade Agrobiologia, por toda infraestrutura que possibilitou a realização da pesquisa.

Ao meu orientador, Dr. Guilherme Montandon Chaer, por me direcionar ao longo do mestrado e do doutorado, por toda a compreensão e conhecimentos compartilhados.

Ao Dr. Sergio Miana de Faria, pelas imensas contribuições fornecidas ao longo da pesquisa.

Aos pesquisadores Dra. Irene da Silva Coelho e Dr. Alexander Silva de Resende, pelas discussões que contribuíram para o desenvolvimento do estudo.

Ao técnico do Laboratório de Leguminosas Florestais, Carlos Fernando da Cunha, pelo auxílio nas coletas de *topsoil* e nas mensurações das plantas em campo.

Ao técnico do Laboratório de Micorrizas, Itamar Garcia Ignacio, pelos ensinamentos e ajuda oferecida em todas as análises de fungos micorrízicos arbusculares.

Ao analista do Laboratório de Ciclagem de Nutrientes, Renato Moutinho da Rocha, pela capacitação fornecida e pelas análises executadas.

À equipe do Laboratório de Leguminosas Florestais da Embrapa Agrobiologia (estudantes, analista Marcelo Antoniol, técnicos e pesquisadores), por toda assistência, troca de conhecimentos e convívio. Em especial, gostaria de agradecer novamente ao Dr. Alexander Resende, que foi meu orientador durante a iniciação científica e muito me ensinou sobre recuperação de áreas degradadas e escrita científica.

Aos funcionários da casa de vegetação (Roberto Carlos, Aurélio e Ernani), sala de lavagem (Cláudio e Marildo) e laboratório de Micorrizas (Itamar), por todo auxílio prestado para a execução dos experimentos.

Ao Joaquim, que disponibilizou sua propriedade para que fosse realizada a coleta do *topsoil*, em Rio Claro.

Ao professor Dr. Paulo Sérgio dos Santos Leles, por possibilitar o contato com a REGUA, para a realização do experimento de campo.

À Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), por fornecer a área experimental, os insumos e os funcionários para o plantio e manutenção do experimento.

Aos membros das bancas de seleção, pré-projeto, relatório, qualificação e defesa de tese, pela disponibilidade em avaliar e contribuir neste estudo.

A todos os professores que fizeram parte da minha trajetória e tanto contribuíram para a minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço a essa instituição, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos e todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Manter em pé o que resta não basta
Que alguém virá derrubar o que resta
O jeito é convencer quem devasta
A respeitar a floresta

Manter em pé o que resta não basta
Já quase todo ouro verde se foi
Agora é hora de ser refloresta
Que o coração não destrói

(GIL, 2021).

RESUMO GERAL

SANTOS, Thainá Alves dos. **Topsoil florestal como fonte de microrganismos promotores de crescimento de plantas na restauração florestal de áreas degradadas**. 2023. 110p. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Departamento de Ciências Ambientais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Os microrganismos do solo desempenham diversos serviços ecossistêmicos, proporcionando melhorias na qualidade do solo. Contudo, a alteração na diversidade e na funcionalidade das comunidades microbianas locais é um dos principais impactos negativos ocasionados pelo uso do solo em ambientes anteriormente naturais, convertidos a pastagens e agricultura. A restauração florestal em áreas degradadas deve ter também como uma de suas prioridades a restauração da biota do solo. Nesse trabalho foi avaliado o uso de pequenos volumes de *topsoil*, coletado de fragmentos florestais naturais, como fonte de microrganismos capazes de promover o crescimento de espécies arbóreas da Mata Atlântica. O estudo está estruturado em dois capítulos. No capítulo I, foi realizado um estudo sob condições de casa de vegetação onde foi avaliado o efeito da adição de 80 g de *topsoil in natura* (coletado na camada de 0 a 2,5 cm), em relação à adição deste esterilizado (controle), sobre o crescimento de *Senna multijuga*, *Plathymenia reticulata*, *Senna macranthera*, *Apuleia leiocarpa*, *Guazuma ulmifolia*, *Dalbergia nigra*, *Pseudobombax grandiflorum*, *Handroanthus serratifolius*, *Psidium cattleyanum*, *Schinus terebinthifolius*, *Mimosa bimucronata*, *Anadenanthera peregrina*, *Ceiba speciosa* e *Cenostigma pluviosum*. Foram mensurados a altura, o diâmetro do coletor, a colonização micorrízica e as massas secas de parte aérea, raízes e nódulos das espécies arbóreas. Em geral, a aplicação do *topsoil* aos vasos promoveu o crescimento das espécies arbóreas em relação ao tratamento controle. Todas as espécies que receberam o *topsoil in natura* apresentaram colonização micorrízica nas raízes, enquanto nos controles, a colonização foi inexistente. Espécies nodulíferas, como *P. reticulata*, *D. nigra* e *M. bimucronata* apresentaram nodulação intensa quando receberam o *topsoil* e apresentaram os maiores incrementos em altura e produção de biomassa. No capítulo II foi realizado um experimento sob condições de campo, onde objetivou-se avaliar o efeito da aplicação do *topsoil* florestal nos berços de plantio sobre a sobrevivência e o crescimento de espécies arbóreas da Mata Atlântica, em área de pastagem degradada em Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro. O desenho experimental consistiu em um delineamento em blocos casualizados, com emprego de 200 g de *topsoil in natura* ou esterilizado (controle) no berço de plantio. O *topsoil* foi coletado nos 2,5 cm superiores do solo, em floresta nativa adjacente à área de plantio. Foram utilizadas as espécies *Anadenanthera peregrina*, *Apuleia leiocarpa*, *Ceiba glaziovii*, *Citharexylon myrianthum*, *Dalbergia nigra*, *Genipa americana*, *Handroanthus chrysotrichus*, *Inga edulis*, *Lecythis pisonis*, *Plathymenia reticulata* e *Tabernaemontana fuchsiiifolia*. Avaliações de sobrevivência, altura e diâmetro ao nível do solo foram realizadas trimestralmente, até os 12 meses após o plantio. Apesar do consistente efeito positivo do *topsoil* sobre o crescimento das espécies florestais sob condições de casa de vegetação (Capítulo I), esse efeito não foi observado sob condições de campo. Igualmente, não houve efeito do *topsoil* sobre a sobrevivência das mudas em campo. A presença de raízes noduladas (quando leguminosas nodulíferas) e micorrizadas nas mudas utilizadas no estudo de campo, além da alta concentração de esporos de FMA no solo da área de plantio podem ter neutralizado o efeito da aplicação do *topsoil*. Implicações práticas dos resultados são apresentadas ao longo dos dois capítulos.

Palavras-chave: reflorestamento, microbiota do solo, simbiose mutualística.

GENERAL ABSTRACT

SANTOS, Thainá Alves dos. **Forest topsoil as a source of plant growth-promoting microorganisms in forest restoration of degraded areas.** 2023. 110p. Thesis (Doctorate in Environmental and Forest Sciences). Forest Institute, Department of Environmental Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Soil microorganisms perform several ecosystem services, providing improvements in soil quality. However, the change in diversity and functionality of local microbial communities is one of the main negative impacts caused by land use in formerly natural environments, converted to pastures and agriculture. Forest restoration in degraded areas must also have soil biota restoration as one of its priorities. In this work, the use of small volumes of topsoil, collected from natural forest fragments, was evaluated as a source of microorganisms capable of promoting the growth of tree species from the Atlantic Forest. The study is structured in two chapters. In chapter I, a study was carried out under greenhouse conditions, where the effect of adding 80 g of topsoil *in natura* (collected in the 0 to 2.5 cm layer) was evaluated, in relation to the addition of this sterilized product (control), on the growth of *Senna multijuga*, *Plathymenia reticulata*, *Senna macranthera*, *Apuleia leiocarpa*, *Guazuma ulmifolia*, *Dalbergia nigra*, *Pseudobombax grandiflorum*, *Handroanthus serratifolius*, *Psidium cattleyanum*, *Schinus terebinthifolius*, *Mimosa bimucronata*, *Anadenanthera peregrina*, *Ceiba speciosa* and *Cenostigma pluviosum*. Height, collar diameter, mycorrhizal colonization and dry mass of shoots, roots and nodules of tree species were measured. In general, the application of topsoil to the pots promoted the growth of tree species in relation to the control treatment. All species that received topsoil *in natura* showed mycorrhizal colonization in the roots, while in the controls, colonization was non-existent. Noduliferous species such as *P. reticulata*, *D. nigra* and *M. bimucronata* showed intense nodulation when they received topsoil and showed the highest increases in height and biomass production. In chapter II, an experiment was carried out under field conditions, in which the objective was to evaluate the effect of the application of forest topsoil in the planting hole on the survival and growth of tree species from the Atlantic Forest, in a degraded pasture area in Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro. The experimental design consisted of a randomized block design, using 200 g of *in natura* or sterilized topsoil (control) in the planting hole. Topsoil was collected from the top 2.5 cm of the soil, in native forest adjacent to the planting area. The species *Anadenanthera peregrina*, *Apuleia leiocarpa*, *Ceiba glaziovii*, *Citharexylon myrianthum*, *Dalbergia nigra*, *Genipa americana*, *Handroanthus chrysotrichus*, *Inga edulis*, *Lecythis pisonis*, *Plathymenia reticulata* and *Tabernaemontana fuchsiiifolia* were used. Evaluations of survival, height and diameter at ground level were performed quarterly, up to 12 months after planting. Despite the consistent positive effect of topsoil on the growth of forest species under greenhouse conditions (Chapter I), this effect was not observed under field conditions. Likewise, there was no effect of topsoil on seedling survival in the field. The presence of nodular (when noduliferous legumes) and mycorrhizal roots in the seedlings used in the field study, in addition to the high concentration of AMF spores in the soil of the planting area, may have neutralized the effect of topsoil application. Practical implications of the results are presented throughout the two chapters.

Key words: reforestation, soil microbiota, mutualistic symbiosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização geográfica do município de Rio Claro, RJ. Fonte: IMPROTA, 2020. .	22
Figura 2. Localização dos pontos de coleta do <i>topsoil</i> em propriedade rural do distrito de Lídice, Rio Claro-RJ. Imagem: Google Earth, 2020.	23
Figura 3. Esporo de <i>Acaulospora foveata</i> em aumento de 400 vezes, sendo evidenciadas depressões na superfície da parede celular (A); sáculo esporífero de <i>A. foveata</i> em aumento de 100 vezes (B); esporo de <i>A. mellea</i> em aumento de 400 vezes (C); esporo de <i>A. rehmii</i> em aumento de 400 vezes (D); esporo de <i>A. scrobiculata</i> em aumento de 400 vezes (E); tubérculos poligonais na parede do esporo de <i>A. tuberculata</i> , em aumento de 400 vezes (F); esporocarpo de <i>Glomus clavigerum</i> em aumento de 400 vezes (G); esporo de <i>G. macrocarpum</i> em aumento de 400 vezes (H); verrugas compactadas na parede do esporo de <i>Racocetra verrucosa</i> , em aumento de 100 vezes (I).	30
Figura 4. Curvas de crescimento médio em altura (cm) e diâmetro do coleto (mm) de <i>S. multijuga</i> , <i>P. reticulata</i> , <i>S. macranthera</i> , <i>A. leiocarpa</i> , <i>G. ulmifolia</i> , <i>D. nigra</i> , <i>P. grandiflorum</i> , <i>H. serratifolius</i> , <i>P. cattleyanum</i> , <i>S. terebinthifolius</i> , <i>M. bimucronata</i> , <i>A. peregrina</i> , <i>C. speciosa</i> e <i>C. pluviosum</i> em resposta à adição de <i>topsoil</i> florestal <i>in natura</i> ou esterilizado (controle) sob condições de cultivo em casa de vegetação. Sendo: *** ($p<0,001$), ** ($p<0,01$), * ($p<0,05$), ^ ($p<0,1$) e ausência de sinal gráfico indica que não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste F.....	35
Figura 5. Localização geográfica do município de Cachoeiras de Macacu, RJ. Fonte: EMATER, 2022.....	48
Figura 6. Precipitação total mensal e temperaturas mínima, média e máxima mensais em Cachoeiras de Macacu, de outubro de 2021 a outubro de 2022. Fonte: (CEMADEN, 2022; NASA-POWER, 2022). Os números acima das barras indicam a quantidade de dias com precipitação durante o mês.	49
Figura 7. Localização geográfica da área experimental, em Cachoeiras de Macacu – RJ. Retângulos vermelhos representam os blocos experimentais; marcadores verdes, as parcelas contendo <i>topsoil in natura</i> ; marcadores azuis, as parcelas contendo <i>topsoil</i> esterilizado.	52
Figura 8. Esporo de <i>A. foveata</i> em aumento de 400 vezes (A); esporo de <i>A. mellea</i> em aumento de 400 vezes (B); esporo de <i>A. rehmii</i> em aumento de 400 vezes (C); esporo de <i>A. leptoticha</i> em aumento de 100 vezes (D - 80-160 μ m); esporo de <i>G. glomerulatum</i> em aumento de 400 vezes (E); esporo de <i>G. macrocarpum</i> em aumento de 400 vezes (F); esporo de <i>G. macrocarpum</i> , contendo em seu interior esporo de <i>G. microaggregatum</i> , em aumento de 400 vezes (G); esporo de <i>G. tortuosum</i> em aumento de 400 vezes (H).	56
Figura 9. Percentual de sobrevivência das espécies <i>A. peregrina</i> , <i>A. leiocarpa</i> , <i>C. glaziovii</i> , <i>C. myrianthum</i> , <i>D. nigra</i> , <i>G. americana</i> , <i>H. chrysotrichus</i> , <i>I. edulis</i> , <i>L. pisonis</i> , <i>P. reticulata</i> e <i>T. fuchsiiifolia</i> aos 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o plantio em campo nos tratamentos com aplicação de <i>topsoil</i> florestal nos berços de plantio e no grupo controle (utilizando <i>topsoil</i> autoclavado).	59

Figura 10. Incremento cumulativo em altura e diâmetro ao nível do solo de *A. peregrina*, *A. leiocarpa*, *C. glaziovii*, *C. myrianthum*, *D. nigra*, *G. americana*, *H. chrysotrichus*, *I. edulis*, *L. pisonis*, *P. reticulata* e *T. fuchsiiifolia* aos 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o plantio em campo nos tratamentos com aplicação de *topsoil* florestal nos berços de plantio e no grupo controle (utilizando *topsoil* autoclavado). 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização química e física do <i>topsoil</i> florestal, <i>in natura</i> e esterilizado, proveniente de Rio Claro-RJ, coletado na profundidade de 0-2.5 cm.....	24
Tabela 2. Nome e respectivo grupo ecológico das espécies arbóreas da Mata Atlântica selecionadas para estudo em casa de vegetação, em Seropédica, RJ.....	26
Tabela 3. Métodos de superação de dormência de sementes de espécies arbóreas da Mata Atlântica utilizadas nos experimentos de avaliação do efeito da adição de <i>topsoil</i>	27
Tabela 4. Espécies de fungos micorrízicos arbusculares encontradas em 50 cm ³ de <i>topsoil</i> oriundo de floresta nativa de Rio Claro-RJ.....	29
Tabela 5. Massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), massa seca de nódulos (MSN) e colonização micorrízica (CM) de <i>S. multijuga</i> , <i>P. reticulata</i> , <i>S. macranthera</i> , <i>A. leiocarpa</i> , <i>G. ulmifolia</i> , <i>D. nigra</i> , <i>P. grandiflorum</i> , <i>H. serratifolius</i> , <i>P. cattleyanum</i> , <i>S. terebinthifolius</i> , <i>M. bimucronata</i> , <i>A. peregrina</i> , <i>C. speciosa</i> e <i>C. pluviosum</i> em resposta à adição de <i>topsoil</i> florestal <i>in natura</i> ou esterilizado em vasos de plantio em casa de vegetação.....	37
Tabela 6. Conteúdo de nutrientes na parte aérea de 14 espécies arbóreas florestais em resposta à adição de <i>topsoil</i> florestal <i>in natura</i> ou esterilizado (controle) em vasos de plantio em casa de vegetação.....	38
Tabela 7. Caracterização química e física do <i>topsoil</i> florestal e do solo da área de implantação do experimento, coletados nas profundidades de 0-2.5 cm e 0-20 cm, respectivamente.....	51
Tabela 8. Espécies arbóreas e respectivas famílias botânicas e grupos ecológicos empregadas no experimento em Cachoeiras de Macacu, RJ.....	53
Tabela 9. Espécies de fungos micorrízicos arbusculares encontradas em 50 cm ³ de amostra do <i>topsoil</i> oriundo de floresta nativa e de área de pastagem degradada, ambas localizadas em Cachoeiras de Macacu-RJ.....	55
Tabela 10. Percentagem de colonização micorrízica e respectiva classe de colonização de mudas de 11 espécies arbóreas produzidas no viveiro da Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), em Cachoeiras de Macacu, RJ.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A Mata Atlântica e seu estado de conservação	3
2.2 Restauração ecológica: conceituação e panorama dos projetos na Mata Atlântica	4
2.3 Transposição de <i>topsoil</i> florestal como prática de restauração	6
2.4 Relações entre microrganismos do solo e plantas.....	8
2.4.1 Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.....	8
2.4.2 Bactérias fixadoras de nitrogênio.....	10
2.4.3 Fungos micorrízicos arbusculares	11
2.4.4 Associação entre plantas, bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares	13
2.5 O uso de inoculantes microbianos na restauração florestal	13
2.6 Uso do <i>topsoil</i> florestal como inoculante microbiano.....	16
CAPÍTULO I.....	18
RESUMO	19
ABSTRACT	20
3 INTRODUÇÃO.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Caracterização da área e coleta do <i>topsoil</i> florestal	22
4.2.1 Análises física e química do <i>topsoil</i>	23
4.2.2 Análises microbiológicas.....	24
4.3 Delineamento e condução dos experimentos.....	26
4.4 Avaliações	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Caracterização biológica do <i>topsoil</i> florestal.....	29

5.2 Efeito do <i>topsoil</i> no crescimento das espécies florestais.....	30
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÕES	42
CAPÍTULO II	43
RESUMO	44
ABSTRACT	45
8 INTRODUÇÃO.....	46
9 MATERIAL E MÉTODOS	48
9.1 Caracterização das áreas de estudo	48
9.2 Coleta e caracterização do <i>topsoil</i> florestal e do solo da pastagem	50
9.2.1 Análises física e química do <i>topsoil</i> florestal e do solo da pastagem	50
9.2.2 Análises biológicas.....	51
9.3 Delineamento e condução experimental.....	51
9.4 Avaliações	54
10 RESULTADOS	55
10.1 Caracterização biológica.....	55
10.2 Sobrevivência e crescimento das espécies arbóreas.....	57
11 DISCUSSÃO	64
12 CONCLUSÕES	67
13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
14 CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
ANEXO	95

1 INTRODUÇÃO GERAL

As florestas tropicais são importantes reservatórios da biodiversidade (SUN *et al.*, 2020) e são responsáveis por diversos serviços ecossistêmicos, como o sequestro de carbono, a ciclagem de nutrientes e a regulação hídrica (JAKOVAC *et al.*, 2021). Apesar disso, em muitas partes do mundo, as florestas tropicais apresentam altas taxas de desmatamento e de degradação (ZHOU; NING; BAI, 2018), sendo constantemente convertidas a outros usos do solo, principalmente agricultura e pastagens (JAKOVAC *et al.*, 2021).

Os microrganismos representam a fração mais sensível a mudanças no uso e no manejo do solo (BARROS *et al.*, 2019), podendo sofrer impactos na estrutura e no potencial funcional de suas comunidades (BERKELMANN *et al.*, 2020). Práticas de manejo em áreas florestais convertidas a pastagens, como o preparo intensivo do solo, uso de fertilizantes e a aplicação de herbicidas, proporcionam redução da biomassa microbiana, bem como homogeneização biótica, devido à redução de microrganismos especialistas e raros, o que implica em perda de funções desses no solo (RODRIGUES *et al.*, 2013; GOSSNER *et al.*, 2016; BERKELMANN *et al.*, 2020).

A camada superficial do solo (*topsoil*) florestal abrange uma maior acumulação de biomassa microbiana (BARROS *et al.*, 2019). A microbiota presente no *topsoil* desempenha um papel-chave na manutenção das funções ecológicas do solo, como a decomposição da matéria orgânica, a mineralização e a ciclagem dos nutrientes, o aumento da agregação do solo, o controle biológico de patógenos, a decomposição de xenobióticos e a produção de metabólitos diversos, como antibióticos, hormônios, substâncias alelopáticas e ácidos orgânicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; FIERER, 2017; IVANOVA *et al.*, 2018; JIA; WHALEN, 2020).

Diversas pesquisas evidenciam o sucesso do uso do *topsoil* como prática de restauração florestal em ambientes onde o solo encontra-se degradado, tais como as desenvolvidas por Parrota e Knowles (2003); Jakovac (2007); Hall, Barton e Baskin (2010); Bento *et al.* (2013); Leal Filho, Santos e Ferreira (2013); Golos e Dixon (2014); Jaunatre, Buisson e Dutoit (2014); Ferreira, Walter e Vieira (2015); Fowler *et al.* (2015); Maiti e Maiti (2015); Bulot *et al.* (2016); Amaral *et al.* (2017); Chenot *et al.* (2017); Dias (2017); Ferreira e Vieira (2017); Hüller *et al.* (2017); Lima *et al.* (2017); Moraes *et al.* (2017); Zatelli (2017); Buisson *et al.* (2018); Pilon, Buisson e Durigan (2018); Silva (2018); Schmidt *et al.* (2020); Chaer *et al.* (2021); Onésimo *et al.* (2021); Silva (2022); Souza, Chaer e Gonçalves (2022).

A transposição de *topsoil* proveniente de ecossistemas naturais é uma prática comum para iniciar a sucessão florestal em áreas degradadas por mineração (BIZUTI *et al.*, 2020) e geralmente é empregada em área total (BENTO *et al.*, 2013). Nesses casos, o *topsoil* é empregado como fonte de matéria orgânica, nutrientes, sementes e fauna (GOLOS; DIXON, 2014; LIMA *et al.*, 2015; PILON; BUISSON; DURIGAN, 2018). Contudo, essa prática tem sido majoritariamente restrita à recuperação de áreas de mineração, em razão da necessidade de grandes volumes de *topsoil*, o qual é estocado ou provenientes de novas lavras de mineração, e dos altos custos envolvidos (FERREIRA; VIEIRA; WALTER, 2015).

A maioria dos projetos de restauração florestal não apresenta uma abordagem holística (SCHMIDT *et al.*, 2020), sendo o plantio de mudas de espécies arbóreas nativas a técnica mais comumente empregada. No entanto, essa abordagem pode não ser a mais eficaz em solos com a composição microbiana alterada e perda de espécies especialistas, limitando serviços ecossistêmicos e ambientais importantes para promover o estabelecimento, o vigor e o crescimento dos indivíduos plantados.

Pesquisas que recomendem a utilização de *topsoil* florestal exclusivamente para o fornecimento de microrganismos na restauração florestal são incipientes (Silva, 2018; Lance *et al.*, 2019; Schmidt *et al.*, 2020). Não obstante, a utilização do *topsoil* na produção de mudas de espécies arbóreas nativas e no berço de plantio apresenta-se como uma prática potencialmente capaz de incrementar a diversidade biológica e funcional, bem como as interações ecológicas no ambiente rizosférico das espécies florestais introduzidas, fornecendo microrganismos que possam auxiliar em processos ecológicos, que direta e indiretamente beneficiam as plantas.

Neste contexto, o presente estudo tem como base a seguinte hipótese: o *topsoil* de florestas nativas, quando aplicado no berço de plantio, fornece uma microbiota capaz de beneficiar a adaptação e o crescimento de espécies arbóreas nativas do bioma.

Nesse contexto, o objetivo geral do estudo foi analisar a influência do *topsoil* florestal, obtido de remanescentes da Mata Atlântica, sobre o crescimento de espécies arbóreas nativas do bioma empregadas na restauração florestal. Para atender a esse objetivo, os objetivos específicos foram (1) caracterizar o *topsoil* de origem florestal em relação às suas características químicas, físicas e biológicas; (2) examinar o impacto da microbiota presente no *topsoil* na sobrevivência e no crescimento inicial de diferentes espécies arbóreas nativas introduzidas via semeadura direta ou plantio de mudas; e (3) avaliar o potencial do uso do *topsoil* como meio promotor da simbiose micorrízica e da simbiose rizóbio-leguminosa.

A tese foi estruturada em dois capítulos: no capítulo I foi avaliado o efeito da aplicação do *topsoil* florestal no crescimento de 14 espécies arbóreas do bioma Mata Atlântica, plantadas em vasos em casa de vegetação; e com finalidade semelhante, no capítulo II o estudo foi realizado em campo, sendo desenvolvido com 12 espécies arbóreas em área de pastagem degradada, recebendo a adição do *topsoil* florestal nos berços de plantio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Mata Atlântica e seu estado de conservação

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, se distribuindo originalmente por 1.309.736 km² em 17 estados brasileiros (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí) e se estendendo ao leste do Paraguai e nordeste da Argentina (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2003; BRASIL, 2006).

O bioma é composto por formações florestais nativas (Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual) e ecossistemas associados (manguezais, vegetações de restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encraves florestais do Nordeste) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2020).

As variadas condições geográficas de latitude e longitude combinadas com as variações de altitude fazem com que a Mata Atlântica possua uma grande heterogeneidade ambiental que acaba por condicionar uma grande diversidade de espécies, muitas destas endêmicas (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Além de ser uma das regiões mais ricas do mundo em biodiversidade, fornece serviços ecossistêmicos essenciais para os 145 milhões de brasileiros que vivem nela, sendo responsável pela produção, regulação e abastecimento de água, regulação e equilíbrio climáticos, proteção de encostas e atenuação de desastres, fertilidade e proteção do solo, produção de alimentos, madeira, fibras, óleos e remédios, além de proporcionar paisagens cênicas e preservar um patrimônio histórico e cultural imenso (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2020).

Apesar disso, os dados de Rezende *et al.* (2018) evidenciam que apenas 28% de sua área de cobertura vegetal original se faz presente. Por estar constantemente sendo submetida a uma intensa pressão antrópica, encontra-se bastante fragmentada e desconectada, circundada por extensas matrizes formadas de pastos, capoeiras, monoculturas e áreas urbanas (SILVA *et al.*, 2016).

A redução da cobertura vegetal nativa aliada ao uso intensivo do solo pela agricultura e/ou pecuária frequentemente levam à formação de áreas degradadas (SANTOS *et al.*, 2019), podendo afetar o equilíbrio do ecossistema e as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (NOGUEIRA *et al.*, 2016).

O mosaico de remanescentes de florestas nativas e ecossistemas não florestais que compõem a Mata Atlântica ainda abriga 2420 vertebrados e 20.000 espécies de plantas, ambas com altos níveis de endemismo (MITTERMEIER *et al.*, 2011). Contudo, 1.544 espécies de plantas (MARTINELLI; MORAES, 2013) e 380 espécies de animais (PAGLIA; FONSECA; SILVA, 2008) estão ameaçadas de extinção, o correspondente a 60% de toda a lista de espécies ameaçadas, tanto para a flora quanto para a fauna no Brasil (REZENDE *et al.*, 2018).

Com base em seus altos níveis de riqueza e endemismo, somados às inúmeras ameaças à sua conservação, a Mata Atlântica foi considerada um dos 36 *hotspots* globais de biodiversidade (REZENDE *et al.*, 2018), isto é, apresenta pelo menos 1.500 espécies de plantas vasculares endêmicas e menos de 30% de remanescentes de vegetação nativa primária (BRANCALION *et al.*, 2019a). Sendo assim, torna-se crucial a adoção de medidas eficientes de conservação e recuperação do bioma (CARVALHAL; RODRIGUES; BERCHEZ, 2015), uma vez que a extinção de espécies ocasiona a perda de serviços ecossistêmicos e gera prejuízos econômicos.

2.2 Restauração ecológica: conceituação e panorama dos projetos na Mata Atlântica

A Society for Ecological Restoration – SER (2004) define restauração ecológica como o processo de auxílio ao restabelecimento de um ecossistema que foi degradado, danificado ou destruído. Os impactos aos ecossistemas podem ser resultado direto ou indireto das atividades humanas ou, em alguns casos, causados ou agravados por causas naturais, tais como incêndios, inundações, tempestades ou erupções vulcânicas, até um grau em que o ecossistema não pode restabelecer-se por si próprio.

A Lei Federal 9.985/2000 (BRASIL, 2000) no artigo 2, parágrafo XIV, traz a seguinte definição de restauração: restituição de um ecossistema ou de uma população silvestre degradada o mais próximo possível da sua condição original. Contudo, esse objetivo foi modificado ao longo do tempo.

Rodrigues, Brancalion e Isernhagen (2009) agrupam em fases as principais iniciativas de restauração realizadas na Mata Atlântica, em que cada fase apresenta diferentes objetivos e metodologias realizadas nas áreas a serem restauradas:

Na fase 1, a restauração era fundamentada no plantio de árvores, de forma aleatória, sem critérios ecológicos para a escolha e combinação das espécies. A utilização de espécies exóticas e a priorização de espécies de crescimento lento eram comuns, pelo uso como madeira.

Em seguida, a fase 2 priorizou o plantio de espécies arbóreas nativas brasileiras, independente do bioma de origem. Esta era fundamentada na sucessão florestal, com a inserção prioritária de espécies de rápido crescimento, para aumentar o recobrimento da área.

Durante a fase 3, os projetos buscavam alcançar a restauração através da tentativa de cópia de uma floresta definida como modelo, baseando-se na estrutura e florística de florestas conservadas. Para os conceitos da época, a sucessão florestal operava sempre no sentido de conduzir a vegetação de uma condição de maior instabilidade para uma de maior estabilidade, em um sentido unidirecional e constante de substituição de grupos sucessionais no tempo que convergia em uma comunidade clímax.

Ao longo do tempo, os objetivos se modificaram, e na fase 4 houve o abandono da ideia de cópia de uma floresta madura, ao perceberem a ausência de um único ponto de equilíbrio (o “clímax”), isto é, o processo de sucessão pode ocorrer seguindo múltiplas trajetórias, em um equilíbrio dinâmico. Sendo assim, muda-se o paradigma da restauração, dando enfoque não mais somente nas características florísticas e fisionômicas da comunidade restaurada, mas também nos processos que garantam sua construção e manutenção no tempo.

Os autores acrescentam que os próximos desafios da restauração florestal são a inserção do uso de alta diversidade genética regional para a produção de mudas ou para semeadura direta; a incorporação de outras formas de vida vegetal, além das arbóreas; a utilização de grupos funcionais com espécies de preenchimento (árvores de rápido crescimento e rápida cobertura do solo) e espécies de diversidade (árvores com crescimento mais lento e pequena cobertura do solo, independente do comportamento suacional); e a visão ecossistêmica do processo de restauração, não focando somente na estrutura, mas sim nos processos ecológicos, como a ciclagem de nutrientes, a incorporação de matéria orgânica e a retenção e redistribuição da água.

Dessa forma, o objetivo principal de todas as ações de restauração deve ser retomar a funcionalidade, estabilidade e integridade de um ecossistema degradado (MARTINS; NETO; RIBEIRO, 2012). O produto da restauração não tem que ser obrigatoriamente uma cópia da composição de espécies e da distribuição espacial de indivíduos de um ecossistema de referência. O que se procura restaurar, em relação aos ecossistemas originais, são características de estrutura, biomassa, ciclagem de matéria e energia (NERY *et al.*, 2013).

Para Brancalion *et al.* (2013), a restauração ecológica oferece uma forma promissora para favorecer a persistência da biodiversidade e a provisão de serviços ecossistêmicos por

meio: do estabelecimento de elementos estruturais na paisagem para aumentar sua conectividade; da ampliação da cobertura florestal; da recuperação de remanescentes florestais degradados pela proteção de distúrbios antrópicos e restabelecimento da trajetória sucessional; e do suporte ao desenvolvimento socioeconômico de comunidades rurais marginalizadas, onde a falta de oportunidades de geração de trabalho e renda tem gerado desmatamento, degradação florestal e sobre-exploração.

A crescente importância da legislação ambiental para estimular programas de restauração ecológica tem sido evidenciada mundialmente (PALMER; RUHL, 2015). No Brasil, a Lei 12.615/2012 (BRASIL, 2012), denominada como o novo Código Florestal, estabelece o dever do proprietário, possuidor ou ocupante da área de recompor a vegetação de áreas de preservação permanente (APP) e reserva legal, em casos de supressão da vegetação. A legislação ambiental brasileira exige a compensação ambiental pela implantação de empreendimentos causadores de significativo impacto ambiental, lei nº 9.985/2000 (BRASIL, 2000); e pela supressão da Mata Atlântica, pela lei nº 11.428/2006 (BRASIL, 2006).

A prática dessa lei pelos proprietários rurais é imprescindível para a conservação e restauração do bioma, posto que 90% da vegetação nativa remanescente no país não se situa em unidades de conservação, mas sim em propriedades rurais particulares (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Concomitantemente, o mundo está gradualmente reconhecendo o enorme potencial da restauração ecológica para enfrentar os desafios mais prementes do nosso tempo: 58 países se comprometeram a restaurar mais de 170 milhões de hectares de terras desmatadas e degradadas até 2030 (CHAZDON; BRANCALION, 2019; ALMEIDA *et al.*, 2020).

De acordo com Pinto *et al.* (2014), iniciativas de restauração florestal na Mata Atlântica, em pequena escala, cresceram como resultado do crescente envolvimento de ONGs ambientais, que foram além de uma perspectiva de se concentrar apenas na conservação da biodiversidade para incluir a restauração ecológica em seu escopo de atividade. Acrescidos às ONGs, agricultores foram forçados pelo Código Florestal a restaurar partes de suas terras, bem como as empresas privadas necessitando restaurar os ecossistemas nativos através de políticas de compensação ambiental e, em alguns casos, obter certificação ambiental e benefícios de mercado.

Contudo, por mais de 20 anos, as partes interessadas individuais trabalharam para restaurar a floresta, mas esses esforços desagregados levaram a ineficiências e resultados malsucedidos (HOLL *et al.*, 2017), seja pela limitação de conhecimento, pela falta de profissionais capacitados ou pelas demandas emergenciais de restauração. Esses esforços, entretanto, serviram de alicerce para a melhoria das ações de restauração posteriores (BRANCALION *et al.*, 2010).

Em 2009, um grupo de organizações não governamentais (ONGs), agências governamentais, empresas privadas e instituições de pesquisa criou o Pacto pela Restauração da Mata Atlântica (<https://www.pactomataatlantica.org.br>), com o objetivo de restaurar 15 milhões de hectares da Mata Atlântica até o ano de 2050. O sucesso mais que dobraria a cobertura natural atual e garantiria 30% de cobertura vegetal em relação à extensão original (PINTO *et al.*, 2014; SCARANO; CEOTTO, 2015; CROUZEILLES *et al.*, 2019). O Pacto agora inclui mais de 270 organizações participantes, que geram e difundem conhecimentos sobre restauração florestal, além da divulgação das experiências realizadas no bioma (BRANCALION *et al.*, 2016).

Em 2011, o movimento se comprometeu com o Desafio de Bonn a recuperar 1 milhão de hectares na Mata Atlântica até 2020. Somente entre 2011 e 2015 foram restauradas uma estimativa de 673.510-740.555 hectares de florestas nativas do bioma. Parte desse sucesso na restauração em larga escala está relacionado a três atividades principais do Pacto: desenvolvimento da governança, comunicação e articulação da restauração, promoção de

estratégias para influenciar políticas públicas e estabelecimento de sistemas de monitoramento de restauração (CROUZEILLES *et al.*, 2019).

2.3 Transposição de *topsoil* florestal como prática de restauração

As intervenções empregadas na restauração florestal variam muito entre projetos dependendo da extensão e duração das perturbações passadas, das condições culturais que têm transformado a paisagem e das oportunidades e limitações atuais. Na mais simples das circunstâncias, a restauração florestal implica eliminar ou modificar uma alteração específica, para permitir que os processos ecológicos se recuperem por si mesmos (SER, 2004).

Brancalion *et al.* (2019b) elencam as principais práticas realizadas em projetos de restauração florestal: regeneração natural, regeneração assistida, plantio de enriquecimento (utilizando sementes ou mudas) de espécies que não colonizam áreas de regeneração natural, semeadura direta, plantio de mudas e transposição de *topsoil*. Contudo, o plantio de espécies arbóreas continua sendo o principal foco nos programas de restauração ecológica nos trópicos (CHAZDON; URIARTE, 2016), sendo a prática mais empregada na Mata Atlântica (BRANCALION *et al.*, 2019b).

A restauração de áreas através do reflorestamento em área total tradicional apresenta um alto custo e, em muitos casos, baixa eficiência no estabelecimento das mudas e uma baixa diversidade biológica. Com isso, projetos estritamente silviculturais vêm sendo substituídos por projetos com enfoque na ecologia da restauração, com prioridade para a recuperação da resiliência dos ecossistemas (MARTINS *et al.*, 2014).

A restauração florestal deve levar em conta os componentes do sistema solo-planta-atmosfera, buscando uma recuperação integrada dos processos biológicos. Dessa forma, a revegetação demanda a utilização de diferentes técnicas envolvendo conhecimentos multidisciplinares (LEAL FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2013), sobre solo (fertilidade, física, biota, ciclagem de nutrientes), planta (botânica, fisiologia, interações com animais), atmosfera (climatologia) e suas interações ecológicas (DUARTE; CASAGRANDE, 2006).

Dentre outras técnicas de recomposição da vegetação de áreas degradadas, o artigo 14 da Instrução Normativa ICMBIO nº 11/2014 (BRASIL, 2014) cita a transposição de solo como alternativa a ser empregada para a recuperação ambiental.

Diversas pesquisas evidenciam o sucesso da transposição da camada superficial de solo florestal (*topsoil*) como técnica de restauração florestal em ambientes onde o solo encontra-se degradado, tais como as desenvolvidas por Parrotta e Knowles (2003); Jakovac (2007); Hall, Barton e Baskin (2010); Bento *et al.* (2013); Leal Filho, Santos e Ferreira (2013); Golos e Dixon (2014); Jaunatre, Buisson e Dutoit (2014); Ferreira, Walter e Vieira (2015); Fowler *et al.* (2015); Maiti e Maiti (2015); Bulot *et al.* (2016); Amaral *et al.* (2017); Chenot *et al.* (2017); Dias (2017); Ferreira e Vieira (2017); Hüller *et al.* (2017); Lima *et al.* (2017); Moraes *et al.* (2017); Zatelli (2017); Buisson *et al.* (2018); Pilon, Buisson e Durigan (2018); Silva (2018); Schmidt *et al.* (2020); Chaer *et al.* (2021); Onésimo *et al.* (2021); Silva (2022); Souza, Chaer e Gonçalves (2022).

O *topsoil* florestal compreende a camada mais superficial do solo, podendo conter o horizonte O, o A, o B (caso o horizonte A seja raso) e a combinação de ambos (IBAMA, 1990; MACKENZIE; NAETH, 2019). Dentre os estudos elencados acima não há consenso quanto à espessura do *topsoil* a ser coletada, podendo ser retirados os primeiros 0-5, 0-10, 0-15, 0-20 e menos frequentemente, 0-30 centímetros de solo. Este serve como fonte de matéria orgânica, nutrientes, sementes e fauna. Além disso, essa camada de solo pode conter fungos, bactérias simbiontes e outros microrganismos promotores de crescimento vegetal, que facilitam o

estabelecimento das plantas na área impactada (GOLOS; DIXON, 2014; LIMA *et al.*, 2015; PILON; BUISSON; DURIGAN, 2018).

A transposição de *topsoil* consiste em remover a camada superficial do solo de um local doador conservado e utilizá-lo para recobrir uma área degradada (REIS *et al.*, 2014; BULOT *et al.*, 2016).

O *topsoil* pode ser o solo preexistente do local, ou pode vir de outro já programado para destruição (CHENOT *et al.*, 2017). A supressão da vegetação nativa e a remoção do *topsoil* são necessárias para a realização de atividades como mineração, construção de estradas, ferrovias, canais, oleodutos e construção civil (FERREIRA; VIEIRA; WALTER, 2015). Dessa forma, a transposição deste é realizada como medida de compensação ambiental por potenciais perdas de biodiversidade na área de exploração (CRAIG *et al.*, 2013; FERREIRA e VIEIRA, 2017).

Esse material é descartado em lixões, beiras de estrada e em pilhas de rejeito. Algumas atividades de mineração o estocam em leiras por anos, com o propósito de devolvê-lo para a cava de mineração (FERREIRA; VIEIRA; WALTER, 2015) ou até que se encontre um local adequado para sua utilização (GOLOS; DIXON, 2014). Todavia, este deve ser utilizado o quanto antes após sua remoção da área fonte, pois o tempo de armazenamento pode influenciar na viabilidade das sementes e na qualidade do solo (MACKENZIE; NAETH, 2019).

Hüller *et al.* (2017) constataram que a aplicação de *topsoil* florestal (associado ou não à serrapilheira) na superfície do solo de uma área de cultivo abandonada beneficiou a semeadura direta de *Schinus terebinthifolius* Raddi, promovendo maior germinação, sobrevivência e crescimento da espécie arbórea. Os autores recomendam a utilização desse insumo em projetos de restauração florestal, contudo evidenciaram o alto custo de coleta, transporte e aplicação. Sendo assim, aconselham que estudos adicionais investiguem a quantidade ideal para minimizar os custos.

A transposição de *topsoil* geralmente é realizada em área total de plantio, sendo o material alóctone depositado sobre a superfície do solo da área degradada. Esta atividade demanda elevada quantidade de material, acarretando elevados custos, tanto na coleta quanto no transporte do mesmo, como comprovado por Bento *et al.* (2013), Maiti e Maiti (2015) e Hüller *et al.*, 2017. De acordo com Chaer *et al.* (2021), o custo da operação aumenta em proporção à distância de transporte a tal ponto que a operação se torna muito onerosa. Os autores citam um exemplo que, para a aplicação de uma camada de 10 cm em um hectare, são necessárias cem viagens de caminhão com capacidade para transportar 10 m³ de *topsoil* por viagem.

As pesquisas envolvendo a transposição de *topsoil* avaliaram a espessura adequada (AMARAL *et al.*, 2017; DIAS, 2017; FERREIRA; VIEIRA, 2017) e a melhor época de coleta (BUISSON *et al.*, 2018; PILON; BUISSON; DURIGAN, 2018), como deve ser realizado o armazenamento e o tempo em que esse material pode ficar estocado sem prejuízo à sua funcionalidade (GOLOS; DIXON, 2014; MORAES *et al.*, 2017), a origem, se proveniente de floresta em estágio inicial ou médio de regeneração, afetando a regeneração natural (AMARAL *et al.*, 2017), a viabilidade do banco de sementes (HALL; BARTON; BASKIN, 2010; FERREIRA; WALTER; VIEIRA, 2015; FOWLER *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2017; ZATELLI, 2017; SOUZA; CHAER; GONÇALVES, 2022), a associação com a serrapilheira (DIAS, 2017; HÜLLER *et al.*, 2017; ZATELLI, 2017), o efeito na fauna edáfica (LIMA *et al.*, 2017) e os custos associados (BENTO *et al.*, 2013; FERREIRA; VIEIRA, 2017). Estudos que avaliam a eficiência do uso do *topsoil* como fonte de microrganismos na restauração florestal são escassos (SILVA, 2018; AVERILL *et al.*, 2022; SILVA, 2022; MCMAHEN *et al.*, 2022).

2.4 Relações entre microrganismos do solo e plantas

O solo suporta a maioria dos processos ecossistêmicos nas florestas, sendo muitos desses mediados por comunidades microbianas (BALDRIAN *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2016), que representam a maior parte da biomassa total do solo (PULLEMAN, 2012). Cerca de 1 g de solo ao redor das raízes pode conter 10^8 a 10^{11} células microbianas cultiváveis e aproximadamente 10^4 espécies microbianas (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012). O microbioma do solo abrange os organismos com diâmetro inferior a 500 μm , incluindo arqueias, bactérias, vírus, fungos, protistas e outros microrganismos eucariotos (FIERER, 2017; XU *et al.*, 2017).

Os microrganismos são claramente um componente-chave dos ecossistemas (FIERER, 2017) e desempenham um papel fundamental na decomposição da matéria orgânica do solo, na mineralização (BERKELMANN *et al.*, 2020) e ciclagem de nutrientes, na manutenção da fertilidade do solo, no sequestro de carbono (FIERER, 2017) e na degradação de poluentes naturais e produzidos pelo homem (GRZĄDZIEL, 2017). Além disso, a supressão de patógenos vegetativos, provavelmente pela produção de antibióticos, a produção de enzimas e o suprimento de hormônios de crescimento para as plantas são consequências adicionais das interações planta-microrganismos nas raízes (BRUTO *et al.*, 2014).

Ademais, os microrganismos presentes no solo têm impacto direto ou indireto na produtividade, diversidade e composição das comunidades vegetais (WAGG *et al.*, 2014; PEDONE-BONFIM *et al.*, 2017). Por exemplo, os microrganismos que promovem o crescimento de plantas exercem efeito benéfico, podendo estar em simbiose com elas ou viver livremente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As plantas abrigam uma grande diversidade de microrganismos, tanto epífitos quanto endofíticos, os quais podem estabelecer diferentes tipos de relações ecológicas com elas, como o mutualismo, o amensalismo, o comensalismo e o parasitismo (SCHLAEPPI; BULGARELLI, 2015; van der HEIJDEN *et al.*, 2016). Muitos microrganismos associados às superfícies das plantas (filosfera e dermosfera, por exemplo) ou às raízes (rizosfera) podem não exercer diretamente impactos positivos ou negativos no desenvolvimento do hospedeiro (van der HEIJDEN *et al.*, 2016), enquanto outros afetam positivamente, como é o caso dos fungos micorrízicos arbusculares e bactérias fixadoras de nitrogênio (van der HEIJDEN *et al.*, 2008), ou negativamente, como é o caso de microrganismos patogênicos (van der HEIJDEN *et al.*, 2016).

2.4.1 Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas

As bactérias que vivem nas raízes e que influenciam positivamente o crescimento das plantas são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas – RPCP (CHAUHAN *et al.*, 2015).

Dentre os benefícios que as RPCP promovem às plantas estão inclusos a supressão de doenças causadas por microrganismos, a indução de crescimento pela produção de fitormônios e a aceleração da disponibilidade e assimilação de nutrientes (YANG *et al.*, 2009). Estes efeitos podem ser alcançados pela interação direta entre as RPCP e seus hospedeiros, mas também indiretamente, devido às suas atividades antagônicas contra os patógenos de plantas (SWARNALAKSHMI *et al.*, 2013).

Singh *et al.* (2019) distinguem os principais mecanismos de ação diretos e indiretos que essas rizobactérias propiciam ao crescimento das plantas. Os mecanismos diretos abarcam a

fixação biológica de nitrogênio, a solubilização do fosfato inorgânico e do potássio e a produção de sideróforos, fitormônios e da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) deaminase.

O ferro ocorre predominantemente como Fe^{3+} no solo, que por sua vez forma hidróxidos e oxi-hidróxidos insolúveis, tornando-se indisponível para absorção e assimilação por plantas e microrganismos (RAJKUMAR *et al.*, 2010). Nessas condições limitadoras de ferro, certas RPCP produzem pequenas moléculas orgânicas, denominadas de sideróforos, que possuem alta afinidade pelo ferro férrico (SAHA *et al.*, 2016) e que podem solubilizar e quelar o ferro (NAVARRO *et al.*, 2019), tornando-o disponível para as plantas.

Os fitohormônios compreendem auxina, citocinina, giberelina, etileno, brassinosteroides, ácido abcísico, ácido salicílico, ácido jasmônico e estrigolactonas (AERON *et al.*, 2020). Além de regular o crescimento e o desenvolvimento das plantas, esses desempenham um papel essencial na resposta ao estresse abiótico e biótico, atuando como moléculas de sinalização nas vias de sinalização exógena e endógena. Em partes da rizosfera, os fitohormônios têm um papel exógeno, como o controle de metais pesados, e ao regular o crescimento e o desenvolvimento das plantas, eles têm um papel endógeno (EMAMVERDIAN; DING; XIE, 2020).

A atividade enzimática da ACC desaminase das rizobactérias facilita o crescimento vegetal como consequência do fato de sequestrar e clivar o ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico) produzido pela planta, diminuindo assim o nível de etileno na planta, pois esse em alta quantidade é inibidor do alongamento das raízes. Por sua vez, níveis reduzidos de etileno permitem que a planta seja mais resistente a uma ampla variedade de estresses, incluindo infecção por fitopatógenos, exposição a extremos de temperatura, salinidade alta, inundações, seca, exposição a metais e contaminantes orgânicos e predação por insetos (JHA; SARAF, 2015).

Dentre os mecanismos indiretos, Singh *et al.* (2019) listam a resistência sistêmica induzida, a produção de compostos orgânicos voláteis e exopolissacarídeos, a síntese de enzimas líticas e antioxidantes e a produção de sideróforos e antibióticos.

As RPCP podem reduzir a incidência do ataque de patógenos provocando uma resposta rápida de defesa da planta, denominada resistência sistêmica induzida. Esse mecanismo envolve a sinalização de jasmonato e etileno na planta e esses hormônios estimulam as respostas de defesa da planta hospedeira a uma gama de patógenos (GLICK, 2012, 2015).

Os compostos orgânicos voláteis produzidos pelas RPCP são moléculas pequenas e gasosas, que promovem o crescimento das plantas, inibem patógenos bacterianos e fúngicos, assim como nematoides e promovem resistência sistêmica induzida às plantas contra os fitopatógenos (RAZA *et al.*, 2016).

Diversas RPCP produzem enzimas que degradam a parede celular de fungos patogênicos, tais como celulase, hemicelulase, quitinase, protease e glucanase, que são capazes de hidrolisar celulose, hemicelulose, quitina, proteínas e glucanos (SINGH *et al.*, 2019). Além da produção de enzimas líticas, esses organismos também podem sintetizar e secretar enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase, glutationa redutase e ascorbato peroxidase, que eliminam espécies reativas de oxigênio produzidas durante estresses abióticos (KAUSHAL; WANI, 2015).

As rizobactérias produtoras de sideróforos melhoram a nutrição das plantas, também podendo quelar zinco, manganês, cobre e níquel, inibem crescimento de outros microrganismos com a liberação de moléculas antibióticas e limitam o ferro disponível, dificultando o crescimento de patógenos vegetais, geralmente fungos, que são incapazes de absorver o complexo sideróforo de ferro (JHA; SARAF, 2015; KRAMER; ÖZKAYA; KÜMMERLI, 2020).

Como mais um mecanismo de biocontrole, a produção de antibióticos (antibiose) por RPCP desempenha um papel importante no controle de doenças de plantas. O processo é

definido como a inibição ou supressão de microrganismos patogênicos através da produção de compostos de baixo peso molecular (antibiótico) por outros microrganismos (KENAWY *et al.*, 2019). De todas as RPCPs, as espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas* são consideradas as mais eficientes na inibição do crescimento e proliferação de fitopatógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides, através da produção de metabólitos específicos (ULLOA-OGAZ; MUÑOZ-CASTELLANOS; NEVÁREZ-MOORILLÓN, 2015).

2.4.2 Bactérias fixadoras de nitrogênio

O nitrogênio é considerado o nutriente mais utilizado pela maioria das plantas já que é necessário para a constituição de aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos e clorofila (STUCKE *et al.*, 2018). As plantas o absorvem apenas nas formas inorgânicas de íons amônio (NH_4^+) e íons nitrato (NO_3^-) (SMITH *et al.* 2015).

Embora seja um dos elementos mais abundantes, compreendendo 78% da atmosfera atual da Terra como N_2 , o material de origem dos solos não contém quantidades significativas de nitrogênio. Uma das principais formas de entrada do nitrogênio no solo é a fixação biológica de nitrogênio (SMITH *et al.* 2015). Nesse processo, microrganismos diazotróficos, incluindo representantes de Eubacteria e Archea, convertem o dinitrogênio atmosférico (N_2) à amônia (NH_3) (MUS *et al.*, 2016). Essa reação é catalisada pela nitrogenase, que realiza a quebra da tripla ligação do N_2 , produzindo o NH_3 (DENK *et al.*, 2017).

Os diazotróficos podem ser de vida livre, estar associados a espécies vegetais ou estabelecer simbiose (MOREIRA *et al.*, 2010). A maioria das espécies diazotróficas é de vida livre, ocorrendo em todos os tipos de solo, na rizosfera e filosfera de plantas, em águas doces e salgadas e no trato intestinal de certos animais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As bactérias diazotróficas associativas colonizam a rizosfera ou mesmo a superfície e o interior das raízes, caules e folhas. A rizosfera é a fração do solo que sofre influência da liberação de exsudatos de raiz, onde as bactérias presentes no solo e que têm a capacidade de responder a estes exsudatos, aumentam suas respectivas populações e passam a interagir de maneira mais intensa com a espécie vegetal em desenvolvimento. Já as bactérias que colonizam o tecido interno das plantas são chamadas de endofíticas (ANDREOTE; GUMIERE; DURRER, 2014) e essa associação pode ser obrigatória ou facultativa. Esses microrganismos exibem interações complexas com seus hospedeiros que variam do mutualismo ao parasitismo (ESKIN; VESSEY, TIAN, 2014).

Membros da família Leguminosae e de nove famílias de plantas se beneficiam da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) (GRIESMANN *et al.*, 2018). De acordo com análises filogenéticas, The Legume Phylogeny Working Group - LPWG (2017) reconhece seis subfamílias pertencentes à Leguminosae (Duparquetioideae, Cercidoideae, Dialioideae, Detarioideae, Papilionoideae e Caesalpinoideae), em que apenas duas incluem espécies nodulíferas, Caesalpinoideae e Papilionoideae.

As leguminosas se associam com centenas de espécies de α -Proteobacteria e β -Proteobacteria que têm capacidade de fixar nitrogênio (REMIGI *et al.*, 2016), conhecidas popularmente como rizóbio. A subclasse α -Proteobacteria abrange os gêneros *Rhizobium*, *Ensifer* (anteriormente *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Shinell*, *Agrobacterium*, *Neorhizobium* e *Pararhizobium*. Na subclasse β -Proteobacteria estão presentes os gêneros *Burkholderia*, *Cupriavidus* e *Trinickia* (HELENE *et al.*, 2022).

Associações simbióticas de rizóbios também podem ser encontradas em *Parasponia*, gênero da família Cannabaceae (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013). No entanto, a

capacidade de nodular as plantas actinorrízicas (Betulaceae, Casuarinaceae, Myricaceae, Rosaceae, Eleagnaceae, Rhamnaceae, Daticaceae e Coriariaceae) foi restrita ao gênero *Frankia* (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013; MASSON-BOIVIN; SACHS, 2018).

Como saprófitas, os rizóbios sobrevivem em uma comunidade microbiana complexa, adotando um estilo de vida oligotrófico. Dentro da planta hospedeira, se diferenciam em bacteroides endossimbióticos (POOLE; RAMACHANDRAN; TERPOLILLI, 2018).

Os rizóbios resolveram o paradoxo entre seu status aeróbico estrito e a extrema sensibilidade da nitrogenase ao oxigênio, induzindo novos órgãos, os nódulos. Esses exibem uma atmosfera extremamente baixa de oxigênio e sintetizam uma forma de hemoglobina vegetal, a leghemoglobina, que facilita a difusão de O₂ aos bacteroides (MASSON-BOIVIN; SACHS, 2018).

Dentro dos nódulos, as plantas fornecem dicarboxilatos (malato, succinato e fumarato) aos bacteroides, como fontes de energia e carbono e, por sua vez, os bacteroides secretam amônia, fornecendo-a a planta (MUS *et al.*, 2016; MITSCH *et al.*, 2017).

2.4.3 Fungos micorrízicos arbusculares

Os fungos desempenham papéis fundamentais nos processos biogeoquímicos e na saúde do solo, como mutualistas, saprófitas de vida livre e patógenos, regulando a composição das espécies vegetais (MCLAUGHLIN; SPATAFORA, 2014; BRINKMANN *et al.*, 2019). Diversos fungos interagem com as plantas, representando um componente relevante da microbiota vegetal (BONFANTE; VENICE, 2020).

A associação simbótica entre os fungos do solo e as raízes das plantas é denominada micorriza e essa pode ser encontrada em mais de 92% das espécies vegetais (BRUNDETT; TEDERSOO, 2018). De acordo com a forma como os fungos interagem com a raiz da planta hospedeira, as micorrizas foram separadas em sete tipos: endomicorrizas, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, monotropoides, arbutoídes, orquidoides e ericoides. No entanto, essa classificação foi modificada e atualmente ectendomicorrizas, monotropoides e arbutoídes são consideradas como tipos de ectomicorrizas. Dessa forma, foram estabelecidos quatro tipos principais de micorrizas: ectomicorrizas, arbusculares, ericoides e orquidoides (van DER HEIJDEN *et al.*, 2015; SIZONENKO; DUBROVSKIY; NOVAKOVSKIY, 2020).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) estão presentes no filo Mucoromycota, subfilo Glomeromycotina e são responsáveis pela simbiose fungo-planta mais comum e de maior sucesso na Terra (SPATAFORA *et al.*, 2016). Muitas plantas dependem dos FMA para a sobrevivência e o crescimento. Esses organismos formam associações simbóticas mutualísticas com raízes de aproximadamente 80-90% dos vegetais superiores e em todos os habitats do planeta (van der HEIJDEN *et al.*, 2015).

Os FMA são biotróficos obrigatórios, isto é, a conclusão do ciclo de vida depende de sua capacidade de estabelecer associações simbóticas com as raízes do hospedeiro (SBRANA; TURRINI; GIOVANNETTI, 2017). Em ambas as simboses, rizobiana e micorrízica arbuscular, as plantas recompensam seus parceiros microbianos com carbono fotossinteticamente assimilado (PÜSCHEL *et al.*, 2017). Dessa forma, os FMA vivem no solo, formando uma rede de hifas, mas dependem em grande parte do carbono reduzido obtido pelas plantas hospedeiras; por outro lado, fornecem nutrientes limitantes às plantas, graças ao estabelecimento de contatos celulares íntimos (LANFRANCO; FIORILLI; GUTJAHR, 2018).

A associação dos FMA com as plantas é caracterizada pela formação de arbúsculos e/ou vesículas fúngicas dentro das células corticais das raízes das plantas. Alguns táxons de FMA podem produzir vesículas intra e intercelulares, que são estruturas de armazenamento (PLASSARD; BECQUER; GARCIA, 2019).

O micélio se diferencia em dois pseudo-tecidos: hifas extrarradiciais, explorando o solo para coletar água e nutrientes; e hifas intrarradiciais, responsáveis pela alocação de recursos para a planta e captação dos fotoassimilados. No córtex radicular, as hifas penetram em células individuais, onde desenvolvem estruturas hifais altamente ramificadas, os arbúsculos (GUTJAHR; PARNISKE, 2013; LANFRANCO; BONFANTE; GENRE, 2016). Os arbúsculos são cercados por uma membrana periarbuscular derivada da planta, que, juntamente com a membrana arbuscular, formam uma interface extensa para a troca de nutrientes (LANFRANCO; FIORILLI; GUTJAHR, 2018).

As hifas são mais finas que os pelos radiculares e, portanto, podem explorar uma superfície específica maior de solo e se estender por muitos metros abaixo do solo, permitindo que os fungos acessem microporos do solo inacessíveis às raízes. Dessa forma, conseguem aumentar a captação de água, macro e micronutrientes do solo para as raízes colonizadas (ALLEN, 2011; GIOVANNETTI *et al.*, 2015). Em troca, a planta fornece até 20% do carbono orgânico fixado fotossinteticamente para o FMA (ROTH; PASZKOWSKI, 2017).

O aumento da eficiência na absorção do fósforo promovido pelos FMA é extremamente importante para as plantas, pois este elemento é pouco móvel no solo (ALFAIA; UGUEN, 2013). Esse macronutriente é essencial para o crescimento biológico e desenvolvimento dos organismos, sendo de extrema importância para o metabolismo vegetal, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento da planta. Sua composição participa diretamente nas estruturas de macromoléculas, como membranas celulares, carboidratos e ácidos nucleicos. Participa na ativação enzimática e na produção de energia (ATP), sendo responsável também pela síntese de celulose e sacarose nas plantas, entre outras funções. Sua ausência se torna crucial, de modo que a planta não se desenvolve (FINGER, 2002; SOUSA, 2010; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Além de maior suprimento nutricional, que ocasiona ao ganho de crescimento das plantas associadas, os FMA podem proporcionar outros benefícios a essas, tais como: aumentar a tolerância das plantas a condições de estresse, isto é, toxicidade, salinidade, escassez de água e acidez do solo (SMITH; READ, 2008; AUGÉ; TOLER; SAXTON, 2015; MEIER *et al.*, 2015); exercer controle sobre patógenos (MORA-ROMERO *et al.*, 2015); e promover maior agregação do solo (PENG; GUO, LIO, 2013).

Os FMA estão envolvidos na formação e estabilização dos agregados do solo por meio do desenvolvimento de uma rede de hifas, criando um esqueleto estrutural que atua na junção e adesão das partículas do solo. As hifas extrarradiciais liberam polissacarídeos extracelulares que se ligam aos microagregados do solo, e produzem a glomalina, uma glicoproteína que apresenta uma ação cimentante nas partículas do solo (PENG; GUO, LIO, 2013; VILELA *et al.*, 2014). Solos bem estruturados possuem agregados estáveis, poros com tamanhos diversos, têm elevada atividade microbiana, boa retenção de água e penetração das raízes, o que indiretamente favorece o desenvolvimento das plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Mediante aos serviços ecossistêmicos produzidos pelas micorrizas arbusculares, esses organismos têm papel significativo na restauração ecológica. Diversos trabalhos têm evidenciado a importância da associação micorrízica arbuscular no estabelecimento de espécies vegetais pioneiras durante os estágios iniciais de sucessão ecológica. A composição de FMA presentes no solo impacta na estruturação da diversidade e abundância de árvores da floresta tropical (COMITA *et al.*, 2010; MANGAN *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012; PEAY; BARALOTO; FINE, 2013).

Em estudo desenvolvido em três florestas na região amazônica (terra firme, inundada sazonalmente e areia branca), Peay, Baraloto e Fine (2013) verificaram que a diversidade α e β de fungos do solo e a das árvores estão fortemente correlacionadas. A correlação positiva entre a riqueza de plantas e fungos foi mais forte em linhagens de fungos conhecidas por estratégias biotróficas (patógenos, micorrizas) em comparação a uma linhagem conhecida principalmente

por saprotrofia, sugerindo que essa relação é, pelo menos em parte, devido à influência direta das interações planta-fungo, seja pelo fungo ser biotrófico obrigatório ou pelo aumento de recursos.

2.4.4 Associação entre plantas, bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares

As plantas interagem com muitos microrganismos simbióticos que podem afetar significativamente seu desempenho. Esses microrganismos podem agir independentemente, de modo que seus efeitos em plantas hospedeiras sejam aditivos, ou podem ter efeitos sinérgicos, como muitos FMA e rizóbios em associação com plantas hospedeiras (AFKHAMI *et al.*, 2020). Essa interação é denominada simbiose tripartite, e os microrganismos estimulam a absorção de fosfato e nitrogênio pela planta, levando a um maior crescimento vegetal (KAFLE *et al.*, 2019).

Embora essas associações tripartites ainda não estejam muito bem caracterizadas, elas parecem depender fortemente de trocas nutricionais entre FMA e bactérias (DELLAGI; QUILLERE; HIREL, 2020).

Os rizóbios têm pouca mobilidade no solo, enquanto os fungos filamentosos são conhecidos por crescerem amplamente através dos poros do solo. Uma maneira para os rizóbios migrarem para a rizosfera é utilizar os micélios como redes de dispersão, alcançando outros microhabitats. Sendo assim, as micorrizas permitem o contato entre os rizóbios e as raízes e, subsequentemente, favorecem a nodulação (NOVAIS *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020).

Püschel *et al.* (2017) encontraram uma correlação fortemente positiva entre o teor total de fósforo de duas leguminosas (*Medicago* spp.) e o de nitrogênio da planta, derivado da fixação biológica de nitrogênio. Em condições de baixa disponibilidade de fósforo, a simbiose micorrízica arbuscular melhorou a absorção de fósforo pelas plantas e estimulou a eficiência da fixação biológica de nitrogênio.

O estudo de Nasto *et al.* (2014) evidenciou que a colonização micorrízica arbuscular e a atividade da enzima fosfatase, responsável pela mineralização do fósforo orgânico, foram maiores quando houve associação tripartite com bactérias fixadoras de nitrogênio e plantas em florestas tropicais, em relação a plantas que não se associam a essas bactérias. A colonização micorrízica pode atender altas demandas de fósforo exigidas pelas enzimas nitrogenase para fixação de nitrogênio. Além disso, o fornecimento de fósforo para a planta facilita o crescimento dessa, o que promove maior disponibilidade de fotossintetizados, aumentando a fixação biológica de nitrogênio.

Não obstante, há a regulação da planta em relação aos microrganismos simbiontes associados. Um estudo recente de Kafle *et al.* (2019) demonstrou que quando a demanda da planta por nitrogênio era maior, mais carbono oriundo da fotossíntese foi alocado para rizóbios do que para fungos micorrízicos arbusculares e, inversamente, mais carbono foi alocado para FMA do que para rizóbios quando a demanda por nitrogênio foi menor, e que esses padrões de alocação foram correlacionados com níveis de expressão de transportadores de sacarose de planta específicos para mutualistas. Esse estudo evidencia como as plantas hospedeiras podem controlar o fornecimento de carbono para simbiontes em resposta direta à disponibilidade de recursos, visando maximizar seus benefícios simbóticos.

2.5 O uso de inoculantes microbianos na restauração florestal

Os microrganismos simbóticos têm sido empregados como biofertilizantes em diversos projetos de recuperação de áreas degradadas, com o intuito de favorecer o estabelecimento de mudas de leguminosas arbóreas e restabelecer a ciclagem de nutrientes (RODRIGUES *et al.*,

2006; MACEDO *et al.*, 2008; CHAER *et al.*, 2011; ANGELINI; SAGGIN; SILVA, 2013; BORGES *et al.*, 2016).

Os biofertilizantes são preparações contendo microrganismos vivos que podem ser agentes de biocontrole, bem como fixar, mobilizar, solubilizar ou decompor fontes de nutrientes e, quando inoculadas através da semente ou solo, aumentam a absorção de nutrientes pelas plantas (MOHANRAM; KUMAR, 2019).

Os inoculantes microbianos compreendem três grupos principais de microrganismos do solo: as bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas, as demais rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e os fungos micorrízicos arbusculares (AREMU *et al.*, 2017).

De acordo com Cassetari, Silva e Cardoso (2016), o uso de inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio pode proporcionar grande economia de fertilizante nitrogenado mineral, podendo substituir total ou parcialmente a necessidade de adubação nitrogenada. Além disso, essa tecnologia tem diversos benefícios, como por exemplo, a preservação da microbiota e da macrofauna do solo, a redução de custos e não causar danos ao meio ambiente.

A inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas resulta no aumento do número e massa dos nódulos, da atividade da nitrogenase, do conteúdo de leghemoglobina do nódulo e da massa seca da raiz e parte aérea (ABD-ALLA *et al.*, 2014).

Do mesmo modo, a utilização de inoculantes de fungos micorrízicos arbusculares torna-se uma ferramenta biotecnológica sustentável, que pode contribuir seja na formação de mudas florestais de qualidade e de baixo custo (SANTOS *et al.*, 2016) ou em campo, reduzindo custos com fertilizantes químicos e aumentando a sobrevivência das espécies (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017a).

A composição dos inoculantes pode apresentar uma ou diversas espécies. A maioria dos inoculantes comerciais disponíveis é baseada em culturas puras de uma única espécie de microrganismo (SHTARK *et al.*, 2015). Entretanto, no Brasil existe apenas um inoculante comercial de fungos micorrízicos arbusculares registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, denominado de Rootella BR. O inoculante registrado em 2018 tem como base propágulos de *Rhizophagus intraradices* e é utilizado para aumentar a produtividade de culturas agrícolas.

Muitos experimentos tentaram verificar o desempenho da planta em decorrência da inoculação, simplificando as interações que ocorrem na natureza, em uma relação planta-microrganismo individual (CHAPARRO *et al.*, 2012). Contudo, em condições naturais, os microrganismos raramente ocorrem isolados, e mesmo quando isolados, os indivíduos de uma mesma população interagem entre si de várias formas. Em uma comunidade microbiana complexa, vários grupos de microrganismos se inter-relacionam, formando redes de associações ecológicas complexas, cujo funcionamento é fundamental para a estabilidade funcional do ecossistema (BERDUGO, 2016).

Embora alguns microrganismos estejam presentes em muitos ecossistemas, a aplicação em massa de uma única espécie pode resultar em perda de diversidade genética e ecológica e é improvável que seja responsável por requisitos específicos do ecossistema (AVERILL *et al.*, 2022).

Em relação à monoinoculação, a coinoculação de microrganismos aparentemente tem sido mais eficaz na estimulação do crescimento da planta, devido ao efeito sinérgico que ocorre quando mais de um microrganismo interage com o mesmo ou com diversos gêneros (MORALES-GARCÍA *et al.*, 2019).

Em estudo realizado em casa de vegetação, Crossay *et al.* (2019) avaliaram qual tipo de inoculação promovia maior crescimento vegetal de *Metrosideros laurifolia* Brongn. & Gris, monoinoculações de seis fungos micorrízicos arbusculares ou a coinoculação desses. Quando a planta enfrentou múltiplos fatores de estresse abiótico (deficiência de nutrientes e altas

concentrações de diferentes metais pesados), a coinoculação de FMA pertencentes a diferentes famílias foi mais eficiente do que a monoinoculação na melhoria da biomassa, nutrição mineral, razão Ca/Mg e tolerância a metais pesados das plantas. Este desempenho sugeriu complementaridade funcional entre os fungos relacionados distamente. Uma única espécie não pode usar todos os recursos ou tolerar as condições presentes em todo o ambiente da rizosfera em sua totalidade. Portanto, se diferentes espécies utilizarem um subnicho de todo o ambiente, elas podem se complementar e juntas atingirem um maior nível de funcionamento (SALEEM; HU; JOUSSET, 2019).

Diversos fatores podem afetar o sucesso da inoculação e a persistência dos microrganismos no solo, incluindo a compatibilidade das espécies com o ambiente (fertilidade, textura e pH do solo) e a espécie vegetal alvo, o grau de competição espacial com outros organismos no solo e o tempo de viabilidade (JANSA *et al.*, 2014; BERRUTI *et al.*, 2016; WILLE *et al.*, 2018).

Os inoculantes geralmente têm um bom desempenho em experimentos de laboratório controlados, mas seu potencial não é totalmente expresso em ambientes naturais. Uma possível explicação é que os experimentos de laboratório são frequentemente conduzidos usando substratos de solo esterilizado, enquanto os microrganismos inoculados enfrentam competição com a microbiota do solo nativo quando inoculados em solo natural (SCHLAEPPPI; BULGARELLI, 2015). Por exemplo, os rizóbios nativos de um determinado solo tendem a apresentar maior adaptação às condições edáficas, principalmente quando o solo apresenta alguma limitação, como teor elevado de metais ou baixo teor de matéria orgânica, pH, seca, salinidade e mudanças extremas de temperatura, devido à maior pressão de seleção gerada pelo ambiente, selecionando organismos altamente adaptados (FERNANDES JÚNIOR; REIS, 2008; SWARNALAKSHMI *et al.*, 2013).

De mesmo modo, um inoculante micorrízico pode falhar, dependendo do grau de sobreposição de nicho com fungos residentes. Os sistemas degradados podem conter FMA altamente competitivos, que têm tolerância comprovada às condições locais, podendo ser particularmente resistentes à competição de novos isolados (HART *et al.*, 2017).

Além disso, inoculantes micorrízicos produzidos comercialmente representam um pequeno pool genético de fungos selecionados para serem, ao mesmo tempo, generalistas e colonizadores agressivos (HART; ANTUNES; ABBOTT, 2017). Por conseguinte, há a possibilidade do inoculante fornecer microrganismos que apresentam características de desempenho aprimoradas (ex., alta taxa de crescimento, plasticidade fenotípica, eficiência de utilização de recursos e habilidades competitivas superiores), de modo que esses se tornem dominantes na comunidade, e tendam a se espalhar em comunidades de menor diversidade e alto nível de distúrbio (LITCHMAN, 2010). Uma vez que o estabelecimento ocorre, o inóculo microbiano introduzido pode ser capaz de superar alguns táxons e usar os recursos existentes para se espalhar e crescer, de modo que sua abundância pode suprimir táxons que competem por recursos semelhantes e facilitar o aumento de táxons que não estão funcionalmente relacionados aos inoculantes (MAWARDA *et al.*, 2020).

Alguns experimentos realizados em casa de vegetação (KOCH *et al.*, 2011; SYMANCZIK *et al.*, 2015) e em campo (PELLEGRINO *et al.*, 2012) evidenciaram que fungos micorrízicos arbusculares inoculados podem dominar rapidamente, substituindo parcial ou completamente a comunidade de fungos nativa residente.

Em suma, os efeitos da aplicação de inoculantes às vezes divergem dos objetivos pretendidos. Mawarda *et al.* (2020) realizaram um levantamento bibliográfico sobre o impacto da inoculação microbiana nas comunidades residentes do solo e verificaram que 86% dos estudos mostraram que a inoculação altera a abundância e a estrutura da comunidade nativa residente, podendo prejudicar o funcionamento do solo. Em adição, 80% dos estudos não observaram resiliência da comunidade residente a longo prazo.

Além da relação de competição, os inoculantes podem influenciar o crescimento e a atividade das comunidades microbianas residentes por meio da antibiose, isto é, pela secreção de compostos químicos que matam ou inibem os microrganismos residentes em sua vizinhança (MAWARDA *et al.*, 2020).

2.6 Uso do *topsoil* florestal como inoculante microbiano

A manipulação do microbioma do solo para o aumento da produtividade de culturas é uma prática antiga (FINKEL *et al.*, 2017), com registros datando cerca de 300 anos a.C., em que Teofrasto sugeriu a mistura de diferentes solos com a finalidade de “corrigir defeitos e adicionar força ao solo”. Dentre os efeitos positivos, essa prática poderia promover a introdução de uma microbiota benéfica às plantas (VESSEY, 2003).

A engenharia de microbiomas tem sido utilizada para modificar estruturas da microbiota, restaurando o equilíbrio ecológico e melhorando a saúde humana, a produtividade agrícola e a silvicultura (FOO *et al.*, 2017; AVERILL *et al.*, 2022). Por exemplo, a introdução de *Pinus radiata* no hemisfério sul por silvicultores falhou diversas vezes devido à dependência desses pinheiros, nativos do hemisfério norte, de associação com fungos ectomicorrízicos, inóculos quais só são encontrados no solo de florestas de pinheiros previamente estabelecidas (HOEKSEMA *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, houve um crescente interesse em compreender a composição dos microbiomas, dada a ampla influência dos microrganismos nos ecossistemas e os avanços recentes no sequenciamento de microrganismos (FOO *et al.*, 2017). Contudo, o potencial da técnica de transposição do microbioma do solo (por exemplo, utilizando o *topsoil* florestal) para promover a recuperação de áreas degradadas ainda é pouco explorado, o que ressalta a importância de novas pesquisas.

Averill *et al.* (2022), ao analisarem 27 estudos sobre transposição do microbioma nativo do solo, verificaram em média um aumento de 64% da biomassa das plantas em todos os ecossistemas pesquisados.

Silva (2018) mostrou a influência positiva do uso de *topsoils*, oriundos de remanescentes de vegetação natural da Caatinga, sobre o crescimento de uma espécie de leguminosa arbórea nativa do bioma. O experimento, conduzido em casa de vegetação utilizando vasos preenchidos por 1,5 kg de piçarra e com aplicação de 10 g de *topsoil* no sulco de plantio de sementes de *Mimosa caesalpiniifolia* Benth., constatou que o uso de *topsoil* aumentou a produção de biomassa em até 256% em relação ao controle, contendo o *topsoil* esterilizado. O crescimento da espécie em presença do *topsoil* foi ainda similar ao de tratamentos com o uso de inoculantes compostos de esporos de fungos micorrízicos arbusculares e estírpes de rizóbios previamente selecionadas para a espécie.

No estudo de Silva (2022), o uso de *topsoil* florestal em vasos de plantio com capacidade de 1700 cm³, preenchidos com substrato composto por pedrisco, areia e vermiculita, na proporção 1:1:2 (v/v/v), apresentou resultados discrepantes no crescimento de espécies arbóreas da Caatinga. Ao aplicar 5 g de inóculo misto de *topsoil*, provenientes de quatro áreas de vegetação do bioma, no sulco de plantio de sementes pré-germinadas, foi observado que *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, *Mimosa caesalpiniifolia* Benth., *Piptadenia retusa* P.G.Ribeiro, Seigler & Ebinger e *Mimosa ophthalmocentra* Mart. ex Benth. apresentaram crescimento inferior às plantas inoculadas com estírpes autóctones selecionadas. Esses resultados foram geralmente similares estatisticamente à testemunha sem inoculação. De acordo com o autor, o desempenho inferior do tratamento contendo *topsoil* pode estar relacionado à baixa densidade de rizóbios e à presença de microrganismos competitivos, mas com baixa eficiência em fixar nitrogênio.

Outras pesquisas também mostraram sucesso no uso de *topsoil* florestal na produção de mudas. Em um estudo desenvolvido por McMahan *et al.* (2022) em casa de vegetação, a adição de *topsoil* florestal nativo correspondentes a 5% e 25% do volume de vasos de 750 mL com substrato de rejeitos de mineração aumentou a sobrevivência e o crescimento de mudas de *Salix scouleriana* (salgueiro) e *Picea engelmannii* (abeto). Os maiores valores de colonização de fungos ectomicorrízicos foram obtidos na maior proporção de *topsoil* florestal.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO *TOPSOIL* FLORESTAL EM PROMOVER O CRESCIMENTO DE ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

RESUMO

As raízes das plantas interagem com comunidades microbianas complexas do solo. A adição de um pequeno volume de solo autóctone pode fornecer microrganismos que coevoluíram com espécies florestais nativas, sendo capazes de formar associações simbióticas determinantes para o crescimento vegetal. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do *topsoil* de floresta natural da Mata Atlântica em fornecer microrganismos simbiontes capazes de promover o crescimento de espécies arbóreas nativas do bioma. Em casa de vegetação, 14 experimentos em delineamento inteiramente casualizado foram conduzidos em vasos de 1.700 cm³, preenchidos com substrato esterilizado, composto por areia e vermiculita. O efeito da adição de 80 g de *topsoil in natura* ou esterilizado ao substrato foi testado no crescimento de *Senna multijuga*, *Plathymenia reticulata*, *Senna macranthera*, *Apuleia leiocarpa*, *Guazuma ulmifolia*, *Dalbergia nigra*, *Pseudobombax grandiflorum*, *Handroanthus serratifolius*, *Psidium cattleyanum*, *Schinus terebinthifolius*, *Mimosa bimucronata*, *Anadenanthera peregrina*, *Ceiba speciosa* e *Cenostigma pluviosum*. Foram mensurados a altura, o diâmetro do coleto, a colonização micorrízica e as massas secas de parte aérea, raízes e nódulos das espécies arbóreas. A aplicação do solo florestal aos vasos resultou, em média, em aumentos significativos na altura e diâmetro do caule das mudas das espécies arbóreas em comparação ao grupo de controle durante o período de avaliação. Esse efeito foi particularmente maior nas espécies nodulíferas *P. reticulata*, *D. nigra* e *M. bimucronata*, com incrementos em altura e diâmetro do coleto de até 328% e 484%, respectivamente. O *topsoil* florestal também teve um impacto positivo no crescimento de parte aérea, raízes e nódulos das plantas, diferindo significativamente do grupo controle. Contudo, os tratamentos apresentaram resultados semelhantes quanto à massa seca de parte aérea de *P. grandiflorum* e à massa seca de raízes de *G. ulmifolia*. As plantas apresentaram baixa colonização micorrízica, exceto *C. pluviosum*, que apresentou média colonização. O emprego do *topsoil* florestal se mostrou uma estratégia viável para fornecer microrganismos capazes de promover o crescimento das espécies arbóreas em condições controladas, tornando-se promissor para a utilização em viveiros e no campo.

Palavras-chave: restauração florestal, microbioma do solo, simbiontes radiculares.

ABSTRACT

Plant roots interact with complex soil microbial communities. The addition of a small volume of autochthonous soil can provide microorganisms that co-evolved with native forest species, being able to form symbiotic associations that are decisive for plant growth. The objective of this study was to evaluate the potential of topsoil from natural Atlantic Forest to provide symbiotic microorganisms capable of promoting the growth of tree species native to the biome. In a greenhouse, 14 experiments in a completely randomized design were carried out in 1,700 cm³ pots filled with a sterilized substrate composed of sand and vermiculite. The effect of adding 80 g of *in natura* or sterilized topsoil to the substrate was tested on the growth of *Senna multijuga*, *Plathymenia reticulata*, *Senna macranthera*, *Apuleia leiocarpa*, *Guazuma ulmifolia*, *Dalbergia nigra*, *Pseudobombax grandiflorum*, *Handroanthus serratifolius*, *Psidium cattleyanum*, *Schinus terebinthifolius*, *Mimosa bimucronata*, *Anadenanthera peregrina*, *Ceiba speciosa* and *Cenostigma pluviosum*. Height, collar diameter, mycorrhizal colonization and dry mass of shoots, roots and nodules of tree species were measured. Application of forest soil to pots resulted, on average, in significant increases in height and stem diameter of seedlings of tree species compared to the control group during the evaluation period. This effect was particularly greater in the noduliferous species *P. reticulata*, *D. nigra* and *M. bimucronata*, with increments in height and collar diameter of up to 328% and 484%, respectively. The forest topsoil also had a positive impact on the growth of shoots, roots and plant nodules, differing significantly from the control group. However, the treatments presented similar results regarding the dry mass of shoots of *P. grandiflorum* and the dry mass of roots of *G. ulmifolia*. The plants showed low mycorrhizal colonization, except for *C. pluviosum*, which showed medium colonization. The use of forest topsoil proved to be a viable strategy to provide microorganisms capable of promoting the growth of tree species under controlled conditions, making it promising for use in nurseries and in the field.

Key words: forest restoration, soil microbiome, root symbionts.

3 INTRODUÇÃO

As plantas vivem em associação íntima com comunidades microbianas complexas e diversas (HASSANI; DURÁN; HACQUARD, 2018) que afetam a sobrevivência e o crescimento vegetal (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Os microrganismos podem colonizar o solo ao redor das raízes, a superfície radicular, o interior dos tecidos vegetais, a superfície foliar e estruturas radiculares especializadas, constituindo o microbioma vegetal (SANCHEZ-CAÑIZARES *et al.*, 2017; PATIL, PATIL; SAYYED, 2019).

Bactérias e fungos associados às plantas estão envolvidos em diversos serviços ecossistêmicos fundamentais, como a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes, a agregação do solo, a nutrição e a resistência das plantas a estresses bióticos e abióticos (PENG; GUO, LIO, 2013; VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015; BERKELMANN *et al.*, 2020). Assim, as plantas não são entidades autônomas e o desempenho dessas é uma consequência da planta em si e de sua microbiota (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015).

Dado que os microrganismos são sensíveis aos distúrbios ambientais, a diversidade e algumas funções benéficas desempenhadas pelo microbioma do solo podem ser perdidas devido à degradação e às práticas inadequadas de manejo do solo (AMUNDSON *et al.*, 2015; MENDES *et al.*, 2015a).

No bioma Mata Atlântica, o plantio de mudas de espécies arbóreas nativas é a técnica mais empregada em projetos de restauração de áreas degradadas (BRANCALION *et al.*, 2019). Contudo, o foco na reintrodução de plantas sem o restabelecimento dos microbiomas associados pode estar limitando o sucesso da restauração (KOZIOL *et al.*, 2018).

A camada superficial do solo (*topsoil*) apresenta uma maior acumulação de biomassa microbiana (BARROS *et al.*, 2019). Portanto, a transposição da microbiota presente no solo superficial de florestas nativas para a produção de mudas, como também para berços de plantio em áreas degradadas pode ser uma estratégia de nucleação que auxilie na reintrodução de microrganismos nativos e no aumento de interações ecológicas benéficas entre as plantas e microrganismos associados.

Alguns estudos sob condições controladas evidenciam que, na presença da microbiota nativa florestal, as plantas apresentam maiores ganhos em crescimento. Em experimento desenvolvido em casa de vegetação, Silva (2018) verificou que a aplicação de 10 g de solo superficial provenientes de dois remanescentes florestais nativos da Caatinga foi capaz de aumentar o crescimento de plantas de *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. (sabiá) sob condições de casa de vegetação.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de solo superficial (0 a 2,5 cm), coletado de um fragmento florestal de Mata Atlântica, sobre o crescimento e formação de simbioses em 14 espécies arbóreas do bioma e comumente utilizadas em projetos de restauração florestal. Os resultados deste estudo poderão aumentar a compreensão sobre a influência da microbiota nativa do solo no crescimento vegetal de diferentes espécies arbóreas nativas e estabelecer novas estratégias para a produção de mudas para emprego em projetos de reflorestamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área e coleta do *topsoil* florestal

Amostras de *topsoil* foram obtidas em um fragmento de vegetação nativa da Mata Atlântica situado em Lídice, no município de Rio Claro, estado do Rio de Janeiro ($22^{\circ}50'18.41''S$, $44^{\circ}12'52.25''O$).

O município é pertencente à região do Médio Paraíba e tem como municípios limítrofes Angra dos Reis, Bananal, Barra Mansa, Itaguaí, Mangaratiba, Piraí e Volta Redonda (Figura 1). Rio Claro possui área territorial de 846,797 km², que abrange os distritos de Rio Claro (distrito sede), Getulândia, Lídice, Passa Três e São João Marcos (IBGE, 2017).

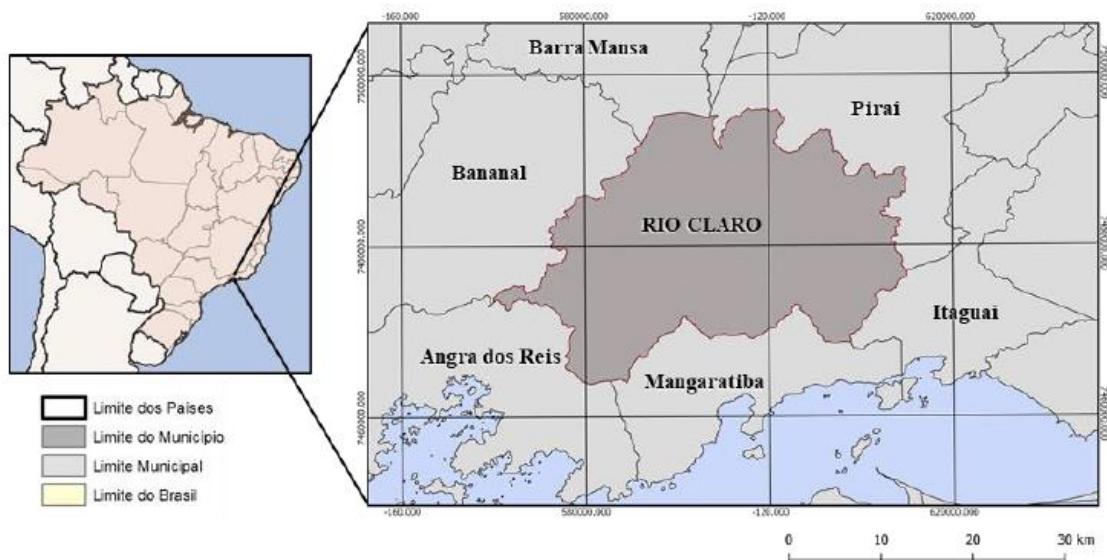


Figura 1. Localização geográfica do município de Rio Claro, RJ. Fonte: IMPROTA, 2020.

A vegetação predominante do local é caracterizada como Floresta Ombrófila Densa Montana (RIO DE JANEIRO, 2011). A formação Montana abrange florestas com faixa de altitude de 500 m a 1500 m de altitude em relação ao nível do mar, estando a área de estudo a um gradiente de 550 m a 650 m.

O clima da região é do tipo Cwa (invernos secos e verões quentes e chuvosos), segundo a classificação de Köppen (1948). Os dados da Estação Meteorológica Automática Rio Claro indicam média pluviométrica anual de 1.300 mm entre janeiro de 2017 a dezembro de 2020, com temperaturas médias mensais variando de 15,2 °C a 25,7 °C e média anual de 21,3 °C (INMET, 2021).

Em março de 2021 foi realizada a coleta do *topsoil* em um fragmento florestal da Mata Atlântica em estágio avançado de sucessão. A coleta do *topsoil* foi realizada em 20 pontos, em um gradiente do interior à borda da floresta, percorrendo-se em zigue-zague 500 m da área (Figura 2). As amostras foram retiradas da camada de 0-2,5 cm de profundidade de solo, em 0,2 m x 0,2 m, com auxílio de um sacho, descartando a serrapilheira bruta acima do solo. O *topsoil* coletado compreendeu o subhorizonte hemiorgânico A₁₁, que corresponde aos três centímetros iniciais do horizonte A₁ e apresenta maior concentração de nutrientes (KINDEL *et al.*, 2003).

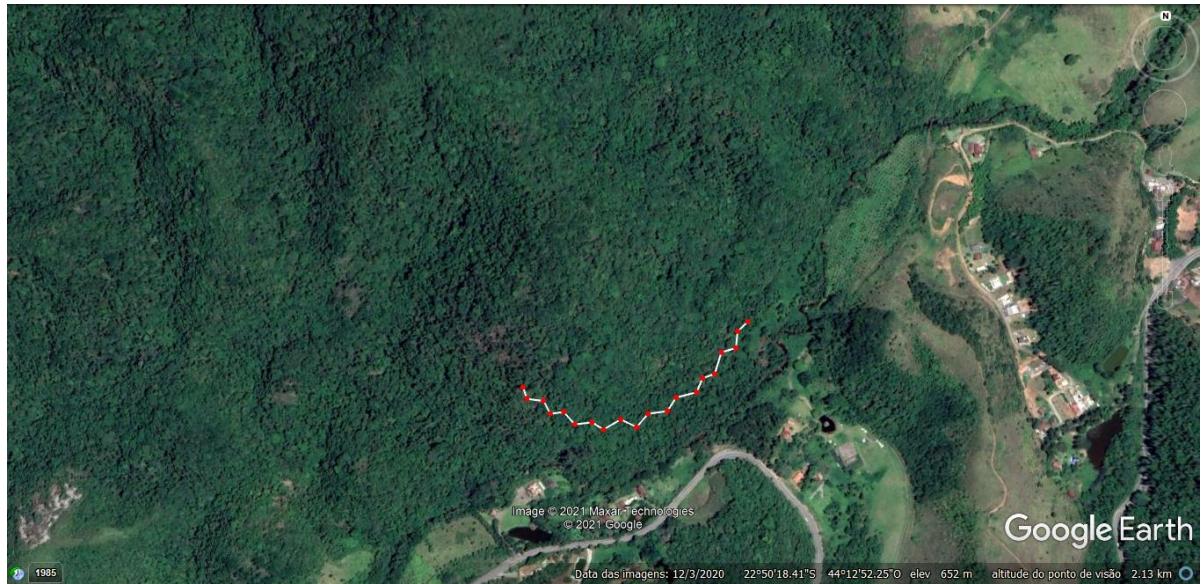


Figura 2. Localização dos pontos de coleta do *topsoil* em propriedade rural do distrito de Lídice, Rio Claro-RJ. Imagem: Google Earth, 2020.

As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e direcionadas ao Laboratório de Leguminosas Florestais da Embrapa Agrobiologia. As 20 amostras simples foram homogeneizadas e agrupadas em uma amostra composta, mantida sob refrigeração a $\pm 5^{\circ}\text{C}$. O material foi destorrado, seco ao ar e peneirado em malha de 2 mm para a realização das análises e instalação dos experimentos.

4.2.1 Análises física e química do *topsoil*

A análise granulométrica do *topsoil* foi realizada pelo método do densímetro (TEIXEIRA *et al.*, 2017), definindo-se os teores das frações argila e areia + silte. As análises químicas foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por Teixeira *et al.* (2017). Os seguintes atributos químicos foram determinados: matéria orgânica, através do método de oxirredução; pH em água (1:2,5 solo/água), aferido por potenciometria; cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}), por espectrometria de absorção atômica, e alumínio (Al^{3+}) por titulação, após extração com KCl 1 mol L^{-1} ; fósforo (P) e potássio e (K^{+}) por espectrofotometria de chamas; acidez potencial (H^{+}Al) por titulação, após extração com acetato de cálcio; soma de bases (S); capacidade de troca catiônica potencial (CTC a pH 7.0) e saturação por bases (V). A Tabela 1 apresenta a caracterização da fertilidade e dos percentuais de areia, argila e silte do *topsoil, in natura* e esterilizado.

Tabela 1. Caracterização química e física do *topsoil* florestal, *in natura* e esterilizado, proveniente de Rio Claro-RJ, coletado na profundidade de 0-2.5 cm.

	MO	pH	N	P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	S	CTC pH 7	V	Are + Sil	
	dag/dm ³		mg/dm ³		cmol _c /dm ³						%		--g/kg--	
<i>Topsoil in natura</i>	4,1		5,1		1,0		11,2		53		2,1		0,9	
<i>Topsoil esterilizado</i>	4,0		5,2		1,0		11,2		53		2,2		0,8	

pH em água; S: soma de bases; CTC pH 7: capacidade de troca catiônica; V: saturação por bases; Are: areia; Arg: argila; Sil: silte.

4.2.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas consistiram na quantificação da densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (rizóbios) e de esporos de fungos micorrízicos arbusculares presentes no *topsoil*. O objetivo desta análise foi verificar se o material continha microrganismos simbiontes viáveis para as plantas.

4.2.2.1 Determinação da densidade de rizóbios no *topsoil*

A determinação da densidade de rizóbios presentes no *topsoil* foi realizada pelo método do número mais provável – NMP (JARVIS; WILRICH; WILRICH, 2010), utilizando-se as leguminosas *Mimosa pudica* L. (dormideira) e *Phaseolus vulgaris* L. (feijão-comum) como plantas-isca.

M. pudica é uma erva pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae, clado Mimosoide (LPWG, 2017). A espécie é muito utilizada em diversos estudos de associação simbótica por ser considerada uma planta promiscua, nodulando predominantemente com β-rizóbios, embora também se associe com α-rizóbios (DALL'AGNOL *et al.*, 2017). *P. vulgaris* também é uma planta modelo adequada para estudos de bactérias simbóticas, devido à sua promiscuidade na nodulação com uma variedade de espécies de α- e β-rizóbios (DALL'AGNOL *et al.*, 2017).

O NMP é um método indireto de contagem, pois envolve a verificação de presença ou ausência de nódulos em plantas inoculadas através de alíquotas de diluições seriadas decimais das amostras de solo (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985).

As sementes de *M. pudica* passaram por procedimento de superação de dormência, através da imersão das sementes em H₂SO₄ 98% por 10 minutos (RAHMAN *et al.*, 2018). Em cabine de segurança biológica, as sementes de ambas as espécies foram desinfestadas através de imersão em álcool 70% (p/p) por 1 minuto e, em seguida, em NaClO 2% (p/p) por 3 minutos, sendo posteriormente lavadas dez vezes com água destilada autoclavada. As sementes foram acondicionadas em placas de Petri estéreis, contendo algodão e papel filtro embebidos em água destilada estéril. Em seguida, foram incubadas em câmara germinadora tipo B.O.D. a 30 °C com fotoperíodo de 12 horas, até que ocorresse a emissão das radículas.

Em casa de vegetação, as plantas foram cultivadas em vasos de Leonard contendo 1,5 kg de substrato constituído por areia e vermiculita (1:1), os quais foram esterilizados anteriormente em autoclave a 121 °C por 60 minutos.

Dez gramas de amostra do *topsoil* foram transferidas para um Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina esterilizada em autoclave (NaCl 0,85%) e o recipiente foi posto em agitador orbital por 20 minutos a 180 rpm. Após, foram realizadas diluições sucessivas adicionando-se 1 mL da suspensão de cada diluição em tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina esterilizada e obtendo-se diluições de 10^{-1} a 10^{-6} . As diluições foram feitas com auxílio de pipeta automática utilizando-se ponteiras autoclavadas trocadas a cada diluição. Em cada procedimento de transferência da alíquota, o tubo era agitado em vórtex durante vinte segundos.

Foram utilizados três vasos para cada diluição (10^{-1} a 10^{-6}) e três para o controle negativo (contendo apenas solução salina 0,85% estéril), totalizando 21 vasos por espécie. Três sementes foram dispostas por vaso, sendo mantida apenas um indivíduo dois dias após a semeadura. As inoculações foram feitas após o desbaste, sendo aplicada uma alíquota de 1 mL da respectiva diluição na região da radícula da planta de cada vaso.

A parte inferior do vaso de Leonard foi abastecida com solução nutritiva de Norris esterilizada, isenta de nitrogênio e modificada para metade da concentração de sal (GUZMÁN; DÖBEREINER, 1968).

Aos 30 dias após a inoculação, as plantas foram colhidas e avaliadas quanto à nodulação, sendo categorizados o sucesso como “1”, quando havia algum nódulo presente, e o insucesso da nodulação como “0”, na ausência de nódulos na planta. Com base nesses dados, a densidade de rizóbios nodulíferos (número de células/g de solo) foi calculada utilizando o pacote MPN no software R 4.0.5, ao nível de 95% de confiança (FERGUSON; IHRIE, 2019).

4.2.2.2 Determinação da densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares

A extração dos esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi realizada a partir de uma amostra contendo 50 cm³ de *topsoil* florestal, utilizando as técnicas de peneiramento úmido (GERDERMANN; NICOLSON, 1963) e centrifugação em gradiente de densidade (JENKINS, 1964).

O procedimento foi iniciado através da agitação da amostra em água no liquidificador durante 60 segundos. Após repouso por aproximadamente 30 segundos, para que as partículas mais grosseiras do solo decantassem, a água contendo os esporos em suspensão foi vertida em peneiras sobrepostas com malhas de 0,42 e 0,053 mm, respectivamente (GERDERMANN; NICOLSON, 1963). O procedimento de lavagem foi realizado até que a água não apresentasse partículas de argila em suspensão.

O conteúdo retido na peneira de malha mais fina foi transferido para tubo Falcon de 50 mL, que foi avolumado com água destilada, para ser centrifugado a 3.000 rpm durante 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se solução de sacarose 45% ao tubo (JENKINS, 1964), que foi centrifugado a 2.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi vertido em peneira com malha de 0,053 mm, sendo os esporos lavados com água destilada e transferidos para uma placa de Petri canaletada.

A quantificação dos esporos presentes na placa de Petri foi realizada em microscópio estereoscópico, sendo esses separados por morfotipos, de acordo com cor, tamanho e forma. Posteriormente, os esporos foram dispostos em lâmina com álcool polivinil em lactoglicerol (PVLG), sob uma lamínula. Na mesma lâmina, outro grupo de esporos de FMA foi fixado com PVLG, acrescido do reagente de Melzer (1:1), sendo os esporos quebrados delicadamente sob a lamínula, com o intuito de evidenciar as paredes internas (quando presentes), de forma a auxiliar a identificação das espécies.

O conteúdo da lâmina foi visualizado em microscópio óptico com iluminação de campo claro e objetiva de imersão. Os caracteres taxonômicos utilizados para a distinção entre as espécies foram: o número e o tipo de camadas das paredes dos esporos, bem como sua reação

ao reagente de Melzer; as características das paredes internas, quando presentes; a morfologia da hifa de sustentação do esporo; e a variação da cor e tamanho dos esporos. A identificação das espécies teve como base o Manual de Identificação de FMA desenvolvido por Schenck e Perez (1988) e as descrições das espécies disponíveis no site International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (<http://invam.caf.wvu.edu/>).

Os procedimentos de extração, contagem e identificação dos esporos de fungos micorrízicos arbusculares foram executados no Laboratório de Micorrizas, situado na Embrapa Agrobiologia.

As fotografias das espécies identificadas foram feitas com o auxílio do microscópio Zeiss, com sistema de captura composto por câmera Axiocam ERc 5s e software Axiovision.

4.3 Delineamento e condução dos experimentos

No ano de 2021 foram instalados quatorze experimentos em casa de vegetação com controle de temperatura e umidade, na Embrapa Agrobiologia. Em cada experimento foi utilizada uma de quatorze espécies arbóreas comumente empregadas em projetos de reflorestamentos da Mata Atlântica (Tabela 2). A seleção dessas espécies foi baseada na disponibilidade de sementes no momento do experimento.

Tabela 2. Nome e respectivo grupo ecológico das espécies arbóreas da Mata Atlântica selecionadas para estudo em casa de vegetação, em Seropédica, RJ.

Espécie	Nome popular	Família	Grupo ecológico
<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg.	Angico-vermelho*	Leguminosae	NP
<i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J.F.Macbr.	Garapa	Leguminosae	NP
<i>Ceiba speciosa</i> (A.St.-Hil.) Ravenna	Paineira-rosa	Malvaceae	P
<i>Cenostigma pluviosum</i> (DC.) Gagnon & G.P.Lewis	Sibipiruna	Leguminosae	NP
<i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Allemão ex Benth.	Jacarandá-da-bahia*	Leguminosae	NP
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	Mutambo	Malvaceae	P
<i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S.Grose	Ipê-amarelo	Bignoniaceae	NP
<i>Mimosa bimucronata</i> (DC.) Kuntze	Maricá*	Leguminosae	P
<i>Plathymenia reticulata</i> Benth.	Vinhático*	Leguminosae	NP
<i>Pseudobombax grandiflorum</i> (Cav.) A.Robyns	Embiruçu	Malvaceae	P
<i>Psidium cattleyanum</i> Sabine	Araçá	Myrtaceae	NP
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Aroeira-pimenteira	Anacardiaceae	P
<i>Senna macranthera</i> (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby	Fedegoso	Leguminosae	P
<i>Senna multijuga</i> (Rich.) H.S.Irwin & Barneby	Aleluia	Leguminosae	P

P: pioneira; NP: não pioneira. *: Espécies que desempenham associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas.

S. multijuga, *P. reticulata*, *S. macranthera*, *A. leiocarpa*, *G. ulmifolia*, *D. nigra* e *P. grandiflorum* foram semeadas em março de 2021; *H. serratifolius* e *P. cattleyanum* em abril; *S. terebinthifolius* em maio; *M. bimucronata* em junho, e *A. peregrina*, *C. speciosa* e *C. pluviostum* em agosto do mesmo ano.

Cada experimento compreendeu um delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos, a saber: aplicação do *topsoil* florestal e o *topsoil* esterilizado, como controle absoluto. Os tratamentos possuíam oito repetições, totalizando 16 unidades experimentais por experimento. O *topsoil* do tratamento controle foi submetido ao processo de autoclavagem a 121 °C por 60 minutos, repetindo-se o procedimento após dois dias. O material permaneceu estocado por 15 dias, visando permitir a reoxidação do manganês potencialmente solubilizado na esterilização, prevenindo toxidez desse elemento nas plantas.

As sementes passaram por procedimento de superação de dormência, quando necessário, sendo os tratamentos elencados na Tabela 3. Em cabine de segurança biológica, as sementes foram desinfestadas através de imersão em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e, em seguida, em NaClO 2% (v/v) por 15 minutos, sendo posteriormente lavadas dez vezes com água destilada autoclavada. As sementes foram acondicionadas em placas de Petri estéreis, contendo uma camada de algodão embebido em água destilada e forradas com papel-filtro. Em seguida, foram incubadas em câmara germinadora tipo B.O.D. a 30 °C com fotoperíodo de 12 horas, até que ocorresse a emissão das radículas.

Tabela 3. Métodos de superação de dormência de sementes de espécies arbóreas da Mata Atlântica utilizadas nos experimentos de avaliação do efeito da adição de *topsoil*.

Espécie	Superação de dormência por imersão	Referência
<i>S. multijuga</i>	H ₂ SO ₄ 98%/10 min	Piveta <i>et al.</i> (2010)
<i>P. reticulata</i>	H ₂ SO ₄ 98%/10 min	Silva <i>et al.</i> (2013)
<i>S. macranthera</i>	H ₂ SO ₄ 98%/15 min	Cipriani, Garlet e Lima (2007)
<i>A. leiocarpa</i>	H ₂ SO ₄ 98%/5 min	Castro <i>et al.</i> (2019)
<i>G. ulmifolia</i>	H ₂ SO ₄ 98%/8 min	Paiva Sobrinho <i>et al.</i> (2012)
<i>M. bimucronata</i>	H ₂ SO ₄ 98%/10 min	Fowler e Carpanezzi (1998)
<i>Ceiba speciosa</i>	H ₂ O em temperatura ambiente/24h	Carvalho e Nakagawa (2000)

As unidades experimentais consistiram em vasos com capacidade de 1.700 cm³, preenchidos com substrato autoclavado, constituído por areia e vermiculita na proporção 1:1 (v/v). No substrato presente no vaso foi feita uma abertura de 5 cm de profundidade, onde 80 g do *topsoil* foram depositados e três sementes pré-germinadas da espécie florestal alvo foram semeadas. Ao término da semeadura, os vasos foram irrigados com água filtrada; sendo posteriormente irrigados semanalmente. O desbaste foi feito aos 30 dias, deixando apenas uma plântula por unidade experimental.

Após a queda dos cotilédones, cada unidade experimental recebeu quinzenalmente 100 mL de solução nutritiva contendo macro (KCl, CaSO₄.2H₂O, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O), micronutrientes (H₃BO₃, MnSO₄.2H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, FeEDTA) e ácido cítrico (Anexo). A solução nutritiva utilizada foi a de Norris modificada para metade da concentração de sal (GUZMÁN; DÖBEREINER, 1968). Exceto *A. peregrina*, *D. nigra*, *M. bimucronata* e *P. reticulata*, as demais plantas receberam nitrogênio mineral através da aplicação de solução de nitrato de amônio (NH₄NO₃), em doses

crescentes (5mg N/mL a 30mg N/mL), segundo resposta visual.

4.4 Avaliações

A mensuração do crescimento da parte aérea de cada indivíduo foi realizada mensalmente, a partir de setembro de 2021, medindo-se a altura total de cada indivíduo com auxílio de trena graduada em centímetros, e o diâmetro do coletor das plantas, utilizando paquímetro digital graduado em milímetros. O encerramento de cada experimento em casa de vegetação ocorreu quando a diferença significativa entre os tratamentos se apresentou constante ao longo dos meses.

Com o término do experimento foi realizada a coleta e separação das partes aérea e radicular dos indivíduos. As raízes foram lavadas em água corrente sob peneira com malha de 2 mm, para remoção das partículas de solo remanescentes. Em seguida, realizou-se a coleta dos nódulos de espécies de leguminosas nodulíferas. Os materiais foram acondicionados em sacos de papel identificados e secos em estufa a 65° C por 72 horas. Em seguida, determinou-se em balança analítica as massas secas de parte aérea (MSPA), radicular (MSR) e de nódulos (MSN) dos indivíduos, separadamente.

Para a determinação dos teores nutricionais da massa seca de parte aérea, foi realizada a moagem do material em moinho de aço inoxidável de bancada. Foram determinados N, P, K, Ca e Mg. Foram determinados N, por espectrometria de massas; P, pelo método colorimétrico; K⁺, por fotometria de chamas; e Ca²⁺ e Mg²⁺ por absorção atômica. As análises químicas foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por Nogueira e Souza, 2005.

Para cada espécie, a colonização micorrízica foi avaliada a partir de amostras de 0,5 g de raízes finas frescas provenientes de três unidades experimentais por tratamento. As raízes foram lavadas, diafanizadas e coradas por metodologia proposta por Phillips e Hayman (1970), modificada por Koske e Gemma (1989) e Grace e Stribley (1991). Em tubos Falcon de 50 mL, as raízes foram lavadas em água corrente e diafanizadas com solução de KOH 2,5% (m/v) por 24 horas. Quando as raízes ainda estavam pigmentadas, foram clarificadas em solução de H₂O₂ 3% (m/v) alcalinizada (10 mL NH₄OH 20% em 100 mL de H₂O₂ 3%). Em seguida, as raízes foram lavadas abundantemente em água corrente, acidificadas com HCl 1% (m/v) por 12 horas e coradas com azul de metila 0,05% (m/v) em glicerol 50% (v/v) acidificado.

O percentual de raízes colonizadas por FMA foi verificado pelo método de intersecção em placa quadriculada (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980) em microscópio estereoscópico, com aumento de 40x. As raízes foram alocadas em placa de Petri com quadrículas de ½ polegada e realizou-se a contagem de no mínimo cem segmentos de raízes cruzando as linhas, sendo verificada a presença ou ausência de colonização micorrízica. O número de segmentos onde havia colonização foi transformado em porcentagem, de acordo com a quantidade total de segmentos visualizados.

Com base no percentual obtido, a colonização micorrízica foi avaliada qualitativamente pela metodologia de Carneiro *et al.* (1998), sendo categorizada em alta (> 50%), média (> 20% e < 50%), baixa (< 20%), e ausente (0%).

Após atenderem os preceitos estatísticos de homocedasticidade e normalidade, os dados de altura, diâmetro do coletor, massa seca de parte aérea e massa seca de raízes foram submetidos às análises de variância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no software R, versão 4.0.5, utilizando o pacote “easyanova” (ARNHOLD, 2021). Devido ao não atendimento dos pressupostos estatísticos, as variáveis massa seca de nódulos e colonização micorrízica foram analisadas estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização biológica do *topsoil* florestal

O *topsoil* apresentou densidade de 93 (23-388; $p = 0,05$) e 3,57 (0,5-26; $p = 0,05$) células de rizóbio g de solo⁻¹, quando utilizadas as leguminosas *M. pudica* e *P. vulgaris* como plantas-isca, respectivamente.

O número total de esporos de FMA recuperados foi de 400 em 50 cm³ de *topsoil*, sendo encontradas oito espécies de fungos micorrízicos arbusculares, distribuídas em três gêneros, cada um deles inserido em uma família distinta: Acaulosporaceae, Glomeraceae e Gigasporaceae. Dentre as espécies, houve predomínio de esporos de *G. macrocarpum* (Tabela 4).

Tabela 4. Espécies de fungos micorrízicos arbusculares encontradas em 50 cm³ de *topsoil* oriundo de floresta nativa de Rio Claro-RJ.

Espécies de fungos micorrízicos arbusculares
Família Acaulosporaceae
<i>Acaulospore foveata</i> Trappe & Janos
<i>Acaulospore mellea</i> Spain & Schenck
<i>Acaulospore rehmii</i> Sieverding & Toro
<i>Acaulospore scrobiculata</i> Trappe
<i>Acaulospore tuberculata</i> Janos & Trappe
Família Glomeraceae
<i>Glomus clavigerum</i> (Trappe) Almeida & Schenck
<i>Glomus macrocarpum</i> Tul. & C. Tul.
Família Gigasporaceae
<i>Racocetra verrucosa</i> (Koske & C. Walker) Oehl, FA Souza & Sieverd.

A Figura 3 evidencia as fotografias dos esporos das diferentes espécies de FMA encontradas, capturadas nos aumentos de 100 e 400 vezes.

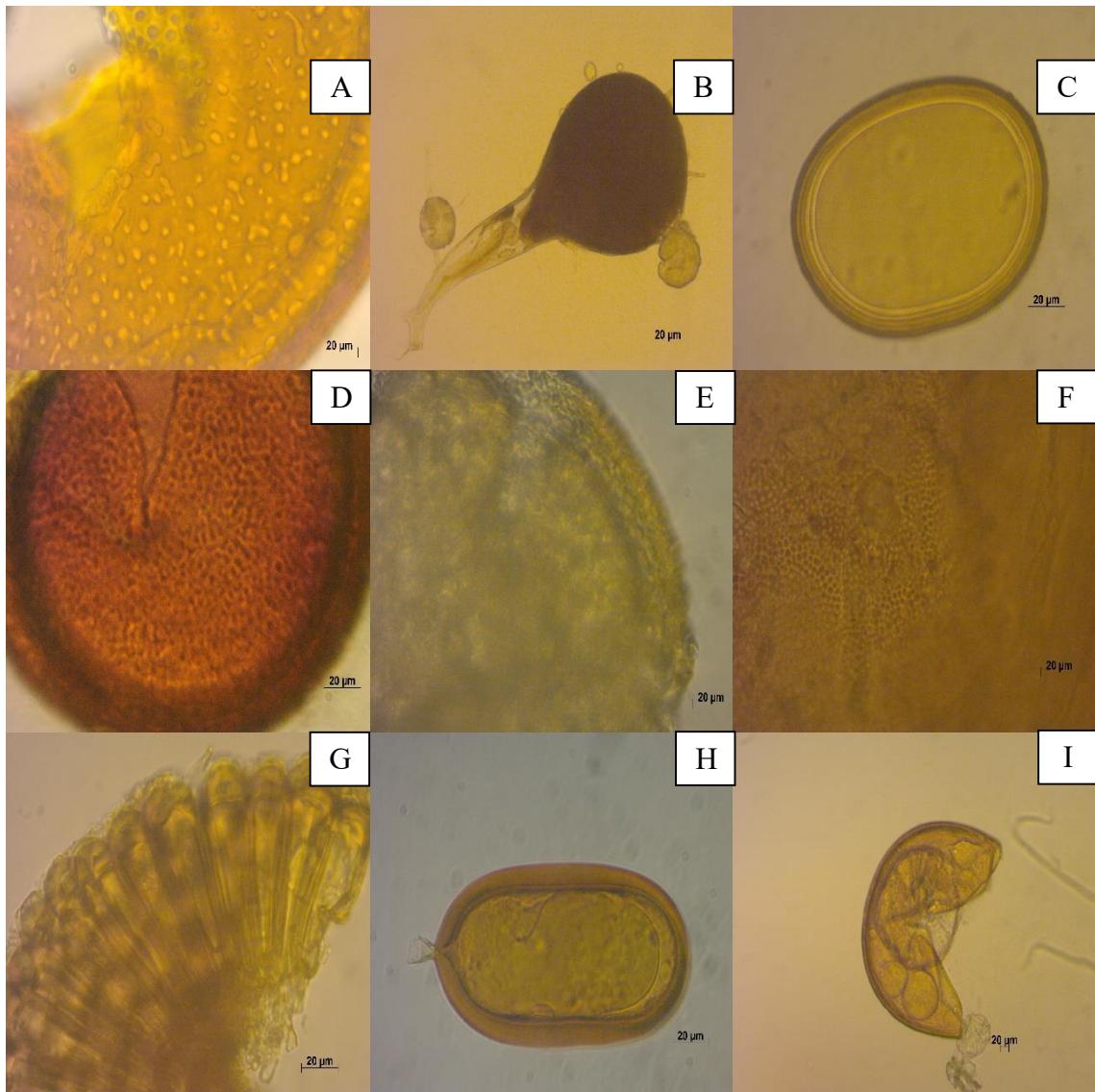


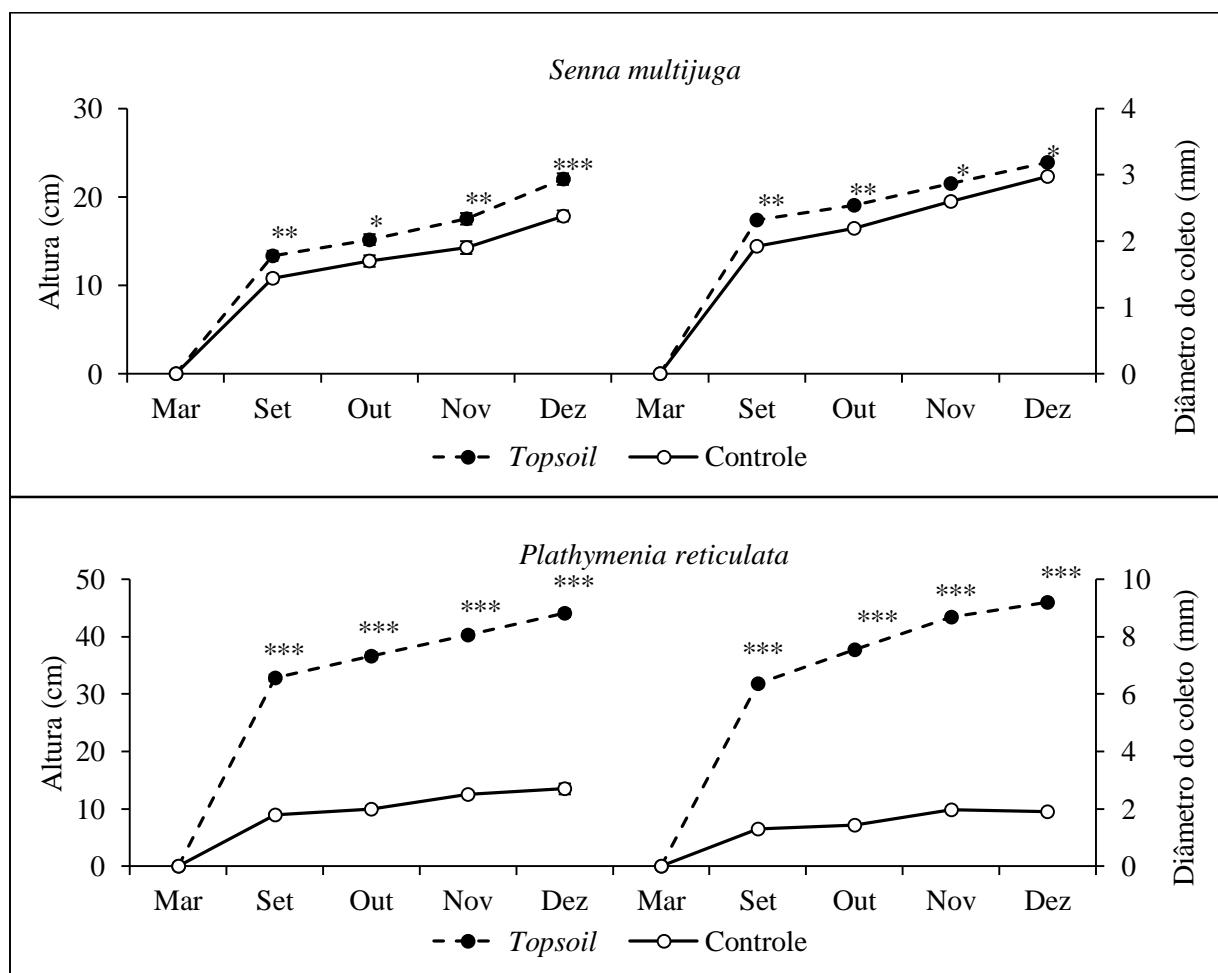
Figura 3. Esporo de *Acaulospora foveata* em aumento de 400 vezes, sendo evidenciadas depressões na superfície da parede celular (A); sáculo esporífero de *A. foveata* em aumento de 100 vezes (B); esporo de *A. mellea* em aumento de 400 vezes (C); esporo de *A. rehmii* em aumento de 400 vezes (D); esporo de *A. scrobiculata* em aumento de 400 vezes (E); tubérculos poligonais na parede do esporo de *A. tuberculata*, em aumento de 400 vezes (F); esporocarpo de *Glomus clavisporum* em aumento de 400 vezes (G); esporo de *G. macrocarpum* em aumento de 400 vezes (H); verrugas compactadas na parede do esporo de *Racocetra verrucosa*, em aumento de 100 vezes (I).

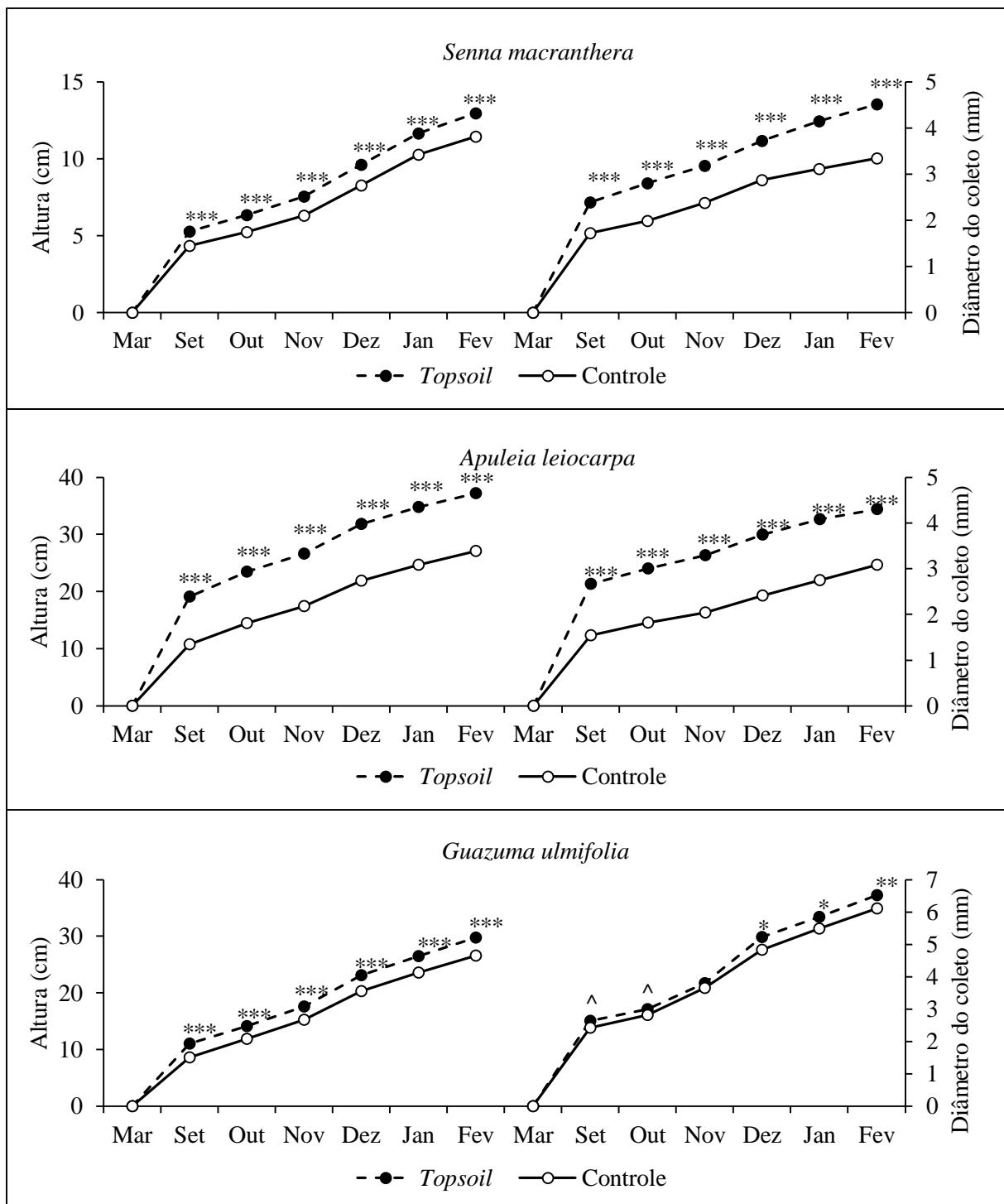
5.2 Efeito do topsoil no crescimento das espécies florestais

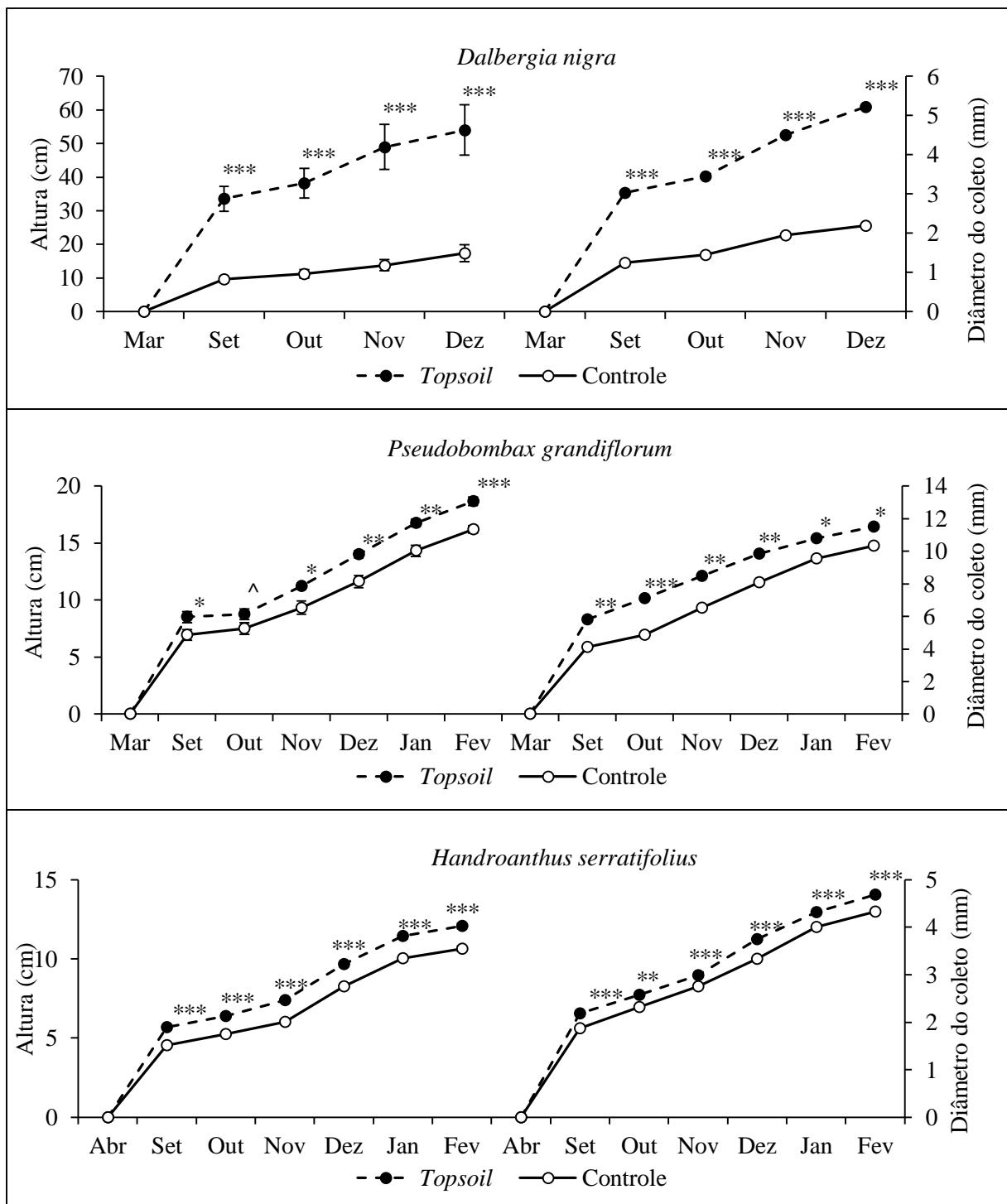
A adição de *topsoil* florestal *in natura* aumentou significativamente as médias de crescimento em altura de todas as 14 espécies arbóreas avaliadas, quando comparado ao tratamento controle (*topsoil* esterilizado em autoclave) (Figura 4). Esse comportamento foi constatado desde a primeira avaliação, um mês após a semeadura, mantendo-se ao longo dos meses subsequentes. As únicas espécies que fugiram a esse padrão foram *C. speciosa* e *A. peregrina*, onde plantas tratadas com *topsoil* não diferiram estatisticamente no último e a partir do quarto mês após o plantio, respectivamente, em relação aos grupos controle.

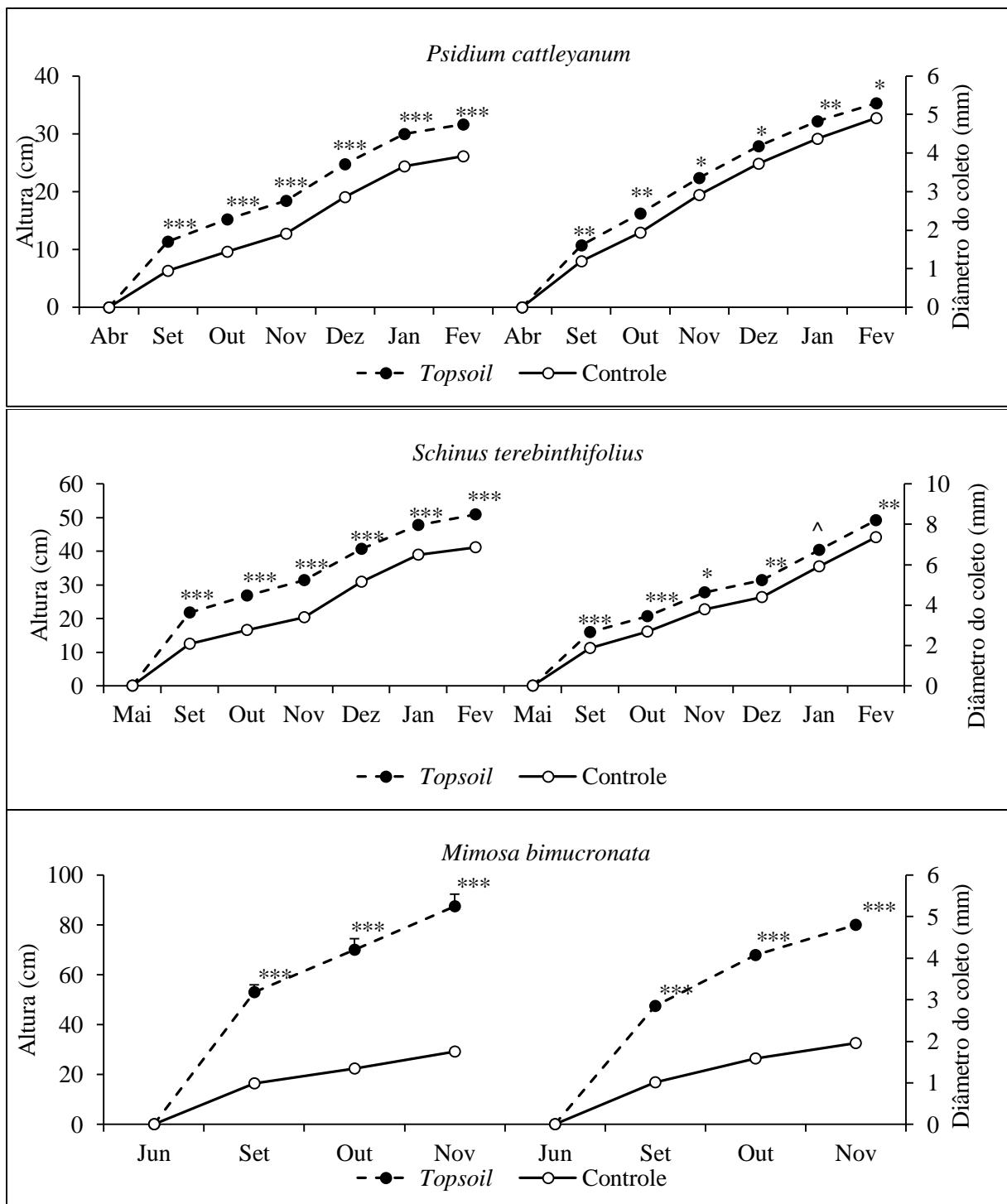
De modo semelhante à altura, os valores médios de diâmetro do coleto das 14 espécies estudadas foram afetados positivamente pelo uso do *topsoil in natura* durante o período de estudo. Em comparação com as mudas cultivadas com *topsoil* esterilizado, as mudas com *topsoil in natura* apresentaram crescimento significativamente maior no diâmetro do coleto. Contudo, no primeiro mês de avaliação, *C. pluviosum* não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, enquanto *A. peregrina* não apresentou diferenças nos dois últimos meses de avaliação, ou seja, janeiro e fevereiro de 2022.

As espécies *P. reticulata*, *D. nigra* e *M. bimucronata*, conhecidas por se associarem a bactérias fixadoras de nitrogênio, apresentaram os maiores ganhos mensais em altura e diâmetro do coleto com o uso do *topsoil*, em comparação ao tratamento controle. Embora *A. peregrina* também tenha capacidade de se associar a rizóbios, o que poderia resultar em maiores ganhos em crescimento, não foram observados aumentos expressivos na altura e no diâmetro do coleto ao longo do período avaliado, exceto nos primeiros meses.









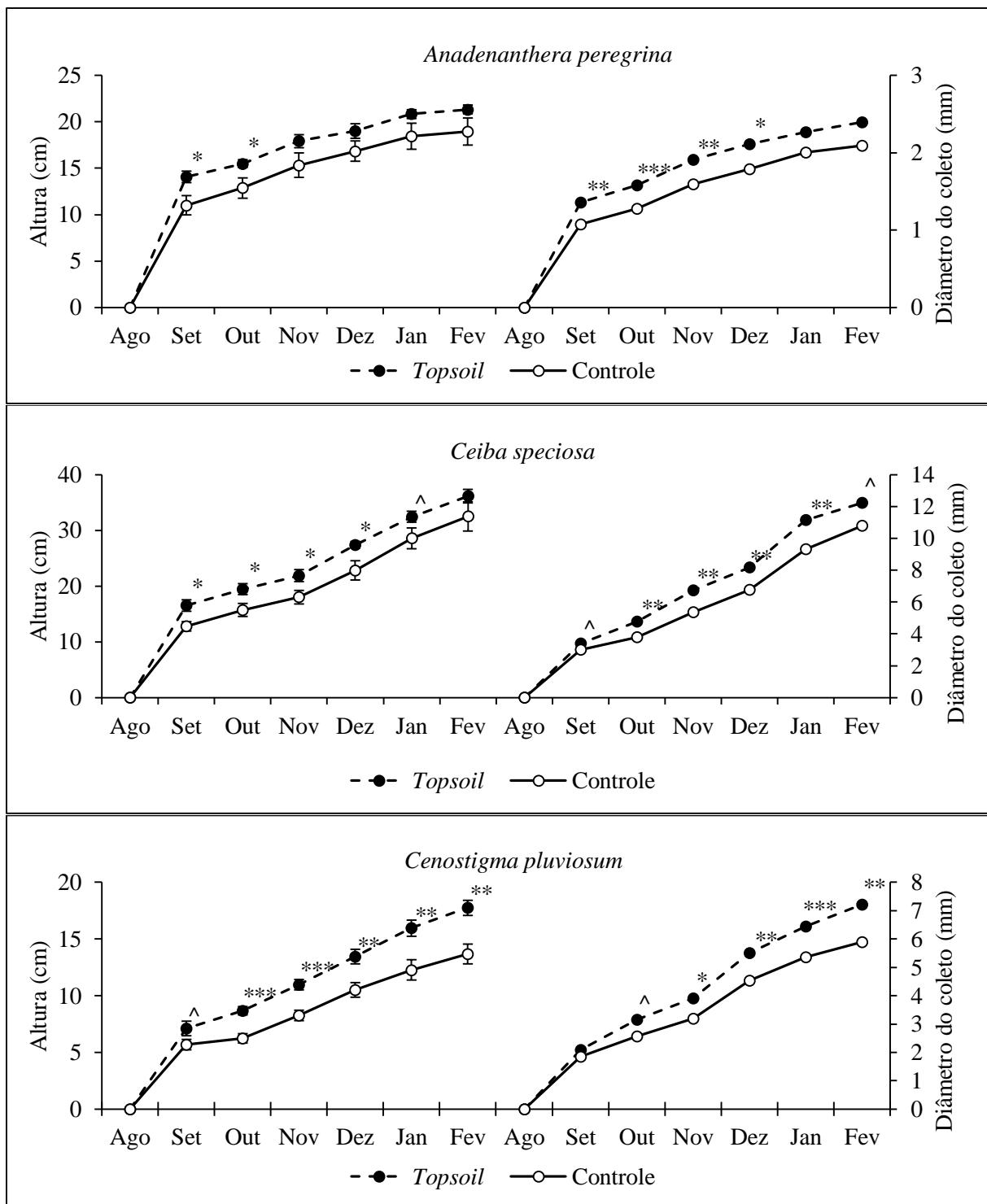


Figura 4. Curvas de crescimento médio em altura (cm) e diâmetro do coletor (mm) de *S. multijuga*, *P. reticulata*, *S. macranthera*, *A. leiocarpa*, *G. ulmifolia*, *D. nigra*, *P. grandiflorum*, *H. serratifolius*, *P. cattleyanum*, *S. terebinthifolius*, *M. bimucronata*, *A. peregrina*, *C. speciosa* e *C. pluviosum* em resposta à adição de topsoil florestal *in natura* ou esterilizado (controle) sob condições de cultivo em casa de vegetação. Sendo: *** ($p<0,001$), ** ($p<0,01$), * ($p<0,05$), ^ ($p<0,1$) e ausência de sinal gráfico indica que não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste F.

O efeito positivo do *topsoil* foi observado em todas as variáveis de crescimento analisadas (Tabela 5). Desse modo, ao término do estudo, as plantas que receberam o *topsoil in natura* apresentaram, de maneira geral, melhores resultados em termos de desenvolvimento de parte aérea, raízes e nódulos, diferenciando-se estatisticamente do tratamento controle. Contudo, não houve diferenças nos resultados da MSPA de *P. grandiflorum* e da MSR de *G. ulmifolia*.

A ausência de colonização micorrízica foi observada nas plantas cultivadas em vasos que receberam o *topsoil* esterilizado. No entanto, quando o *topsoil in natura* foi utilizado, as plantas de todas as espécies arbóreas apresentaram colonização micorrízica baixa, variando de 0% a 20%, exceto *C. pluviosum*, que obteve colonização por FMA classificada como média, de acordo com a metodologia proposta por Carneiro *et al.* (1998) (Tabela 5).

Tabela 5. Massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), massa seca de nódulos (MSN) e colonização micorrízica (CM) de *S. multijuga*, *P. reticulata*, *S. macranthera*, *A. leiocarpa*, *G. ulmifolia*, *D. nigra*, *P. grandiflorum*, *H. serratifolius*, *P. cattleyanum*, *S. terebinthifolius*, *M. bimucronata*, *A. peregrina*, *C. speciosa* e *C. pluviosum* em resposta à adição de *topsoil* florestal *in natura* ou esterilizado em vasos de plantio em casa de vegetação.

Espécie arbórea	Tratamento	MSPA (g)	MSR (g)	MSN (g)	CM (%)
<i>S. multijuga</i>	<i>topsoil</i>	1,59*	1,10*	-	2,44*
	controle	1,14	0,99	-	0
<i>P. reticulata</i>	<i>topsoil</i>	9,58*	5,84*	0,31*	2,23*
	controle	0,24	0,16	0	0
<i>S. macranthera</i>	<i>topsoil</i>	3,91*	3,30*	-	2*
	controle	2,94	2,34	-	0
<i>A. leiocarpa</i>	<i>topsoil</i>	4,69*	5,13*	-	14,45*
	controle	2,35	1,84	-	0
<i>G. ulmifolia</i>	<i>topsoil</i>	4,54*	5,32 ^(0,25)	-	18,23*
	controle	3,73	4,63	-	0
<i>D. nigra</i>	<i>topsoil</i>	2,25*	2,23*	0,16*	9,56*
	controle	0,21	0,06	0	0
<i>P. grandiflorum</i>	<i>topsoil</i>	5,65 ^(0,11)	12,36*	-	12,78*
	controle	5,05	8,69	-	0
<i>H. serratifolius</i>	<i>topsoil</i>	2,72*	7,19*	-	4,43*
	controle	1,99	2,79	-	0
<i>P. cattleyanum</i>	<i>topsoil</i>	7,90*	5,35*	-	8,97*
	controle	6,04	3,07	-	0
<i>S. terebinthifolius</i>	<i>topsoil</i>	9,83*	6,91*	-	8,98*
	controle	6,97	4,28	-	0
<i>M. bimucronata</i>	<i>topsoil</i>	6,54*	2,12*	0,36*	1,00*
	controle	0,36	0,23	0	0
<i>A. peregrina</i>	<i>topsoil</i>	0,33*	1,81*	0,06*	1,65*
	controle	0,22	1,14	0	0
<i>C. speciosa</i>	<i>topsoil</i>	7,23*	9,52*	-	2,74*
	controle	4,91	7,42	-	0
<i>C. pluviosum</i>	<i>topsoil</i>	6,97*	6,59*	-	40,50*
	controle	4,71	5,35	-	0

Média seguida de asterisco indica que os tratamentos diferiram entre si pelo teste F ($p<0,05$) nas variáveis MSPA e MSR para a determinada espécie. Para as variáveis MSN e CM, média seguida de asterisco indica que os tratamentos diferiram entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). Valores de p acima de 0,05 são expostos dentro dos parênteses.

-: nodulação não esperada.

O conteúdo nutricional presente na parte aérea das plantas variou de espécie para espécie e, de modo geral, o maior teor dos macronutrientes foi obtido quando aplicado *o topsoil in natura* ao substrato (Tabela 6).

Tabela 6. Conteúdo de nutrientes na parte aérea de 14 espécies arbóreas florestais em resposta à adição de *topsoil* florestal *in natura* ou esterilizado (controle) em vasos de plantio em casa de vegetação.

Espécie arbórea	Tratamento	N (%)	Ca (g/kg)	K (g/kg)	Mg (g/kg)	P (g/kg)
<i>S. multijuga</i>	<i>Topsoil</i>	2,47	13,54	15,55	2,32	4,50
	Controle	2,04	17,05	11,15	2,16	3,66
<i>P. reticulata</i>	<i>Topsoil</i>	1,43	11,96	16,39	2,76	9,52
	Controle	1,55	7,89	6,53	2,13	1,39
<i>S. macranthera</i>	<i>Topsoil</i>	0,93	15,67	12,27	1,80	3,30
	Controle	0,85	11,08	10,05	1,70	2,94
<i>A. leiocarpa</i>	<i>Topsoil</i>	0,84	9,41	11,24	1,95	2,56
	Controle	1,11	7,77	9,83	1,57	2,00
<i>G. ulmifolia</i>	<i>Topsoil</i>	2,54	8,02	21,96	2,65	2,25
	Controle	0,76	9,92	25,14	2,88	1,91
<i>D. nigra</i>	<i>Topsoil</i>	1,70	15,69	16,00	7,32	8,63
	Controle	1,53	6,98	15,49	3,71	3,21
<i>P. grandiflorum</i>	<i>Topsoil</i>	0,66	9,98	20,39	4,19	1,55
	Controle	0,64	10,72	17,57	4,29	1,26
<i>H. serratifolius</i>	<i>Topsoil</i>	1,23	10,42	16,11	3,47	1,71
	Controle	1,07	10,48	15,91	3,41	1,50
<i>P. cattleyanum</i>	<i>Topsoil</i>	0,51	8,41	11,46	2,45	1,17
	Controle	0,51	10,18	11,08	2,75	1,15
<i>S. terebinthifolius</i>	<i>Topsoil</i>	0,50	5,26	18,23	0,98	1,19
	Controle	0,49	4,77	15,57	0,89	1,17
<i>M. bimucronata</i>	<i>Topsoil</i>	2,39	21,82	12,61	3,05	2,74
	Controle	1,93	10,82	10,73	2,17	1,21
<i>A. peregrina</i>	<i>Topsoil</i>	1,13	17,28	12,90	2,47	8,72
	Controle	0,55	17,62	14,11	2,65	8,51
<i>C. speciosa</i>	<i>Topsoil</i>	0,66	12,14	23,59	3,83	1,53
	Controle	0,62	11,18	23,52	3,60	1,12
<i>C. pluviosum</i>	<i>Topsoil</i>	0,61	11,34	9,67	0,72	1,91
	Controle	0,79	8,88	8,00	0,56	1,30

6 DISCUSSÃO

O impacto positivo do *topsoil* florestal *in natura* no crescimento das espécies arbóreas nodulíferas, como *P. reticulata*, *D. nigra* e *M. bimucronata*, é corroborado por estudos anteriores, como o de Machado *et al.* (2004). Eles constataram que os rizóbios nativos presentes no substrato não esterilizado em vasos apresentaram boa eficácia no crescimento de *Calliandra macrocalyx* Harms em relação às estirpes selecionadas, indicando que o solo pode conter rizóbios tão eficientes quanto as estirpes selecionadas para a experimentação.

De mesmo modo, Silva (2018) verificou o sucesso do uso de dois *topsoils* oriundos de vegetação florestal nativa da Caatinga como fonte de inóculo de microrganismos simbiontes para a promoção de crescimento de uma leguminosa arbórea nativa do bioma, comumente empregada em reflorestamentos. Em casa de vegetação, utilizando sementes de *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. pré-germinadas em vasos de 980 mL contendo 1,5 kg de substrato com baixa concentração de microrganismos, constatou-se que os tratamentos com aplicação de 10 gramas de *topsoil* promoveram ganhos em altura, colonização micorrízica, massa seca de parte aérea, de raízes e de nódulos similares aos obtidos quando utilizado inoculante estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) indicadas para esta espécie vegetal. Nesse mesmo estudo, o efeito positivo do *topsoil* foi verificado independente da presença do inoculante de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), como também da aplicação de nitrogênio mineral (testemunha nitrogenada). Por fim, o autor sugere que a alta eficiência e eficácia dos inóculos de *topsoil* podem estar relacionadas com a adaptação de BFN e FMA autóctones às condições edafoclimáticas do bioma e à compatibilidade com a espécie vegetal hospedeira.

Em geral, maior responsividade das plantas à micorrização é observada em solos com baixos níveis de P (PEDONE-BONFIM *et al.*, 2017) e a manutenção de uma alta taxa de colonização radicular em altas doses de P é indicativo de alta dependência micorrízica da espécie arbórea (SANTOS *et al.*, 2016). Logo, a quantidade de fósforo presente na solução nutritiva (3,2 mg de P por planta a cada quinze dias) pode ter contribuído para menor colonização dos FMA nas plantas. Tal fato foi reportado por Freire *et al.* (2020) na colonização micorrízica da espécie florestal arbórea *Tachigali vulgaris* L.F. Gomes da Silva & H.C. Lima ao utilizar a mesma solução nutritiva sob condições de casa de vegetação. Em um outro estudo, Silva *et al.* (2016) apontaram que houve diminuição da colonização micorrízica em *Cecropia pachystachya* Trécul com o aumento dos teores de P no solo, porém sem afetar a altura, o diâmetro do coletor, a biomassa e os teores de fósforo na parte aérea das plantas.

No presente estudo, apesar da baixa colonização micorrízica, todas as espécies arbóreas apresentaram maiores teores de fósforo na parte aérea das plantas quando associadas ao *topsoil in natura* e a eficiência micorrízica foi verificada pelo aumento da massa de raízes de todas as espécies arbóreas.

As maiores médias mensais em altura e diâmetro do coletor foram alcançadas em três leguminosas (*P. reticulata*, *D. nigra*, *M. bimucronata*) que fazem associação simbiótica tanto com fungos micorrízicos arbusculares quanto com bactérias fixadoras de nitrogênio (associação tripartite). Plantas de *P. reticulata*, *D. nigra* e *M. bimucronata*, que se submeteram ao tratamento com aplicação de *topsoil*, apresentaram maior conteúdo de fósforo na parte aérea dentre as demais espécies. Esse resultado reflete um maior fornecimento de fósforo à planta, beneficiando também os rizóbios, que requerem grande quantidade de ATP para o processo de fixação biológica de nitrogênio. O fornecimento de fósforo para a planta facilita o crescimento dessa, o que promove maior disponibilidade de fotossintatos, aumentando a fixação biológica de nitrogênio (NASTO *et al.*, 2014).

Diversos trabalhos evidenciam que o efeito sinérgico da associação tripartite pode maximizar a aquisição de nutrientes, de modo a favorecer o desenvolvimento e o crescimento

de leguminosas arbóreas (GROSS; CORDEIRO; CAETANO, 2004; JESUS; SCHIAVO; FARIA, 2005; ANGELINI *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2016; OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2017b; BOURNAUD *et al.*, 2018; SILVA, 2018; AFKHAMI *et al.*, 2020; FREIRE *et al.*, 2020; SILVA, 2022). Por exemplo, Gross, Cordeiro e Caetano (2004) encontraram nodulação significativamente maior em plantas de *A. peregrina* quando inoculadas com BFN e FMA, em relação ao tratamento contendo apenas BFN. Como consequência, a inoculação concomitante dos microssimbiontes ocasionou aumento de 60% da biomassa das plantas aos 10 meses, em relação ao controle. Já a inoculação de apenas BFN ou FMA não proporcionou diferença na produção de biomassa das plantas.

Na associação tripartite, além das micorrizas fornecerem às plantas maior absorção de fósforo, essas também permitem maior dispersão dos rizóbios através de suas hifas, permitindo o contato com a rizosfera e, subsequentemente, favorecendo a nodulação (NOVAIS *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). Os FMA podem ainda ampliar a abundância e a massa dos nódulos, e em troca, os rizóbios podem favorecer a colonização micorrízica. Os efeitos indiretos ocorrem quando os microrganismos que fornecem recompensas complementares às plantas hospedeiras causam aumento do desempenho da planta, de modo que há um aumento na qualidade/quantidade dos recursos disponíveis para o fornecimento de um ou mais microrganismos (AFKHAMI *et al.*, 2020).

Contudo, nem sempre a presença de espécies de FMA e BFN no solo promoverá melhor desempenho da leguminosa arbórea. *A. peregrina* apresentou baixos valores de colonização micorrízica, assim como uma diminuta massa seca de nódulos. Coincidentemente, as plantas dessa espécie não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos para altura e diâmetro do coletor ao final do estudo, apenas nas demais variáveis. No estudo de Scotti e Corrêa (2004) foi mostrado que a associação entre BFN e FMA causou maior crescimento em altura de *A. peregrina* apenas aos 20 meses após o plantio.

Outros estudos mostraram que a inoculação de FMA resulta em efeito positivo no crescimento de *A. peregrina* (PEREIRA *et al.*, 1996; TÓTOLA; BORGES, 2000; PAGANO; CABELLO; SCOTTI, 2007). Em casa de vegetação, Pagano, Cabello e Scotti (2007) atestaram que doses maiores de fósforo potencializaram os benefícios dos FMA no crescimento da espécie vegetal, produzindo mudas mais vigorosas. Em outro trabalho, Pereira *et al.* (1996) observaram maiores teores nutricionais na parte aérea de plantas de *A. peregrina* que receberam altas doses de fósforo, do que naquelas que foram colonizadas por *Glomus etunicatum* em baixo teor do nutriente, sugerindo que *A. peregrina* seja uma espécie com baixo micotrofismo.

Em contraste a este trabalho, alguns estudos não mostraram resposta positiva do *topsoil* sobre o crescimento de espécies arbóreas nativas cultivadas em vasos com capacidade de 1.700 cm³, em casa de vegetação. Por exemplo, Silva (2022) relata que a adição de 5 g de *topsoil* coletado de remanescentes de vegetação nativa da Caatinga não foi capaz de promover o crescimento das leguminosas arbóreas *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, *Mimosa caesalpiniifolia* Benth., *Piptadenia retusa* P.G.Ribeiro, Seigler & Ebinger e *Mimosa ophthalmocentra* Mart. ex Benth. O autor associou o resultado à baixa densidade de rizóbios no *topsoil* e à presença de rizóbios competitivos, porém com baixa eficiência simbótica. Entretanto, no mesmo estudo, o autor mostrou que inoculantes produzidos com estípites de rizóbios autóctones isoladas do mesmo *topsoil* mostraram-se eficientes em nodular e promover o crescimento das espécies arbóreas avaliadas.

Em estudo desenvolvido por McMahan *et al.* (2022) em casa de vegetação, adições de *topsoil* florestal correspondentes a 5% (38 mL) e 25% (188 mL) de vasos de 750 mL contendo rejeitos de mineração de cobre e ouro ou estéril de mina aumentaram a sobrevivência e o crescimento de mudas das espécies arbóreas temperadas *Salix scouleriana* (salgueiro), *Alnus viridis* (amieiro) e *Picea engelmannii* (abeto). Os maiores valores de colonização de fungos ectomicorrízicos foram obtidos na maior proporção de solo florestal. Contudo, o crescimento

de *A. viridis* foi pouco influenciado pela adição de *topsoil*, possivelmente devido à quantidade baixa de BFN e a incompatibilidade com os fungos presentes no inóculo, denotando a relevância de escolher um solo doador que contenha as plantas alvo ou ainda, que apresente outras espécies vegetais que se associam a microrganismos compatíveis. Resultados distintos entre as espécies vegetais em *topsoil* esterilizado indicaram que as plantas com maior dependência de microrganismos simbiontes (*P. engelmannii* e *A. viridis*) se beneficiaram do componente biológico do *topsoil*, enquanto *S. scouleriana*, espécie que apresenta baixa dependência micorrízica, se beneficiou apenas do componente físico e químico do *topsoil* florestal.

7 CONCLUSÕES

A dose de 80 g de *topsoil* florestal *in natura* foi suficiente para a promoção do crescimento das 14 espécies nativas estudadas, evidenciando o papel do *topsoil* como uma ferramenta biotecnológica a ser utilizada na produção de mudas destinadas à recuperação de áreas degradadas. Esses resultados foram atribuídos à presença de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) nodulíferas, que estabeleceram uma associação efetiva com as espécies. Vale ressaltar, entretanto, que o estudo não avaliou a presença ou efeito de outros grupos de microrganismos presentes no *topsoil* que possam ser potencialmente benéficos ao crescimento das plantas.

CAPÍTULO II

APLICAÇÃO DE *TOPSOIL* FLORESTAL NOS BERÇOS DE PLANTIO DE ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA EM ÁREA DE PASTAGEM DEGRADADA

RESUMO

Os microrganismos do solo são fundamentais para a manutenção da fertilidade do solo e para a saúde das plantas. Em áreas degradadas, a reintrodução do microbioma nativo do solo pode potencializar a sobrevivência e o crescimento de mudas plantadas, acelerando a restauração ecológica. Este capítulo teve como objetivo avaliar o efeito da microbiota presente no *topsoil* florestal sobre a sobrevivência e o crescimento de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica. Para isso, realizou-se um experimento de campo em uma área de pastagem degradada em Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro. Neste experimento foi realizado o plantio de espécies arbóreas nativas comuns em reflorestamentos da região, utilizando-se 200 g de *topsoil in natura* ou esterilizado (como controle) no berço de plantio. O experimento foi desenhado como um delineamento em blocos casualizados, com dois tratamentos e cinco repetições. Foram avaliadas as espécies *Anadenanthera peregrina*, *Apuleia leiocarpa*, *Ceiba glaziovii*, *Citharexylon myrianthum*, *Dalbergia nigra*, *Genipa americana*, *Handroanthus chrysotrichus*, *Inga edulis*, *Lecythis pisonis*, *Plathymenia reticulata* e *Tabernaemontana fuchsiiifolia*. A sobrevivência, altura e diâmetro ao nível do solo foram medidos trimestralmente até os 12 meses após o plantio. Os resultados apontaram que a aplicação do *topsoil* florestal *in natura* não teve influência significativa na sobrevivência e no crescimento das mudas durante o período analisado ($p>0,05$). Isso pode ser explicado pelo baixo fornecimento de bactérias fixadoras de nitrogênio e esporos de fungos micorrízicos arbusculares pelo *topsoil* florestal, além do substrato das mudas já estar colonizado por esses microrganismos simbiontes. Em estudos futuros, será interessante avaliar a produção de mudas, em substratos com baixa carga microbiana, com os microrganismos nativos do *topsoil* florestal. Essa pode ser uma alternativa para acelerar a restauração ecológica de áreas degradadas tanto acima quanto abaixo do solo.

Palavras-chave: restauração ecológica, microrganismos nativos, solo florestal.

ABSTRACT

Soil microorganisms are essential for maintaining soil fertility and plant health. In degraded areas, the reintroduction of the native soil microbiome can enhance the survival and growth of planted seedlings, accelerating ecological restoration. This chapter aimed to evaluate the effect of the microbiota present in forest topsoil on the survival and growth of tree species native to the Atlantic Forest. For this, a field experiment was carried out in a degraded pasture area in Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro. In this experiment, native tree species common in reforestation areas in the region were planted, using 200 g of *in natura* or sterilized topsoil (as control) in the planting hole. The experiment was designed as a randomized block design, with two treatments and five replications. The species *Anadenanthera peregrina*, *Apuleia leiocarpa*, *Ceiba glaziovii*, *Citharexylon myrianthum*, *Dalbergia nigra*, *Genipa americana*, *Handroanthus chrysotrichus*, *Inga edulis*, *Lecythis pisonis*, *Plathymenia reticulata* and *Tabernaemontana fuchsiiifolia* were evaluated. Survival, height and diameter at ground level were measured quarterly up to 12 months after planting. The results showed that the application of *in natura* forest topsoil had no significant influence on the survival and growth of the seedlings during the analyzed period ($p>0.05$). This can be explained by the low supply of nitrogen-fixing bacteria and spores of arbuscular mycorrhizal fungi by the forest topsoil, in addition to the substrate of the seedlings being already colonized by these symbiotic microorganisms. In future studies, it will be interesting to evaluate the production of seedlings, in substrates with low microbial load, with native microorganisms of forest topsoil. This can be an alternative to accelerate the ecological restoration of degraded areas both above and below ground.

Key words: ecological restoration, native microorganisms, forest soil.

8 INTRODUÇÃO

O corte e a queima de florestas tropicais seguidos da má gestão de pastagens afetam as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (FERREIRA *et al.*, 2016). Essas práticas promovem no solo perdas da cobertura vegetal e do estoque de carbono, aumentando os processos erosivos, diminuição na umidade e alteração do pH e teor de nutrientes (FERREIRA *et al.*, 2016; NAVARRETE *et al.*, 2016; PEDRINHO *et al.*, 2019). Além disso, afetam drasticamente os microrganismos do solo, que representam a fração do solo mais sensível às mudanças e manejo do uso da terra (BARROS *et al.*, 2019).

Microrganismos desempenham serviços ecossistêmicos essenciais no solo, como a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes, a agregação do solo e o fornecimento de nutrientes às plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; FIERER, 2017; BERKELMANN *et al.*, 2020). Apesar de sua importância, diversos estudos indicam que a conversão das florestas a pastagens pode causar impactos negativos na microbiota do solo, como a redução da biomassa, variação na composição e diversidade, com perda de espécies raras ou especializadas e implicações nas funções desempenhadas por esses microrganismos (JESUS *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2013; MENDES *et al.*, 2015b; CARVALHO *et al.*, 2016; GOSS-SOUZA *et al.*, 2017; BARROS *et al.*, 2019; PEDRINHO *et al.*, 2019).

A restauração funcional dos ecossistemas deve promover comunidades bióticas acima e abaixo do solo. Contudo, a maioria dos projetos de restauração florestal não apresenta uma abordagem holística (SCHMIDT *et al.*, 2020), tendo como intuito prioritário a reintrodução de espécies arbóreas como forma de acelerar a sucessão ecológica. Esses projetos não levam em consideração a reintrodução do microbioma florestal nativo para restabelecer processos ecológicos subterrâneos, que influenciam direta e indiretamente no crescimento das plantas.

Esforços de restauração destinados a restaurar a comunidade de microrganismos, incluindo fungos, bactérias e archaea associados às plantas e ao solo (ou seja, o microbioma do solo) podem ser determinantes para o sucesso da restauração florestal (SCHMIDT *et al.*, 2020).

O estudo de Hüller *et al.* (2017) evidenciou que a deposição de *topsoil* de origem florestal na superfície do solo foi capaz de aumentar a sobrevivência e o crescimento de indivíduos de *Schinus terebinthifolius* Raddi introduzidos por semeadura direta em uma área de cultivo abandonada. Quando adicionado o *topsoil*, a sobrevivência e o crescimento foram 3 e 4 vezes maiores aos 12 meses após a semeadura, respectivamente, em relação ao tratamento em que foi realizada apenas a semeadura direta, diferindo-se estatisticamente. Contudo, os autores relatam que foram utilizados 18 kg em cada parcela de 2 m x 2,5 m e sugerem a investigação de uma quantidade ótima para minimizar os custos elevados da técnica.

Devido ao custo elevado com coleta e transporte do *topsoil* de áreas doadoras (CHAER *et al.*, 2021), a transposição desse insumo em área total como fonte de microrganismos na restauração florestal se torna inviável na maior parte das situações. Dessa forma, técnicas menos onerosas e que forneçam microrganismos autóctones e simbiontes das plantas empregadas em reflorestamentos devem ser testadas. Uma estratégia potencialmente eficaz para integrar a restauração da vegetação e microbioma florestal em projetos de restauração de áreas degradadas é adicionar pequenas quantidades de *topsoil* florestal próximo ao sistema radicular das espécies nativas durante o plantio na área. Dessa forma, o uso de *topsoil* florestal para inoculação dos berços de plantio pode trazer vantagens ao crescimento e sobrevivência das espécies arbóreas nativas, uma vez que a microbiota adicionada pode incluir microrganismos que promovem o crescimento dessas espécies, além de serem adaptados às condições edafoclimáticas locais. Além disso, este processo pode contribuir para o impulso de diversos processos ecológicos na área restaurada.

Com base nas informações apresentadas, o objetivo deste capítulo foi investigar como a adição de *topsoil* florestal nos berços de plantio afeta a sobrevivência e o crescimento de 11 espécies arbóreas da Mata Atlântica quando plantadas em uma área de pastagem degradada. Para alcançar este objetivo, foi realizada uma caracterização da fertilidade e textura do *topsoil* proveniente de floresta e do solo da área degradada, determinada a densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio e esporos de fungos micorrízicos arbusculares presentes em ambos os locais e avaliado o impacto da microbiota do *topsoil* aplicado nos berços de plantio na sobrevivência e crescimento das espécies arbóreas nativas.

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 Caracterização das áreas de estudo

As áreas de coleta do *topsoil* e implantação do experimento de campo se localizam no município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro (Figura 5). Ambas pertencem a proprietários rurais que fazem parceria com a Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), visando a conservação e a recomposição florestal dos ambientes.

O município está localizado na Serra do Mar e tem como municípios limítrofes Teresópolis, Nova Friburgo, Silva Jardim, Rio Bonito, Tanguá, Itaboraí e Guapimirim. Cachoeiras de Macacu compreende área territorial de 954,749 km², sendo constituído pelos distritos de Cachoeiras de Macacu, Japuíba e Subaio. (IBGE, 2019).



Figura 5. Localização geográfica do município de Cachoeiras de Macacu, RJ. Fonte: EMATER, 2022.

A REGUA é uma Organização Não Governamental (ONG) sem fins lucrativos, categorizada como Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), cuja missão institucional é a conservação da Mata Atlântica e sua biodiversidade na sub-bacia do rio Guapiaçu. Para atender esse objetivo, a ONG busca proteger as florestas através da aquisição de terras e parcerias com proprietários rurais, patrulhar e monitorar as áreas pertencentes e restaurar habitats degradados utilizando recursos provenientes de diversas parcerias nacionais e internacionais. A ONG ainda atua incentivando e apoiando pesquisas científicas, projetos de reintrodução de fauna local, programas de educação ambiental e ecoturismo com ênfase na observação de aves e da natureza (REGUA, 2021). Atualmente, a instituição dispõe de terras de propriedades particulares e de propriedades parceiras que abrangem 11.697 ha de áreas protegidas.

O clima da região é do tipo Af, segundo a classificação de Köppen, isto é, tropical úmido, sem estação marcadamente seca. De acordo com Azevedo *et al.* (2018), a altitude da região varia de 40 a 2.200 metros acima do nível do mar. A precipitação média anual na região

é de 2.050 mm, com média mensal oscilando de 337,8 mm em fevereiro a 59,3 mm em julho; e a temperatura média anual é de 21,9 °C, sendo janeiro o mês mais quente (25,3 °C), e julho, o mais frio (17,9 °C).

A Figura 6 evidencia a temperatura mínima, média e máxima mensais, bem como a precipitação total mensal e os dias de chuva durante cada mês de condução experimental. Os dados referentes à temperatura foram derivados de satélites e disponibilizados pelo sistema NASA-POWER (<https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer>). A precipitação total foi obtida através de dados do Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais (<http://www2.cemaden.gov.br/mapainterativo/#>) para a estação pluviométrica São Francisco de Assis, em Cachoeiras de Macacu, que é situada com maior proximidade à área experimental.

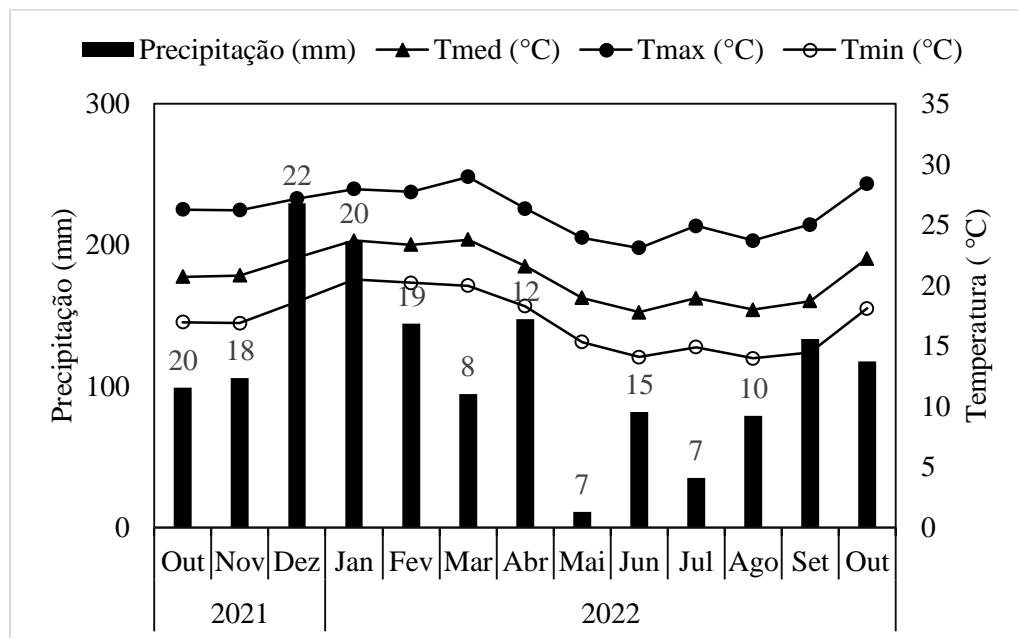


Figura 6. Precipitação total mensal e temperaturas mínima, média e máxima mensais em Cachoeiras de Macacu, de outubro de 2021 a outubro de 2022. Fonte: (CEMADEN, 2022; NASA-POWER, 2022). Os números acima das barras indicam a quantidade de dias com precipitação durante o mês.

A cobertura vegetal original da região foi classificada como Floresta Ombrófila Densa, variando em três diferentes fitofisionomias: Floresta Ombrófila Densa Aluvial nas partes mais baixas da paisagem, em relevo plano; Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas nas áreas de planície costeira, em relevo suave ondulado; Floresta Ombrófila Densa Submontana, em relevo ondulado, e Montana na parte mais alta da porção da paisagem, onde o relevo se apresenta montanhoso e escarpado. No entorno da REGUA, ocorrem fragmentos florestais secundários de diferentes tamanhos, imersos em uma matriz onde predominam áreas de pastagem e agricultura (AZEVEDO *et al.*, 2018).

O local de coleta do *topsoil* é um fragmento florestal da Mata Atlântica em estágio avançado de sucessão, presente em uma propriedade rural parceira da REGUA, em Areal, no município de Cachoeiras de Macacu, RJ (22°27'17.67"S, 42°50'04.87"O). A vegetação apresenta estratos arbóreo, arbustivo e herbáceo e a área apresenta relevo plano a suave ondulado.

O experimento foi conduzido em área de pastagem abandonada ($22^{\circ}43'55''S$ $42^{\circ}74'17''O$), com predomínio de capim-sapê (*Imperata brasiliensis* Trin.) e presença de capim-jaraguá (*Hyparrhenia rufa* (Ness) Stapf.). A encosta apresenta relevo fortemente ondulado, com declividade variando de 20 a 45% (EMBRAPA, 2006), altitude média de 106 metros e solo classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico (PINHEIRO, 2014).

9.2 Coleta e caracterização do *topsoil* florestal e do solo da pastagem

A coleta do *topsoil* florestal foi realizada em setembro de 2021 em 20 pontos aleatórios dentro do fragmento, em um gradiente do interior à borda da floresta. As amostras foram retiradas da camada de 0-2,5 cm de profundidade do solo, em 0,55 m x 0,55 m de solo, com auxílio de um sacho, descartando a serrapilheira acima do solo. O *topsoil* coletado compreendeu o subhorizonte hemiorgânico A₁₁, que corresponde aos três centímetros iniciais do horizonte A₁ e apresenta maior concentração de nutrientes (KINDEL *et al.*, 2003). Em seguida, o *topsoil* foi peneirado em malha de 2 mm no ato da coleta e o material foi homogeneizado e acondicionado em sacos plásticos identificados. O mesmo procedimento foi realizado para o solo da pastagem, no qual o experimento posteriormente foi instalado.

As amostras foram retiradas na camada de 0-20 cm de profundidade do solo para as análises químicas e física, apenas sendo coletado nos 2,5 cm iniciais de profundidade do solo para a realização das análises microbiológicas.

Amostras do *topsoil* e do solo da pastagem foram mantidas sob refrigeração a $\pm 5^{\circ}C$ até a realização das análises químicas, físicas e biológicas.

9.2.1 Análises física e química do *topsoil* florestal e do solo da pastagem

As análises granulométricas do *topsoil* e do solo da pastagem foram realizadas pelo método do densímetro (TEIXEIRA *et al.*, 2017), sendo definidos os teores de areia + silte e argila. As análises químicas foram feitas de acordo com as metodologias descritas por Teixeira *et al.* (2017). Os seguintes atributos químicos foram determinados: matéria orgânica, através do método de oxirredução; pH em água (1:2,5 solo/água), aferido por potenciometria; cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}), por espectrometria de absorção atômica, e alumínio (Al^{3+}) por titulação, após extração com KCl 1 mol L^{-1} ; fósforo (P) e potássio e (K^{+}) por espectrofotometria de chama; acidez potencial ($H+Al$) por titulação, após extração com acetato de cálcio; soma de bases (S); capacidade de troca catiônica potencial (CTC a pH 7.0) e saturação por bases (V). A Tabela 7 apresenta a caracterização da fertilidade e os percentuais de areia, argila e silte do *topsoil* e do solo da área de pastagem. De acordo com os resultados, verifica-se que o *topsoil* florestal apresenta textura média e o solo da pastagem, argilosa.

Tabela 7. Caracterização química e física do *topsoil* florestal e do solo da área de implantação do experimento, coletados nas profundidades de 0-2.5 cm e 0-20 cm, respectivamente.

	MO	pH	N	P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	S	CTC pH 7	V	Are + Sil	Arg --g/kg--
	dag/dm ³		--mg/dm ³ --						-----cmol/dm ³ -----			%		
<i>Topsoil</i> florestal	2,8	4,8	-	18,2	77	3,3	0,8	0,3	5,2	4,30	9,50	45	720	280
Solo da pastagem	2,3	4,7	1,0	2,8	26	0,2	0,5	1,2	5,6	0,77	6,37	12	635	365

pH em água; S: soma de bases; CTC pH7: capacidade de troca catiônica potencial; V: saturação por bases; Are: areia; Arg: Argila; Sil: Silte.

9.2.2 Análises biológicas

As análises microbiológicas consistiram na determinação da densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (rizóbios) e de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) presentes no *topsoil* florestal e no solo da área de pastagem.

9.2.2.1 Determinação da densidade de rizóbios

A determinação da população de rizóbios presentes no *topsoil* florestal e na pastagem foi realizada pelo método do número mais provável, NMP (JARVIS; WILRICH; WILRICH, 2010), utilizando-se as leguminosas *Mimosa pudica* L. (dormideira) e *Phaseolus vulgaris* L. (feijão-comum) como plantas-isca. O procedimento de plantio, a condução do estudo e a análise dos resultados foram semelhantes aos realizados no primeiro capítulo desta tese.

9.2.2.2 Determinação da densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares

Os procedimentos de extração, contagem e identificação dos esporos de FMA foram semelhantes aos realizados no primeiro capítulo desta tese, sendo realizados no Laboratório de Micorrizas, situado na Embrapa Agrobiologia.

As fotografias das espécies identificadas foram feitas com o auxílio do microscópio Zeiss, com sistema de captura composto por câmera Axiocam ERc 5s e software Axiovision.

9.3 Delineamento e condução experimental

Em outubro de 2021 foi instalado um experimento em área de pastagem abandonada, em Cachoeiras de Macacu. O delineamento adotado foi em blocos casualizados, com cinco repetições e dois tratamentos, totalizando 10 parcelas experimentais. Cada uma delas abrangeu uma área de aproximadamente 300 m² (30 m x 10 m), contendo ao menos cinco indivíduos de cada uma das 11 espécies arbóreas empregadas. Três blocos foram alocados na vertente leste, cada um em um terço da encosta, e outros dois, alocados na vertente oeste nos terços médio e superior.

O experimento contemplou os seguintes tratamentos: (1) aplicação de 200g do *topsoil* florestal *in natura* no fundo do berço de plantio e (2) e aplicação de 200g do *topsoil* esterilizado

no fundo do berço de plantio, como tratamento controle (Figura 7). O *topsoil* utilizado no tratamento controle foi submetido ao processo de autoclavagem a 121 °C por 60 minutos, repetindo-se o procedimento após dois dias de modo a matar a microbiota existente. O material permaneceu estocado por 15 dias após a autoclavagem para a reoxidação de manganês potencialmente solubilizado no procedimento.



Figura 7. Localização geográfica da área experimental, em Cachoeiras de Macacu – RJ. Retângulos vermelhos representam os blocos experimentais; marcadores verdes, as parcelas contendo *topsoil in natura*; marcadores azuis, as parcelas contendo *topsoil* esterilizado.

As espécies arbóreas da Mata Atlântica escolhidas para o experimento estão elencadas na Tabela 8 e foram adquiridas no viveiro da REGUA, que as produz com sementes oriundas dos remanescentes florestais da própria reserva para serem empregadas em projetos de reflorestamento na região.

Tabela 8. Espécies arbóreas e respectivas famílias botânicas e grupos ecológicos empregadas no experimento em Cachoeiras de Macacu, RJ.

Nome científico	Nome popular	Família	Grupo ecológico
<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg.	Angico-vermelho*	Leguminosae	NP
<i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J.F.Macbr.	Garapa	Leguminosae	NP
<i>Ceiba glaziovii</i> (Kuntze) K.Schum.	Paineira-branca	Malvaceae	NP
<i>Citharexylon myrianthum</i> Cham.	Pau-viola	Verbenaceae	P
<i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Allemão ex Benth.	Jacarandá-dabahia*	Leguminosae	NP
<i>Genipa americana</i> L.	Jenipapo	Rubiaceae	NP
<i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) Mattos	Ipê-amarelo	Bignoniaceae	NP
<i>Inga edulis</i> Mart.	Ingá-de-metro*	Leguminosae	P
<i>Lecythis pisonis</i> Cambess.	Sapucaia	Lecythidaceae	NP
<i>Plathymenia reticulata</i> Benth.	Vinhático*	Leguminosae	NP
<i>Tabernaemontana fuchsifolia</i> A.DC.	Leiteira	Apocynaceae	P

P: pioneira; NP: não pioneira. *: Espécies que desempenham associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas.

As mudas foram produzidas em sacos plásticos de 9 x 20 cm (diâmetro x altura) contendo substrato composto por terra de subsolo argiloso, solo superficial de área agrícola e composto orgânico, na proporção volumétrica de 10:4:2. O composto orgânico apresentava as seguintes características: 1% N total, 20% umidade, 10% carbono orgânico, pH 6,8, relação C/N de 7%; e CTC de 310 cmolc/kg. Duas mudas de cada espécie foram separadas, lavadas e avaliadas quanto à taxa de raízes colonizadas por FMA, conforme metodologia descrita no Capítulo I desta tese, e à presença de nódulos ativos de bactérias fixadoras de nitrogênio.

Um mês antes da instalação do experimento foi realizada a roçada em área total, através do uso de roçadeiras laterais, e quinze dias antecedendo ao plantio foi aplicado herbicida à base de glifosato com pulverizador costal em área total, seguindo as recomendações do fabricante.

A demarcação dos berços de plantio foi realizada adotando-se o espaçamento de 2 m x 2 m e o coroamento, feito com enxada, removeu a vegetação existente em um raio de 50 cm. Em seguida, os berços foram abertos com o auxílio de motocoveador com broca acoplada, nas dimensões de 30 x 30 x 30 cm (comprimento x largura x profundidade), sendo incorporados ao solo 100 g de calcário e 150 g de fertilizante organomineral (3% de N total, 10% P₂O₅, 5% K₂O, 3% Ca, 1% S, 8% carbono orgânico, 15% umidade e CTC de 80 mmolc/dm³).

O controle de formigas cortadeiras foi realizado através da aplicação de iscas granuladas à base de sulfluramida (0,3%) logo após a roçada da área, imediatamente após o plantio e até aos seis meses posteriores.

As roçadas e coroamento foram empregados periodicamente, aos 3, 5 e 12 meses após o plantio, de acordo com a necessidade de minimizar o efeito da competição imposta pelas gramíneas.

9.4 Avaliações

O monitoramento de sobrevivência e crescimento de cada indivíduo arbóreo foi realizado aos 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o plantio.

A avaliação da sobrevivência das mudas foi executada um mês após o plantio e, sendo verificado algum indivíduo morto, esse foi substituído por outro da mesma espécie. A taxa de sobrevivência das espécies foi quantificada aos 3, 6, 9 e 12 meses após o plantio, sendo expressa em porcentagem.

As avaliações de crescimento consistiram na mensuração do diâmetro ao nível do solo e a altura total, com auxílio de paquímetro digital graduado em milímetros e vara graduada em centímetros, respectivamente.

Por fim, verificou-se a premissa de normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilks, e a premissa de homocedasticidade, pelo teste de Bartlett para todas as variáveis analisadas, ambos os testes ao nível de 5% de probabilidade. Atendendo as premissas, os dados foram submetidos a análises de variância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade, para avaliar a existência de diferença entre os tratamentos em cada variável monitorada. As análises foram realizadas no software R, versão 4.0.5, utilizando o pacote “easyanova” (ARNHOLD, 2021).

10 RESULTADOS

10.1 Caracterização biológica

O *topsoil* apresentou a concentração de 215 (74-624; $p = 0,05$) e 29 (11-76; $p = 0,05$) células de rizóbio g de solo⁻¹, quando utilizadas as leguminosas *M. pudica* e *P. vulgaris* como plantas-isca, respectivamente. Para a área de pastagem, a densidade de rizóbios que nodulam *M. pudica* foi de 23 (5,7-94; $p = 0,05$) e *P. vulgaris* foi de 9,17 (2,18-38; $p = 0,05$) células de rizóbio g de solo⁻¹.

O número total de esporos de FMA recuperados no *topsoil* florestal de Cachoeiras de Macacu foi de 46 em 50 cm³ de *topsoil*. Foram encontradas seis espécies de fungos micorrízicos arbusculares, distribuídas nas famílias Acaulosporaceae, Glomeraceae e Ambisporaceae.

Por outro lado, a área de pastagem apresentou 588 esporos em 50 cm³ de solo. Os esporos encontrados são pertencentes a cinco espécies de FMA, duas pertencentes à família Acaulosporaceae e as demais, à Glomeraceae. Dentre as espécies presentes nas amostras de ambas as localidades, houve predomínio de esporos de *G. macrocarpum* (Tabela 9).

Tabela 9. Espécies de fungos micorrízicos arbusculares encontradas em 50 cm³ de amostra do *topsoil* oriundo de floresta nativa e de área de pastagem degradada, ambas localizadas em Cachoeiras de Macacu-RJ.

Espécies de fungos micorrízicos arbusculares	<i>Topsoil</i> florestal	Pastagem
Família Acaulosporaceae		
<i>Acaulospora foveata</i> Trappe & Janos		x
<i>Acaulospora mellea</i> Spain & Schenck	x	x
<i>Acaulospora rehmii</i> Sieverding & Toro	x	
Família Ambisporaceae		
<i>Ambispora leptoticha</i> (N.C. Schenck & G. S. Sm.) C. Walker, Vestberg & A. Schüssler		x
Família Glomeraceae		
<i>Glomus glomerulatum</i> Sieverd.	x	x
<i>Glomus macrocarpum</i> Tul. & C. Tul., 1845	x	x
<i>Glomus microaggregatum</i> Koske, Gemma & PD Olexia	x	
<i>Glomus tortuosum</i> N. C. Schenck & G. S. Sm.	x	

A Figura 8 evidencia as fotografias dos esporos das diferentes espécies de FMA encontradas, capturadas nos aumentos de 100 e 400 vezes.

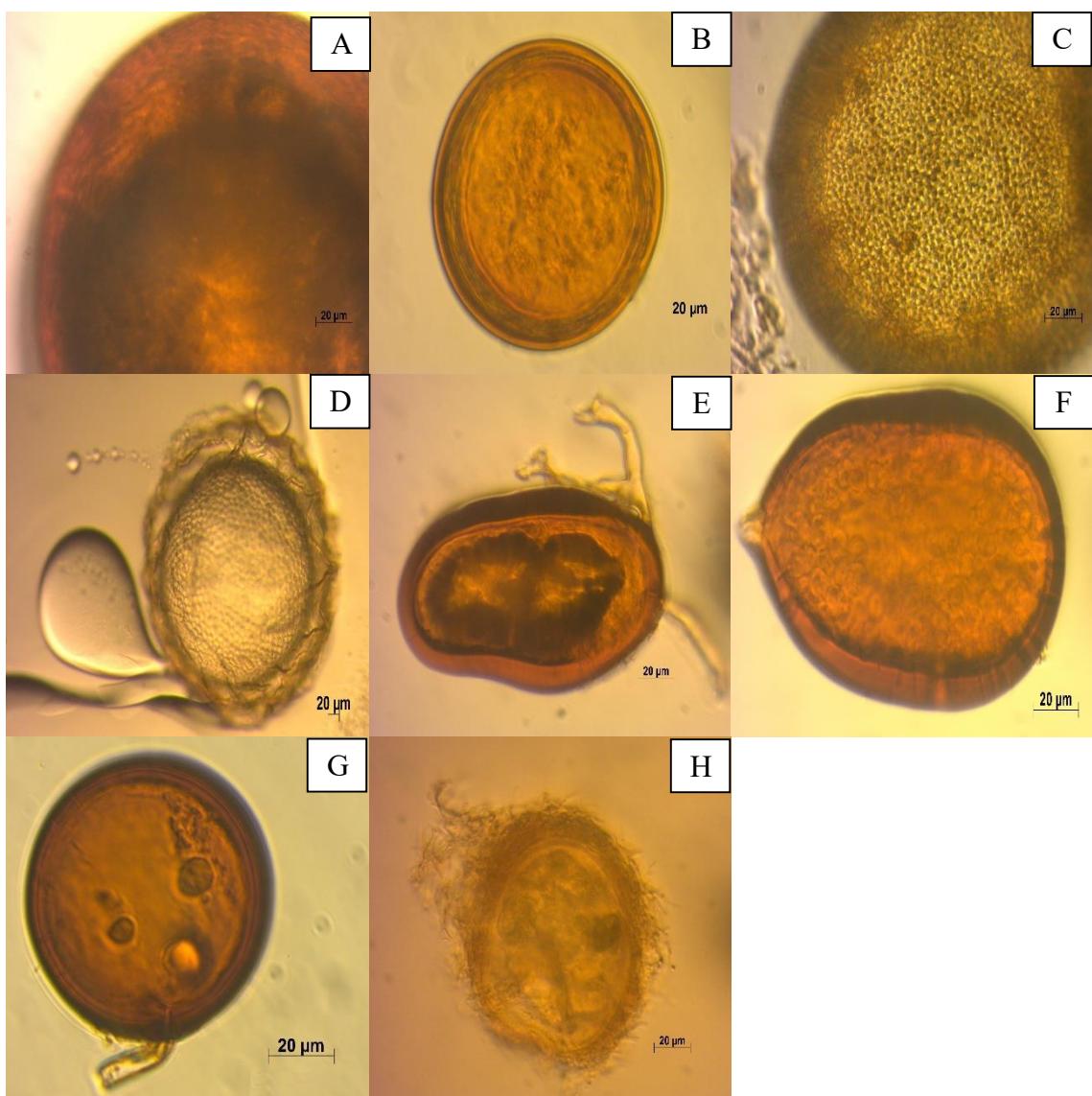


Figura 8. Esporo de *A. foveata* em aumento de 400 vezes (A); esporo de *A. mellea* em aumento de 400 vezes (B); esporo de *A. rehmii* em aumento de 400 vezes (C); esporo de *A. leptoticha* em aumento de 100 vezes (D - 80-160 µm); esporo de *G. glomerulatum* em aumento de 400 vezes (E); esporo de *G. macrocarpum* em aumento de 400 vezes (F); esporo de *G. macrocarpum*, contendo em seu interior esporo de *G. microaggregatum*, em aumento de 400 vezes (G); esporo de *G. tortuosum* em aumento de 400 vezes (H).

Antecedendo ao plantio, verificou-se que as mudas adquiridas de *A. peregrina*, *I. edulis* e *P. reticulata* já apresentavam nódulos, estando esses ativos, visto que apresentavam coloração interna vermelha, indicando a presença de leghemoglobina. Além disso, as onze espécies utilizadas também apresentavam colonização micorrízica, sendo visualizados vesículas, esporos e hifas no microscópio estereoscópico. A colonização observada nas raízes das mudas variou de baixa a alta (Tabela 10).

Tabela 10. Percentagem de colonização micorrízica e respectiva classe de colonização de mudas de 11 espécies arbóreas produzidas no viveiro da Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), em Cachoeiras de Macacu, RJ.

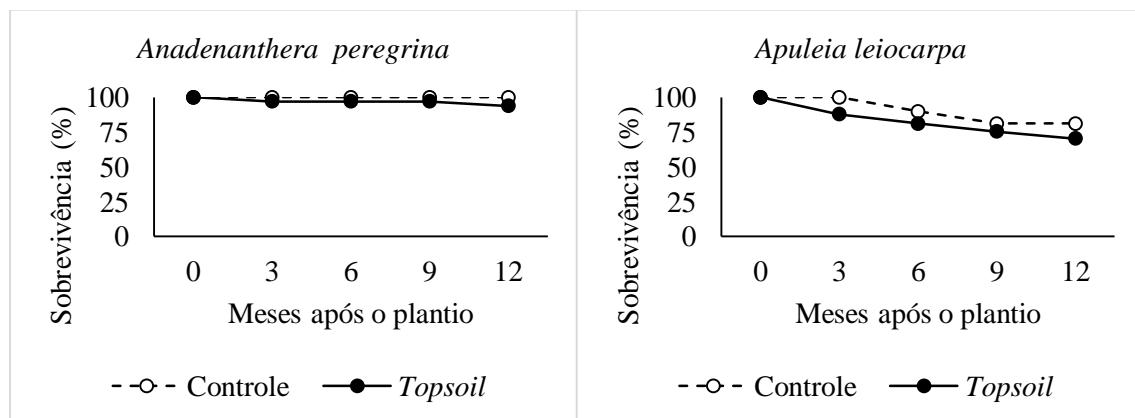
Nome científico	Colonização micorrízica (%)	Classe de colonização
<i>A. peregrina</i> (L.)	51,26	alta
<i>A. leiocarpa</i>	22,95	média
<i>C. glaziovii</i>	7,48	baixa
<i>C. myrianthum</i>	4,35	baixa
<i>D. nigra</i>	13,33	baixa
<i>G. americana</i>	28,27	média
<i>H. chrysotrichus</i>	19,56	baixa
<i>I. edulis</i>	2,4	baixa
<i>L. pisonis</i>	13,93	baixa
<i>P. reticulata</i>	20,27	média
<i>T. fuchsiiifolia</i>	33,10	média

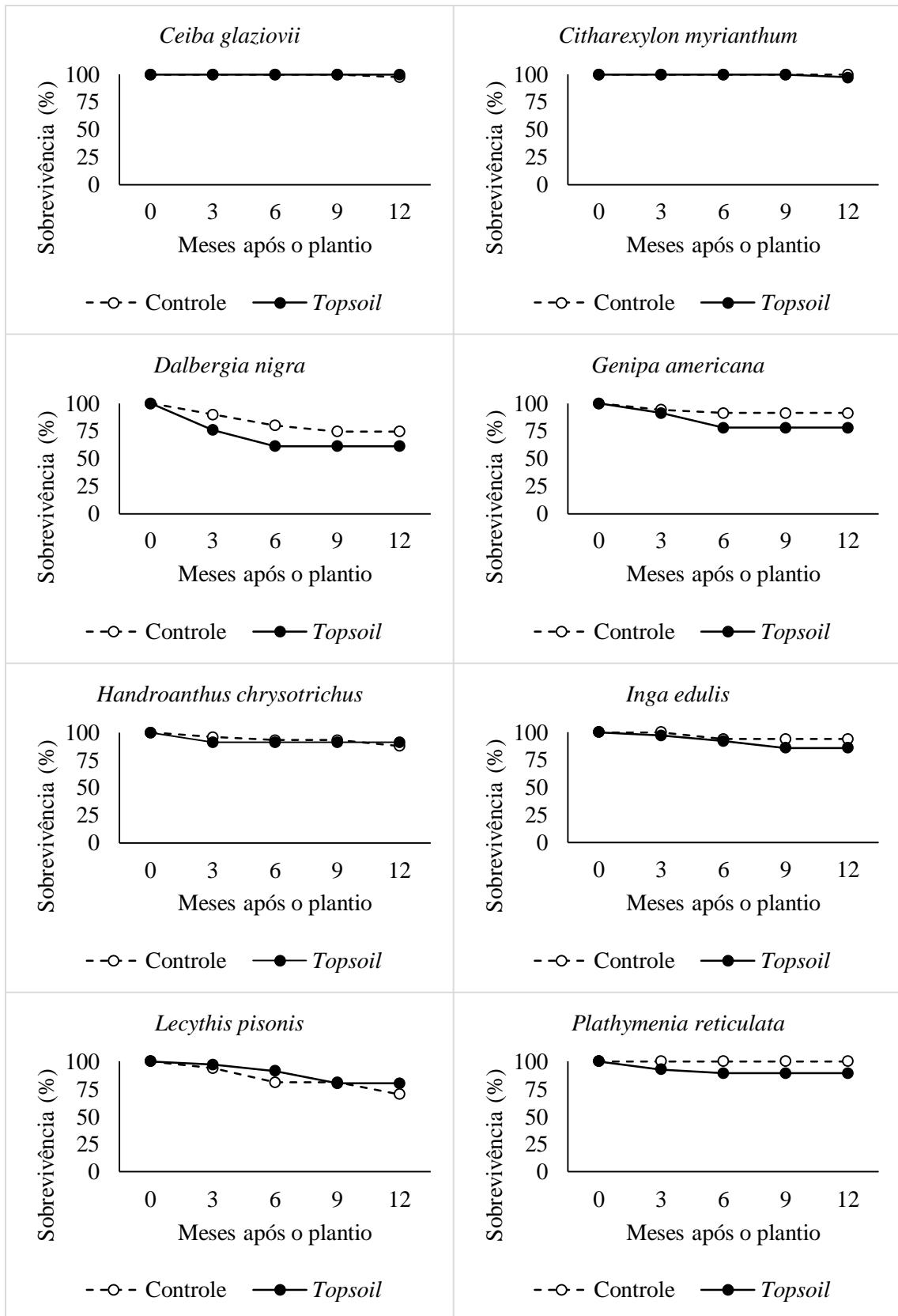
10.2 Sobrevida e crescimento das espécies arbóreas

As médias de sobrevida das onze espécies arbóreas plantadas em campo, quando analisadas separadamente e em conjunto, não diferiram significativamente em todos os períodos avaliados, em função da aplicação de *topsoil* nos berços de plantio (Figura 9).

Em geral, a média de sobrevida das plantas de cada espécie arbórea foi superior a 80%, em ambos os tratamentos, até aos 12 meses após o plantio. *D. nigra* foi a única espécie que apresentou médias de sobrevida inferiores a 80% em ambos os tratamentos, chegando a 61% em média ao final dos 12 meses de monitoramento.

Embora sem diferença significativa entre os tratamentos, as espécies *A. leiocarpa* e *G. americana* apresentaram sobrevida de 70% e 78% quando adicionado *topsoil* e de 81% e 91% no controle. Ao contrário, *L. pisonis* obteve taxa de sobrevida superior no tratamento com *topsoil* (80%) em relação ao controle (70%).





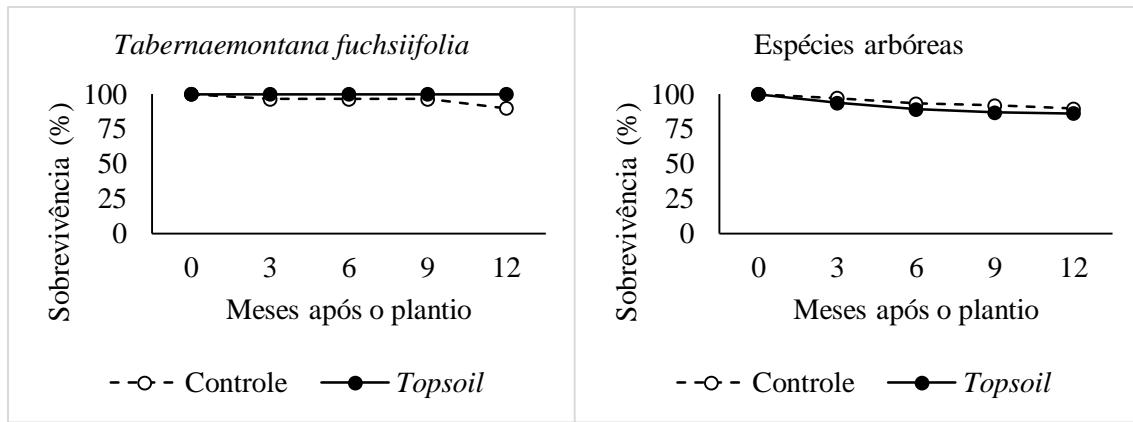
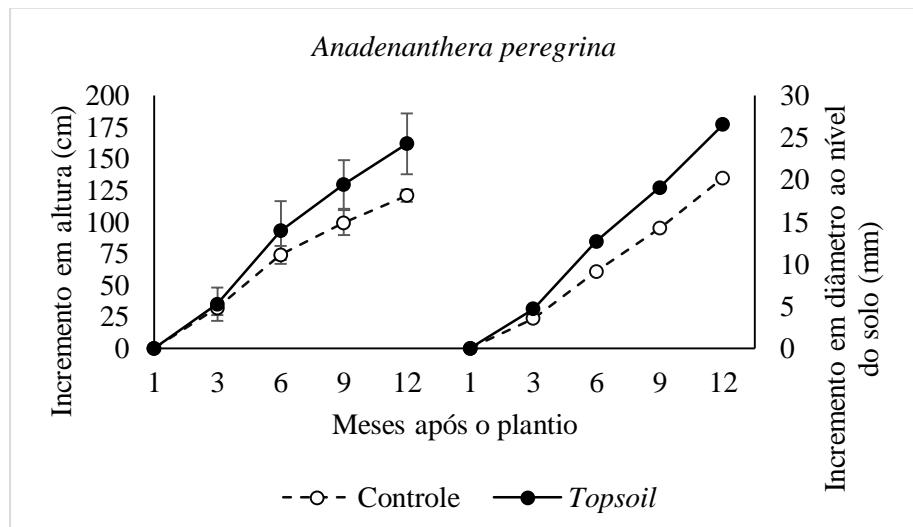


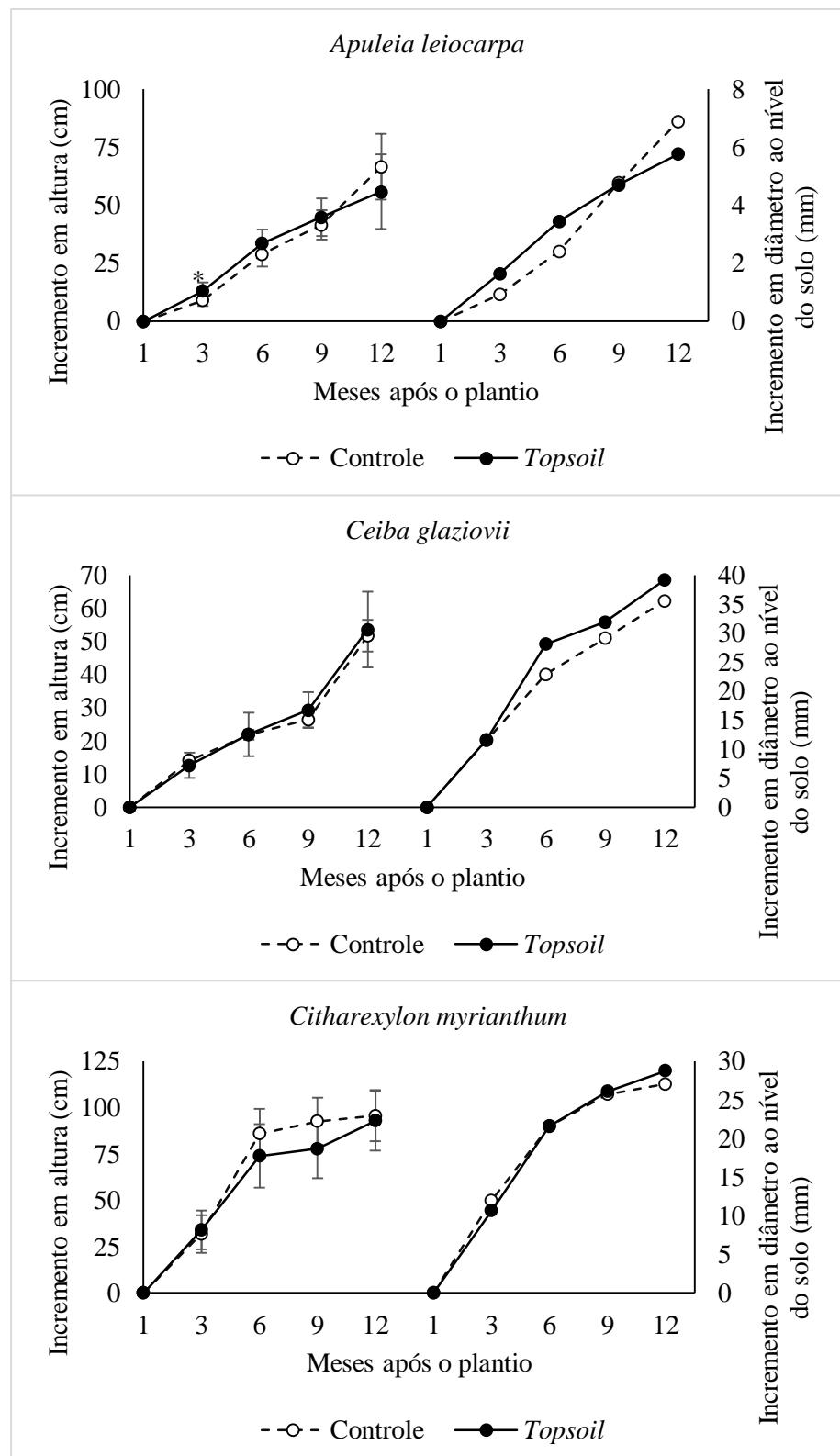
Figura 9. Percentual de sobrevivência das espécies *A. peregrina*, *A. leiocarpa*, *C. glaziovii*, *C. myrianthum*, *D. nigra*, *G. americana*, *H. chrysotrichus*, *I. edulis*, *L. pisonis*, *P. reticulata* e *T. fuchiifolia* aos 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o plantio em campo nos tratamentos com aplicação de *topsoil* florestal nos berços de plantio e no grupo controle (utilizando *topsoil* autoclavado).

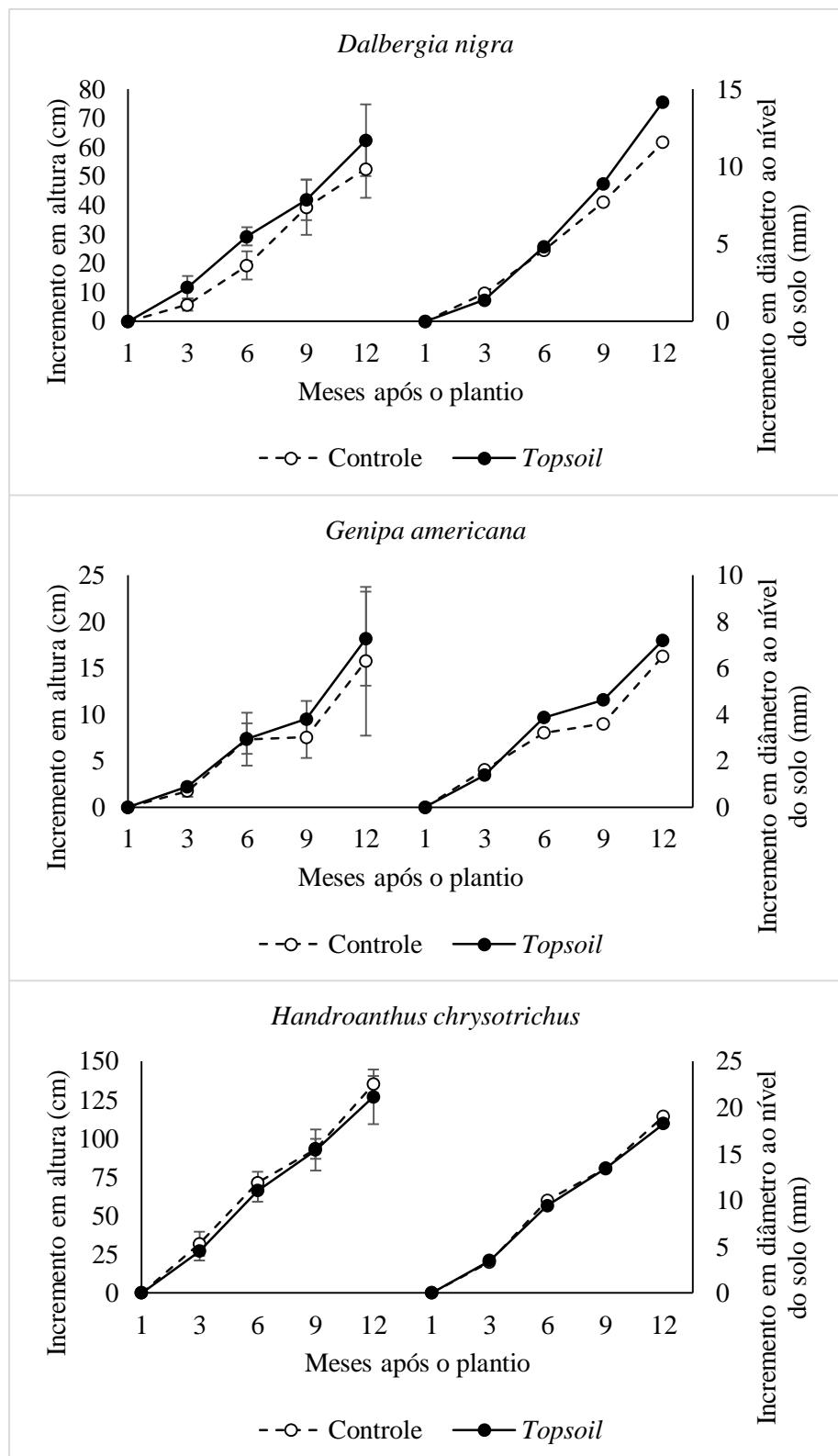
Dentre as espécies arbóreas empregadas, *G. americana*, *L. pisonis*, *D. nigra* e *A. leiocarpa* apresentaram os menores ganhos em altura e diâmetro ao nível do solo, observando-se maiores incrementos em *A. peregrina*, *H. chrysotrichus* e *P. reticulata* para altura e, em diâmetro do coletor, nas espécies *P. reticulata*, *C. glaziovii* e *C. myrianthum*.

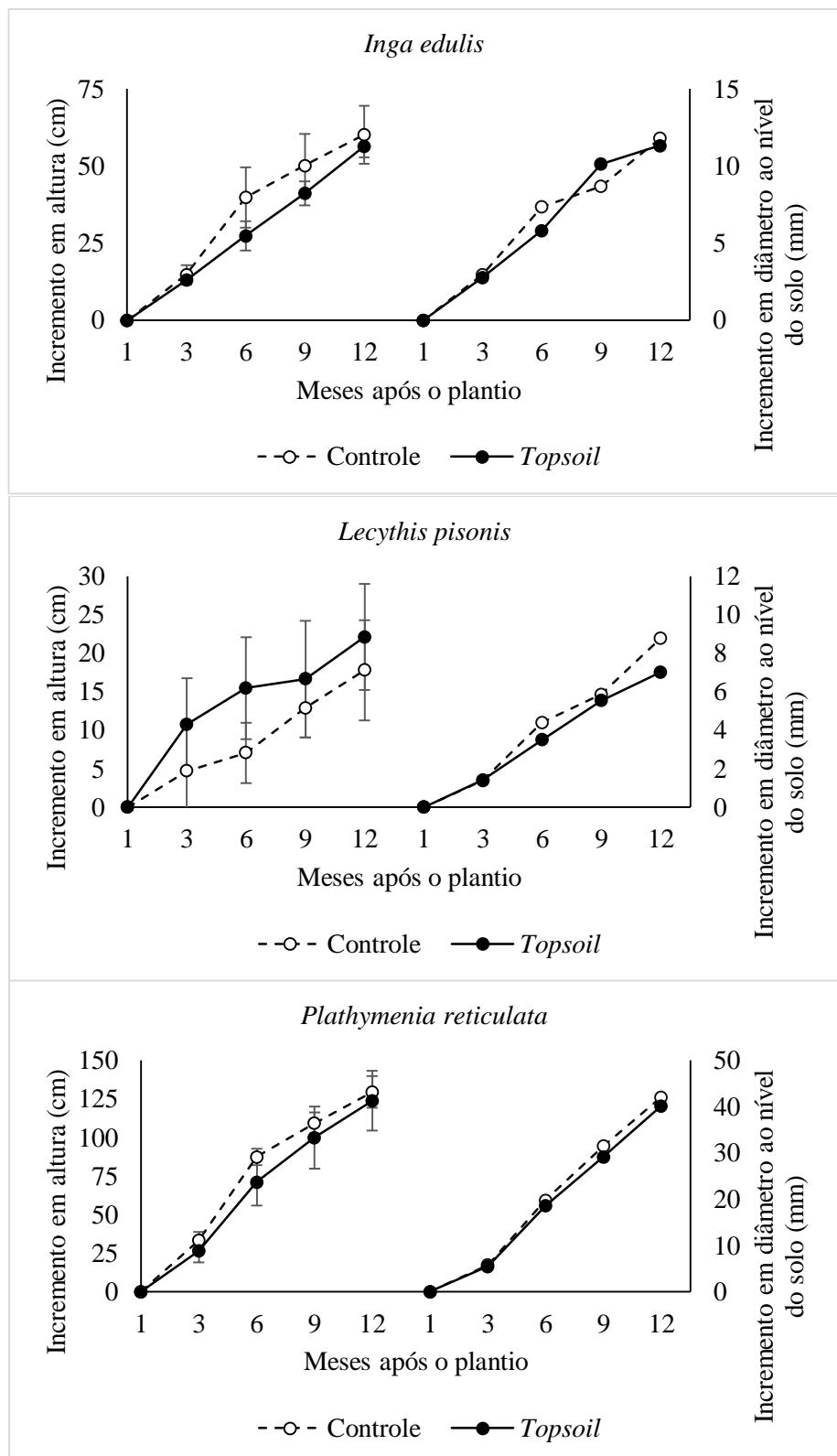
Em geral, o tratamento com adição de *topsoil* florestal *in natura* aos berços de plantio não alterou significativamente a altura das onze espécies arbóreas avaliadas em relação ao tratamento controle ($p>0,05$). A exceção ocorreu apenas no terceiro mês após o plantio de *A. leiocarpa*, quando as plantas se mostraram maiores no tratamento com *topsoil* florestal (Figura 10).

As medidas de diâmetro ao nível do solo das onze espécies arbóreas também não foram afetadas pelos tratamentos ao longo do período avaliado.









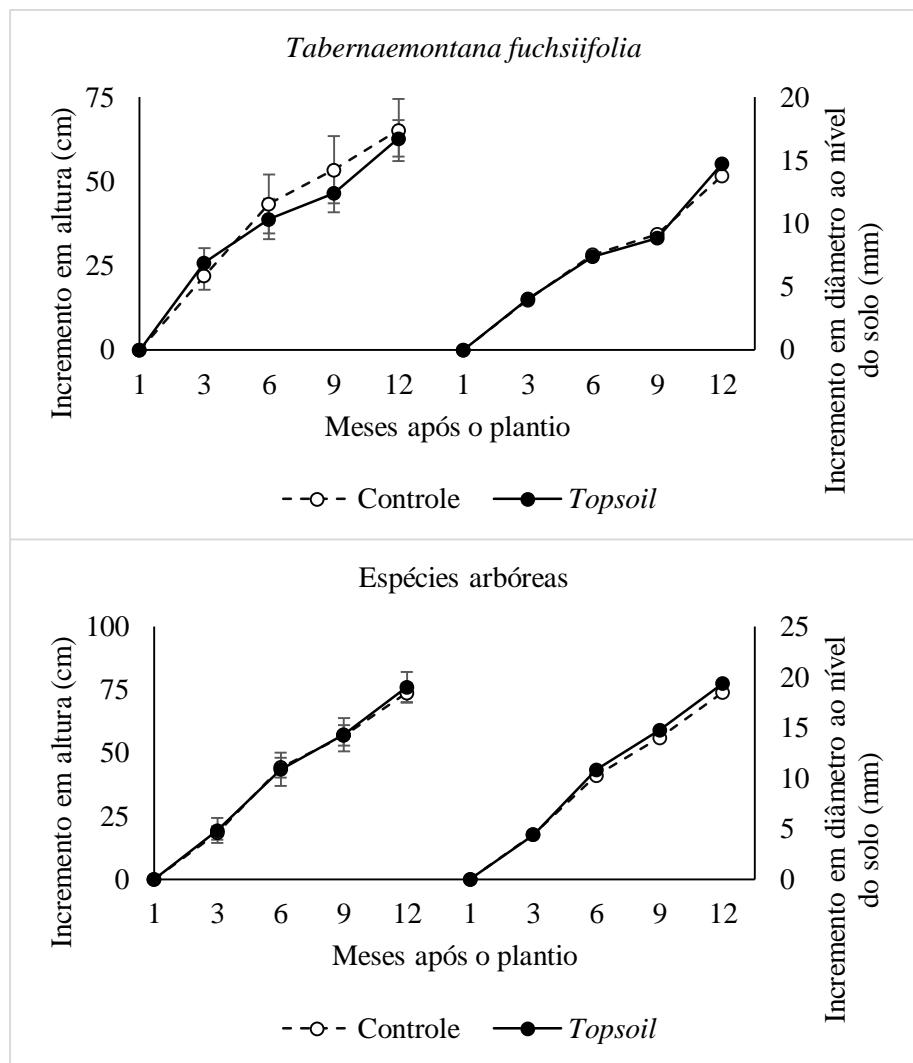


Figura 10. Incremento cumulativo em altura e diâmetro ao nível do solo de *A. peregrina*, *A. leiocarpa*, *C. glaziovii*, *C. myrianthum*, *D. nigra*, *G. americana*, *H. chrysotrichus*, *I. edulis*, *L. pisonis*, *P. reticulata* e *T. fuchsiiifolia* aos 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o plantio em campo nos tratamentos com aplicação de *topsoil* florestal nos berços de plantio e no grupo controle (utilizando *topsoil* autoclavado).

11 DISCUSSÃO

A aplicação de 200 g de *topsoil* ao berço de plantio não afetou a sobrevivência das 11 espécies arbóreas estudadas. Cabe ressaltar que as elevadas taxas de sobrevivência da maioria das espécies arbóreas podem ser atribuídas aos tratos culturais intensivos (capinas, controle de formigas etc.) e à boa pluviosidade no decorrer do período de avaliação. Todavia, *A. leiocarpa* e *G. americana* (com *topsoil*), *L. pisonis* (controle) e *D. nigra* (ambos os tratamentos) apresentaram taxas de sobrevivência inferiores a 80%, possivelmente em razão das mudas dessas espécies estarem ainda pequenas no momento de expedição ao campo, apresentando altura entre 16 e 26 cm. Como referência, recomenda-se em geral para plantios de recomposição florestal o plantio de mudas com altura entre 30 e 50 cm (Martins, 2018).

Igualmente, o *topsoil* não influenciou no crescimento em altura e diâmetro ao nível do solo das espécies arbóreas ao longo do período de avaliação. Esses resultados são contrastantes àqueles encontrados em um estudo realizado por Hüller *et al.* (2017), onde foi apontado que a aplicação de *topsoil* florestal na superfície do solo aumentou significativamente a sobrevivência e o crescimento de indivíduos de *Schinus terebinthifolius* Raddi introduzidos por semeadura direta em uma área de cultivo abandonada. Quando o *topsoil* foi adicionado, a sobrevivência e o crescimento foram 3 e 4 vezes maiores, respectivamente, aos 12 meses após a semeadura, em relação ao tratamento onde apenas a semeadura foi realizada.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar a ausência de resposta ao *topsoil* observado nesse estudo. Por exemplo, a concentração de microrganismos simbiontes no *topsoil* e/ou o volume aplicado ao berço de plantio podem ter sido insuficientes para promover simbioses efetivas. De fato, a concentração de microrganismos simbiontes (BFN e FMA) no *topsoil* foi relativamente baixa. Embora as análises tenham identificado a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio e esporos de fungos micorrízicos arbusculares no *topsoil*, as concentrações desses microrganismos foram inferiores àquelas encontradas em outro *topsoil* avaliado no estudo descrito no Capítulo I desta tese (93 [23-388; $p = 0,05$] células de rizóbio g de solo⁻¹, quando utilizada a leguminosa *M. pudica* como planta-isca, e 400 esporos de FMA em 50 cm³ de *topsoil*). Corroborando esse fato, observou-se que a densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio no solo da pastagem não diferiu daquela encontrada no *topsoil*.

Em outro estudo, realizado por Sene *et al.* (2012), também se observou que a abundância de rizóbios em solos de áreas reflorestadas foi similar à de solos de áreas degradadas no Senegal. Brito *et al.* (2015) também encontraram baixa densidade de BFN em uma área de pastagem abandonada inserida na Mata Atlântica em Valença-RJ, alcançando 10² células g de solo⁻¹ quando utilizado *P. vulgaris* como planta-isca.

Tanto a densidade e a riqueza de microrganismos podem ser altamente variáveis entre os locais de coleta e ao que é adicionado ao berço de plantio, não havendo padronização no que é fornecido às plantas, diferentemente de inoculantes destinados a projetos de reflorestamento. Como referência, a Instrução Normativa nº 13 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece a concentração mínima de 1,0 x 10⁹ unidades formadoras de colônias por grama ou mililitro para inoculantes de BFN.

Em relação aos fungos micorrízicos arbusculares, foi observada uma menor densidade de esporos no *topsoil* florestal em relação ao solo da pastagem. Diversos trabalhos também verificaram menor densidade de esporos de FMA em florestas na Mata Atlântica, quando comparadas a outros sistemas de uso do solo, tais como os desenvolvidos por Stürmer *et al.* (2006); Zangaro *et al.* (2008); Bonfim *et al.* (2013); Silva *et al.* (2016); Martins *et al.* (2019); Silva *et al.* (2021).

Em área de Floresta Atlântica, Santos (2006) detectou o número de esporos de FMA variando de 3 a 560 por 100 g de solo, sendo essa variação atribuída aos diferentes grupos

sucessionais da vegetação e aos graus de distúrbio do local, com maior produção de esporos em áreas com clareiras e espécies pioneiras.

A alta concentração de esporos de FMA em áreas de pastagens pode estar relacionada às características das plantas dominantes e de condições de estresse que estimulam a esporulação. As gramíneas com metabolismo C4, possuem alta eficiência fotossintética e sistema radicular fasciculado, com raízes finas e abundantes, o que favorece a colonização radicular e a esporulação (CARDOSO JÚNIOR *et al.*, 2018). Além disso, a alta densidade de esporos de FMA está relacionada à maior atuação dos FMA em solos em recuperação, que ainda respondem a processos de perturbação (PIOTROWSKI *et al.*, 2008). A produção de esporos diminui progressivamente ao longo da sucessão ecológica da pastagem para floresta madura (ZANGARO *et al.*, 2012). Contudo, deve-se considerar que os esporos não são a única forma de propagação dos FMA, mas também hifas, raízes e substratos infectados (MIRANDA, 2008).

O teor de fósforo presente no *topsoil* florestal foi consideravelmente maior (18,2 mg/dm³) do que o da pastagem (2,8 mg/dm³). A alta disponibilidade de P no solo pode afetar a concentração de carboidratos solúveis, interferindo na redução e até eliminação da colonização das raízes por fungos micorrízicos (PETERSON; FARQUHAR, 1996) e consequentemente na sua reprodução e quantidade de esporos presentes no solo (SANTOS; SCORIZA; FERREIRA, 2014). Dessa forma, a estabilidade do ecossistema e o teor de fósforo presente no solo florestal podem ter contribuído para a menor formação de esporos de FMA.

Em ambas as áreas de estudo, houve predomínio dos gêneros *Glomus* e *Acaulospora*. Esses gêneros têm sido detectados como dominantes em várias áreas estudadas do bioma Mata Atlântica, em habitats naturais e em solos em recuperação, ocorrendo com maior densidade de esporos e número de espécies em relação aos demais gêneros (ZANGARO; MOREIRA, 2010). A maior ocorrência dos gêneros *Glomus* e *Acaulospora* pode ser devido à maior capacidade de adaptação a solos submetidos a variações nos teores de matéria orgânica, pH e manejo, denotando que essas espécies são resistentes a distúrbios ambientais (WINAGRASKI *et al.*, 2019; MAIA *et al.*, 2020).

Outra hipótese para explicar a ausência de resposta das plantas ao *topsoil* pode estar relacionada ao fato de as mudas expedidas ao campo já apresentarem alta colonização micorrízica e, as leguminosas que se associam com BFN (*A. peregrina*, *I. edulis* e *P. reticulata*), nódulos ativos em suas raízes. Essas associações já constituídas podem ter reduzido a capacidade dos microrganismos presentes no *topsoil* em estabelecer simbiose com as plantas além de possivelmente terem contribuído para o crescimento das plantas de ambos os tratamentos.

Se o nicho metabólico é preenchido por microrganismos residentes, melhor adaptados às condições ambientais, o sucesso no estabelecimento dos microrganismos introduzidos diminui (KAMINSKY *et al.*, 2018; MOHANRAM; KUMAR, 2019), o que pode ter ocorrido no presente estudo. Dado que as comunidades residentes são estáveis, os microrganismos introduzidos provavelmente ocupariam apenas um nicho muito pequeno em toda a comunidade, ou mesmo seriam eliminados após a introdução (SHTARK *et al.*, 2015).

Os rizóbios competem no solo e na rizosfera com outros membros da comunidade microbiana (rizóbios e não rizóbios) para estabelecer populações estáveis, para posteriormente ocuparem os nódulos (LI *et al.* 2016; CHECCUCHI *et al.*, 2017). A competição implica em evitar a colonização do nicho por outras cepas, podendo ser realizada através da utilização rápida e eficiente de recursos limitantes ou quando uma célula impede diretamente outra célula de crescer/sobreviver no ambiente (HASSANI; DURÁN; HACQUARD, 2018).

A competição por espaço e recursos pela microbiota do solo foi demonstrada no estudo de Wubs *et al.* (2016). Em área de pousio, a adição de *topsoil*, oriundo de área similar e conservada, aplicado em área total, proporcionou aumento na composição microbiana do solo.

Uma riqueza de microrganismos mais pronunciada foi obtida quando o *topsoil* da área receptora foi removido, e em menor intensidade quando o *topsoil* foi depositado no solo intacto.

Ainda assim, os rizóbios que foram adicionados ao solo através da aplicação do *topsoil* florestal e que, porventura, tenham ocupado algum nicho vago ou tido sucesso na competição com outros microrganismos, não necessariamente apresentaram compatibilidade com a leguminosa hospedeira e foram eficazes em fornecer nitrogênio à planta, de modo a contribuir significativamente no crescimento das plantas que se associam de modo simbiótico a esses.

De mesmo modo, os FMA que foram adicionados com o *topsoil* podem não ter conseguido se estabelecer, colonizar, persistir e se espalhar. Hart *et al.* (2017) destacam alguns fatores que podem vir a interferir nesse processo, como a sobreposição de nicho com fungos residentes altamente competitivos e tolerantes aos fatores bióticos e abióticos do local, a densidade de FMA insuficiente na dosagem do inóculo, os efeitos prioritários decorrentes da ordem de chegada e os requisitos de nicho, como a adaptação ao solo e aos demais microrganismos, bem como a identidade do hospedeiro.

Fatores como pH, temperatura, umidade, fertilidade e salinidade (SANTOYO *et al.*, 2017) em áreas anteriormente florestais convertidas à agricultura e a pastagens diferem das condições edafoclimáticas presentes originalmente. Em suma, essas variações podem afetar a sobrevivência e o estabelecimento de microrganismos nativos introduzidos no berço de plantio. Microrganismos presentes nessas áreas antropizadas estão adaptados a essas condições, apresentando uma vantagem competitiva para adquirir espaço e recursos quando há sobreposição de nicho.

Por fim, é valido destacar que os efeitos da microbiota rizosférica introduzida ao solo da pastagem sobre a performance das plantas não necessariamente serão sempre benéficos, como relatado por Lobo *et al.* (2019), mas poderão ser antagônicos ou neutros, o que ocorreu no presente estudo.

Em vista da baixa densidade de BFN e FMA existente no *topsoil* florestal e da competição com microrganismos simbiontes presentes previamente nas mudas e no solo da área degradada, recomenda-se que estudos investigando outras espécies arbóreas, diferentes classes de solo e locais de coleta de *topsoil* com distintos estágios de sucessão ecológica sejam implementados para verificar a potencialidade da técnica de transposição de *topsoil* em maior abrangência. Esses conhecimentos poderão auxiliar na tomada de decisões voltadas à funcionalidade do ecossistema, permitindo maiores chances de sucesso em projetos destinados à restauração florestal.

12 CONCLUSÕES

A aplicação de 200 g de *topsoil* florestal no berço de plantio de 11 espécies arbóreas da Mata Atlântica, destinadas ao reflorestamento de uma pastagem degradada em Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, não produziu melhorias significativas na taxa de crescimento ou sobrevivência das plantas até os primeiros 12 meses após o plantio. Esse resultado pode estar relacionado (1) à baixa concentração de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e de células de rizóbios no *topsoil* utilizado e (2) à presença de micorrizas e nódulos (no caso de espécies leguminosas nodulíferas) nas mudas utilizadas no plantio.

13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ALLA, M. H.; EL-ENANY, A. W. E.; NAFADY, N. A.; KHALAF, D. M.; MORSY, F. M. Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for Faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 49-58, 2014. DOI: 10.1016/j.micres.2013.07.007.
- AERON, A.; KHARE, E.; JHA, C. K.; MEENA, V. S.; AZIZ, S. M. A.; ISLAM, M. T.; KIM, K.; MEENA, S. K.; PATTANAYAK, A.; RAJASHEKARA, H.; DUBEY, R. C.; MAURYA, B. R.; MAHESHWARI, D. K.; SARAF, M.; CHOUDHARY, M.; VERMA, R.; MEENA, H. N.; SUBBANNA, A. R. N. S.; PARIHAR, M.; SHUKLA, S.; MUTHUSAMY, G.; BANA, R. S.; BAJPAI, V. K.; HAN, Y. K.; RAHMAN, M.; KUMAR, D.; SINGH, N. R.; MEENA, R. K. Revisiting the plant growth-promoting rhizobacteria: lessons from the past and objectives for the future. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 665–676, 2020. DOI: 10.1007/s00203-019-01779-w.
- AFKHAMI, M. E.; ALMEIDA, B. K.; HERNANDEZ, D. J.; KIESEWETTER, K. N.; REVILLINI, D. P. Tripartite mutualisms as models for understanding plant–microbial interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 56, p. 28-36, 2020. DOI: 10.1016/j.pbi.2020.02.003.
- ALFAIA, S. S.; UGUEN, K. Fertilidade e manejo do solo. In: MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STURMER, S. L. O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. Lavras: Editora UFLA, 2013. p. 75-90.
- ALLEN, M. F. Linking water and nutrients through the vadose zone: a fungal interface between the soil and plant systems. **Journal of Arid Land**, v. 3, n. 3, p. 155-163, 2011. DOI: 10.3724/SP.J.1227.2011.00155.
- ALMEIDA, D. R. A.; STARK, S. C.; VALBUENA, R.; BROADBENT, E. N.; SILVA, T. S. F.; RESENDE, A. F.; FERREIRA, M. P.; CARDIL, A.; SILVA, C. A.; AMAZONAS, N.; ZAMBRANO, A. M. A.; BRANCALION, P. H. S. A new era in forest restoration monitoring. **Restoration Ecology**, v. 28, n. 8, p. 8-11, 2020. DOI: 10.1111/rec.13067.
- AMARAL, L. A.; PEREIRA, I. M.; SILVA, M. A. P; OLIVEIRA, M. L. R.; MACHADO, E. L. M.; LAIA, M. L. Uso de solo superficial para restauração de área de pastagem degradada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 11, p. 1080-1090, 2017. DOI: 10.1590/s0100-204x2017001100014.
- AMUNDSON R.; BERHE A. A.; HOPMANS J. W.; OLSON C.; SZTEIN A. E.; SPARKS. D. L. Soil and human security in the 21st century. **Science**, v. 348, n. 6235, 2015. DOI: 10.1126/science.1261071.
- ANDREOTE, F. D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 6, p. 528-539, 2014. DOI: 10.1590/0103-9016-2014-0195.
- ANGELINI, G. A. R.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Seleção de fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos para simbioses eficientes com *Acacia mangium* Willd. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 1, n. 34, p. 3529-3541, 2013. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl1p3529.

AREMU, B. R.; ALORI, E. T.; KUTU, R. F.; BABALOLA, O. O. Potentials of microbial inoculants in soil productivity: An outlook on African legumes. In: PANPATTE, D.; JHALA, Y.; VYAS, R.; SHELAT, H. (Eds.). **Microorganisms for Green Revolution**. Singapore: Springer, 2017. p. 53-75. DOI: 10.1007/978-981-10-6241-4_3.

ARNHOLD, E. Package ‘easyanova’. 2021. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/easyanova/easyanova.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2022.

AUGÉ, R. M.; TOLER, H. D.; SAXTON, A. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. **Mycorrhiza**, v. 25, p.13–24, 2015.

AVERRILL, C.; ANTHONY, M. A.; BALDRIAN, P.; FINKBEINER, F.; VAN DEN HOOGEN, J.; KIERS, T.; KOHOUT, P.; HIRT, E.; SMITH, G. R.; CROWTHER, T. W. Defending Earth’s terrestrial microbiome. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1717-1725, 2022. DOI: 10.1038/s41564-022-01228-3.

AZEVEDO A. D.; FRANCELINO, M. R., CAMARA, R.; PEREIRA, M. G.; LELES, P. S. S. Estoque de carbono em áreas de restauração florestal da Mata Atlântica. **Floresta**, v. 48, n. 2, p. 183-194, 2018. DOI: 10.5380/rf.v48i2.54447.

BALDRIAN, P.; KOLAŘÍK, M.; ŠTURSOVÁ, M.; KOPECKÝ, J.; VALÁŠKOVÁ, V.; VĚTROVSKÝ, T.; ŽIFČÁKOVÁ, L.; ŠNAJDR, J.; RÍDL, J.; VLČEK, Č.; VOŘÍŠKOVÁ, J. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. **The ISME Journal**, v. 6, p. 248–258, 2012. DOI: 10.1038/ismej.2011.95.

BARROS, J. A.; MEDEIROS, E. V.; COSTA, D. P.; DUDA, G. P.; LIMA, J. R. S.; SANTOS, U. J.; ANTONINO, A. C. D.; HAMMECKER, C. Human disturbance affects enzyme activity, microbial biomass and organic carbon in tropical dry sub-humid pasture and forest soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 66, p. 458-472, 2019. DOI: 10.1080/03650340.2019.1622095.

BARTLETT, R. J.; ROSS, S. D. Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions. **Soil Science Society of America Journal**, v. 52, p. 1191–1192, 1988.

BENTO, R. A.; VIEIRA, G.; PANHOCA, L.; CARNEIRO, L. M.; GUERRA, C. M. S. Activity based costing of the nucleation techniques implemented in forest clearings due to oil exploration in the Central Amazon. **BASE – Revista de Administração e Contabilidade da Unisinos**, v. 10, n. 2, p. 117-129, 2013. DOI: 10.4013/base.2013.102.02.

BERDUGO, S. E. B. **Redes ecológicas em comunidades bacterianas da filosfera, dermosfera e rizosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. 2016. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. DOI: 10.11606/T.11.2016.tde-09112016-155442.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478–486, 2012. DOI: 10.1016/j.tplants.2012.04.001.

BERKELMANN, D.; SCHNEIDER, D.; MERYANDINI, A.; DANIEL, R. Unravelling the effects of tropical land use conversion on the soil microbiome. **Environmental Microbiome**, v. 15, n. 5, 2020. DOI: 10.1186/s40793-020-0353-3.

BERRUTI, A.; LUMINI, E.; BALESTRINI, R.; BIANCIOTTO, V. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1559, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01559.

BIZUTI, D. T. G.; SOARES, T. M.; DUARTE, M. M.; CASAGRANDE, J. C.; MORENO, V. S.; PEINADO, F. J. M.; MEDEIROS, S. D. S.; MELIS, J.; SCHWEIZER, D.; BRANCALION, P. H. S. Recovery of soil phosphorus on former bauxite mines through tropical forest restoration. **Restoration Ecology**, v. 28, n. 5, p. 1237-1246, 2020.

BONFIM, J. A.; VASCONCELLOS, R. L. F.; STÜRMER, S. L.; CARDOSO, E. J. B. N. Arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian Atlantic forest: A gradient of environmental restoration. **Applied Soil Ecology**, v. 71, p. 7-14, 2013. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.04.005.

BORGES, W. L.; PRIN, Y.; DUCOUSSO, M.; LE ROUX, C.; FARIA, S. M. Rhizobial characterization in revegetated areas after bauxite mining. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 314-321, 2016. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.01.009.

BOURNAUD, C.; JAMES, E. K.; FARIA, S. M.; LEBRUN, M.; MELKONIAN, R.; DUPONNOIS, R.; TISSEYRE, P.; MOULIN, L.; PRIN, Y. Interdependency of efficient nodulation and arbuscular mycorrhization in *Piptadenia gonoacantha*, a Brazilian legume tree. **Plant, Cell & Environment**, v. 41, n. 9, 2018. 2018. DOI: 10.1111/pce.13095.

BRANCALION, P. H. S.; RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S.; KAGEYAMA, P. Y.; NAVÉ, A. G.; GANDARA, F. B.; BARBOSA, L. M.; TABARELLI, M. Instrumentos legais podem contribuir para a restauração de florestas tropicais biodiversas. **Revista Árvore**, v. 34, n. 3, p. 455-470, 2010. DOI: 10.1590/S0100-67622010000300010.

BRANCALION, P. H. S.; MELO, F. P.; TABARELLI, M.; RODRIGUES, R. R. Biodiversity persistence in highly human-modified tropical landscapes depends on ecological restoration. **Tropical Conservation Science**, v. 6, n. 6, p. 705-710, 2013. DOI: 10.1177/19400829130060601.

BRANCALION, P. H. S.; PINTO, S. R.; PUGLIESE, L.; PADOVEZI, A.; RODRIGUES, R. R.; CALMON, M.; CARRASCOSA, H.; CASTRO, P.; MESQUITA, B. Governance innovations from a multi-stakeholder coalition to implement large-scale Forest Restoration in Brazil. **World Development Perspectives**, v. 3, p. 15-17, 2016. DOI: 10.1016/j.wdp.2016.11.003.

BRANCALION, P. H. S.; NIAMIR, A.; BROADBENT, E.; CROUZEILLES, R.; BARROS, F. S. M.; ALMEYDA ZAMBRANO, A. M.; BACCINI, A.; ARONSON, J.; GOETZ, S.; REID, J. L.; STRASSBURG, B. B. N.; WILSON, S.; CHAZDON, R. L. Global restoration opportunities in tropical rainforest landscapes. **Science Advances**, v. 5, n. 7, 2019a. DOI: 10.1126/sciadv.aav3223.

BRANCALION, P. H. S.; MELI, P.; TYMUS, J. R. C.; LENTI, F. E. B.; BENINI, R. M.; SILVA, A. P. M.; ISERNHAGEN, I.; HOLL, K. D. What makes ecosystem restoration expensive? A systematic cost assessment of projects in Brazil. **Biological Conservation**, v. 240, p. 108274, 2019b. DOI: 10.1016/j.biocon.2019.108274.

BRASIL. **Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000.** Regulamenta o art. 225, § 1o, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza. Brasília, DF, 2000. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9985.htm>. Acesso em: 02 jul. 2019.

_____. **Lei nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006.** Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Lei/L11428.htm>. Acesso em: 02 jul. 2019.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011.** Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura... Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 25 mar. 2011. Seção 1, p. 3.

_____. **Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012.** Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis nºs 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória nº 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12651.htm>. Acesso em: 02 jul. 2019.

_____. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, AGROPECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regras para análises de sementes.** Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

_____. INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Instrução Normativa ICMBIO nº 11, de 11 de dezembro de 2014.** Estabelecer procedimentos para elaboração, análise, aprovação e acompanhamento da execução de Projeto de Recuperação de Área Degrada ou Perturbada - PRAD, para fins de cumprimento da legislação ambiental. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Instrucao_normativa/2014/in_icmbio_11_2014_estabelece_procedimentos_prad.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2023.

BRINKMANN, N.; SCHNEIDER, D.; SAHNER, J.; BALLAUFF, J.; EDY, N.; BARUS, H.; IRAWAN, B.; BUDI, S. W.; QAIUM, M.; DANIEL, R.; POLLE, A. Intensive tropical land use massively shifts soil fungal communities. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-39829-4.

BRITO, L. F. D.; PACHECO, R. S.; SOUZA FILHO, B. F. D.; FERREIRA, E. P. D. B.; STRALIOTTO, R.; ARAÚJO, A. P. Resposta do feijoeiro comum à inoculação com rizóbio e suplementação com nitrogênio mineral em dois biomas brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 981-992, 2015. DOI: 10.1590/01000683rbcs20140322.

BONFANTE, P.; VENICE, F. Mucoromycota: going to the roots of plant-interacting fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 100-113, 2020. DOI: 10.1016/j.fbr.2019.12.003.

BRUNDRETT, M.; TEDERSOO, L. Misdiagnosis of mycorrhizas and inappropriate recycling of data can lead to false conclusions. **New Phytologist**, v. 221, n. 1, p. 18-24, 2019. DOI: 10.1111/nph.15440.

BRUTO, M.; PRIGENT-COMBARET, C.; MULLER, D.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and related Proteobacteria. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6261, 2014. DOI: 10.1038/srep06261.

BUISSON, E.; JAUNATRE, R.; RÖMERMAN, C.; BULOT, A.; DUTOIT, T. Species transfer via topsoil translocation: lessons from two large Mediterranean restoration projects. **Restoration Ecology**, v. 26, n. S2, p. S179-S188, 2018. DOI: 10.1111/rec.12682.

BULOT, A.; POTARD, K.; BUREAU, F.; BÉRARD, A.; DUTOIT, T. Ecological restoration by soil transfer: impacts on restored soil profiles and topsoil functions. **Restoration Ecology**, v. 25, n. 3, p. 354-366, 2016. DOI: 10.1111/rec.12424.

CABREIRA, G. V.; LELES, P. S. S.; ARAÚJO, E. J. G.; SILVA, E. V.; LISBOA, A. C.; LOPES, L. N. Produção de mudas de *Schinus terebinthifolius* utilizando biossólido como substrato em diferentes recipientes e fertilizantes. **Scientia Agraria**, v. 18, n. 2, p. 30-42, 2017.

CARDOSO JÚNIOR, F. M.; CARNEIRO, R. F. V.; GOTO, B. T.; ARAÚJO, A. S. F. Arbuscular mycorrhizal communities in different tropical pastures of the Brazilian northeast. **Revista Agrária Acadêmica**, v. 1, n. 4, p. 17-28, 2018.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; CARVALHO, D.; BOTELHO, S. A.; SAGGIN JÚNIOR, O. J. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no Sudoeste do Brasil. **Revista Cerne**, v. 4, n. 1, p. 129-145, 1998.

CARVALHAL, F.; RODRIGUES, S. S.; BERCHEZ, F. A. S. **Mata Atlântica**. 2015. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/ecosteiros/textos_educ/mata/index.htm>. Acesso em: 10 dez 2019.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.

CARVALHO, T. S.; JESUS, E. C.; BARLOW, J.; GARDNER, T. A.; SOARES, I. C.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. D. S. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. **Ecology**, v. 97, n. 10, p. 2760-2771, 2016. DOI: 10.1111/j.1939-9170.2016.01513.x.

CASSETARI, A. S.; SILVA, M. C. P.; CARDOSO, E. J. B. N. Fixação biológica de nitrogênio simbótica. In: CARDOSO, E. J. B. N; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 111-131.

CASTRO, D. S.; AMARO, H. T. R.; ARAUJO, E. F.; BORGES, E. E. L.; MARTINS FILHO, S. Superação de dormência em sementes de garapa (*Apuleia leiocarpa* (VOGEL)) JF MACBR: **Colloquium Agrariae**, v. 15, n. 4, p. 51-59, 2019. DOI: 10.5747/ca.2019.v15.n4.a311.

CHAER, G. M.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M.; BODDEY, R. M. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, v. 31, n. 2, p. 139-149, 2011. DOI: 10.1093/treephys/tpq116.

CHAER, G. M.; GONÇALVES, F. L. A.; SOUZA, M. P.; SILVA, F. F.; LIMA, K. D. R.; CAVALCANTI, C. R.; CAMPELLO, E. F. C.; CUNHA, C. F.; ARAÚJO, J. E.; FONTES, M. A.; RESENDE, A. S. Estratégias de recuperação ambiental de áreas de produção de petróleo e gás em terra na Caatinga. In: RESENDE, A. S.; CHAER, G. M. (Ed.). **Recuperação ambiental em áreas de produção de petróleo e gás em terra na Caatinga**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. p. 40-97.

CHAPARRO, J. M.; SHEFLIN, A. M.; MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 5, p. 489-499, 2012. DOI: 10.1007/s00374-012-0691-4.

CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D. J.; SELVAKUMAR, G.; SUNDARAM, S. P. Novel plant growth promoting rhizobacteria - Prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 38-53, 2015. DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.05.011.

CHAZDON, R. L.; URIARTE, M. Natural regeneration in the context of large-scale forest and landscape restoration in the tropics. **Biotropica**, v. 48, n. 6, p. 709-715, 2016. DOI: 10.1111/btp.12409.

CHAZDON, R.; BRANCALION, P. Restoring forests as a means to many ends. **Science**, v. 365, n. 6448, p. 24-25, 2019. DOI: 10.1126/science.aax9539.

CHECCUCCI, A.; DICENZO, G. C.; BAZZICALUPO, M.; MENGONI, A. Trade, diplomacy, and warfare: the quest for elite rhizobia inoculant strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2207, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02207.

CHENOT, J.; JAUNATRE, R.; BUISSON, E.; DUTOIT, T. Long-term effects of topsoil transfer assessed thirty years after rehabilitation of dry alluvial quarries in Southeastern France. **Ecological Engineering**, v. 99, p. 1-12, 2017. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2016.11.010.

CIPRIANI, V. B.; GARLET, J.; LIMA, B. M. Quebra de dormência em sementes de *Chloroleucon acacioides* e *Senna macranthera*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 49-54, 2019. DOI: 10.19084/RCA18238.

COMITA, L. S.; MULLER-LANDAU, H. C.; AGUILAR, S.; HUBBELL, S. P. Asymmetric density dependence shapes species abundances in a tropical tree community. **Science**, v. 329, n. 5989, p. 330-332, 2010. DOI: 10.1126/science.1190772.

CRAIG, M.; BUCKLEY, G. P. Responses of two woodland geophytes to disturbance caused by soil translocation. **Plant Ecology**, v. 214, n. 9, p. 1091-1103, 2013. DOI: 10.1007/s11258-013-0233-7.

CROSSAY, T.; MAJOREL, C.; REDECKER, D.; GENSOUS, S.; MEDEVIELLE, V.; DURRIEU, G.; CAVALOC, Y.; AMIR, H. Is a mixture of arbuscular mycorrhizal fungi better

for plant growth than single-species inoculants? **Mycorrhiza**, v. 29, n. 4, p. 325-339, 2019. DOI: 10.1007/s00572-019-00898-y.

CROUZEILLES, R.; SANTIAMI, E.; ROSA, M.; PUGLIESE, L.; BRANCALION, P. H. S. ; RODRIGUES, R. R.; METZGER, J. P.; CALMON, M.; SCARAMUZZA, C. M. A.; MATSUMOTO, M. H.; PADOVEZI, A.; BENINI, R. M.; CHAVES, R. B.; METZKER, T.; FERNANDES, R. B.; SCARANO, F. R.; SCHMITT, J.; LUI, G.; CHRIST, P.; VIEIRA, R. M.; SENTA, M. M. D.; MALAGUTI, G. A.; STRASSBURG, B. B. N.; PINTO, S. There is hope for achieving ambitious Atlantic Forest restoration commitments. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 17, n. 2, p. 80-83, 2019. DOI: 10.1016/j.pecon.2019.04.003.

DALL'AGNOL, R. F.; BOURNAUD, C.; FARIA, S. M.; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 4, fix027, 2017. DOI: 10.1093/femsec/fix027.

DELLAGI, A.; QUILLERE, I.; HIREL, B. Beneficial soil-borne bacteria and fungi: a promising way to improve plant nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany**, 2020. DOI: 10.1093/jxb/eraa112.

DENK, T. R.; MOHN, J.; DECOCK, C.; LEWICKA-SZCZEBAK, D.; HARRIS, E.; BUTTERBACH-BAHL, K.; KIESE, R.; WOLF, B. The nitrogen cycle: A review of isotope effects and isotope modeling approaches. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 105, p. 121-137, 2017. DOI: 10.1016/j.soilbio.2016.11.015.

DIAS, D. D. **Recrutamento e estabelecimento de plantas após transposição de topsoil para área degradada pela mineração de bauxita**. 2017. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de biomas tropicais) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

DUARTE, R. M. R.; CASAGRANDE, J. C. A interação solo-planta na recuperação de áreas degradadas. In: BARBOSA, L.M. **Manual para recuperação de áreas degradadas do Estado de São Paulo: Matas Ciliares do Interior Paulista**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. p.52-69.

EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature methods**, v.10, p. 996-998, 2013. DOI: 10.1038/nmeth.2604.

EMAMVERDIAN, A.; DING, Y.; XIE, Y. The role of new members of phytohormones in plant amelioration under abiotic stress with an emphasis on heavy metals. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 29, n. 2, p. 1009-1020, 2020. DOI: 10.15244/pjoes/108687.

EMATER. **Cachoeiras de Macacu**. 2022. Disponível em: <<http://www.emater.rj.gov.br/cmacacu.asp>>. Acesso em 27 mai. 2022.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2º ed. Rio de Janeiro. Embrapa Solos. 2006. 306p.

ESKIN, N.; VESSEY, K.; TIAN, L. Research progress and perspectives of nitrogen fixing bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in monocot plants. **International Journal of Agronomy**, v. 2014, p. 1-13, 2014. DOI: 10.1155/2014/208383.

FINGER, G. P. Efeito do fósforo sobre a interação das bactérias isoladas da rizosfera de guandu "*Cajanus cajan*". 2002. 71 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; REIS, V. M. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas.** Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2008. 33 p. (Embrapa Agrobiologia. Documento 252).

FERGUSON, M.; IHRIE, J. **MPN: Most Probable Number and Other Microbial Enumeration Techniques.** 2019. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/MPN/index.html>>. Acesso em: 29 abr. 2022.

FERREIRA, A. C. C.; LEITE, L. F. C.; ARAÚJO, A. S. F.; EISENHAUER, N. Land-use type effects on soil organic carbon and microbial properties in a semi-arid region of northeast Brazil. **Land Degradation & Development**, v. 27, n. 2, p. 171-178, 2016. DOI: 10.1002/ldr.2282.

FERREIRA, M. C.; VIEIRA, D. L.; WALTER, B. M. **Transposição de “topsoil” (camada superficial do solo) para a restauração ecológica no Cerrado.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 5 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico 167).

FERREIRA, M. C.; WALTER, B. M.; VIEIRA, D. L. Topsoil translocation for Brazilian savanna restoration: propagation of herbs, shrubs, and trees. **Restoration Ecology**, v. 23, n. 6, p. 723-728, 2015. DOI: 10.1111/rec.12252.

FERREIRA, M. C.; VIEIRA, D. L. M. Topsoil for restoration: Resprouting of root fragments and germination of pioneers trigger tropical dry forest regeneration. **Ecological Engineering**, v. 103, p. 1-12, 2017. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2017.03.006.

FIERER, N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 579-590, 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.87.

FINKEL, O. M.; CASTRILLO, G.; PAREDES, S. H.; GONZÁLEZ, I. S.; DANGL, J. L. Understanding and exploiting plant beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 155-163, 2017. DOI: 10.1016/j.pbi.2017.04.018.

FREIRE, J. M.; OLIVEIRA, L. M.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Vinhático (*Plathymenia reticulata* Benth.). Londrina: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes - Comitê Técnico de Sementes Florestais, 2017. 5 p (Nota técnica, 01).

FREIRE, J. M.; FARIA, S. M. D.; ZILLI, J. E.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; CAMARGO, I. S.; ROUWS, J. R. C.; JESUS, E. C. Symbiotic efficiency of inoculation with nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in *Tachigali vulgaris* seedlings. **Revista Árvore**, v. 44, 2020. DOI: 10.1590/1806-908820200000024.

FOO, J. L.; LING, H.; LEE, Y. S.; CHANG, M. W. Microbiome engineering: Current applications and its future. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 3, p. 1600099, 2017. DOI: 10.1002/biot.201600099.

FOWLER, J.; CARPANEZZI, A. A. Tecnologia de sementes de maricá (*Mimosa bimucronata* (DC) O. Ktze.). **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 36, p. 47-56, 1998.

FOWLER, W. M.; FONTAINE, J. B.; ENRIGHT, N. J.; VEBER, W. P. Evaluating restoration potential of transferred topsoil. **Applied Vegetation Science**, v. 18, n. 3, p. 379-390, 2015. DOI: 10.1111/avsc.12162.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Atlantic Forest hotspots status: an overview. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. (Ed.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington: Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International & Island Press, 2003. p. 3-11.

GERDERMANN, J. N.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963. DOI: 10.1016/S0007-1536(63)80079-0.

GIL, G. **Refloresta**. 2021. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=YAQxp-rkFVM&ab_channel=GilbertoGil>. Acesso em: 16 jan. 2023.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84, n. 3, p. 484-500, 1980. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x.

GIOVANNETTI, M.; AVIO, L.; SBRANA, C. Functional significance of anastomosis in arbuscular mycorrhizal networks. In: HORTON, T.R. (Ed.). **Mycorrhizal networks**. Dordrecht: Springer, 2015. p. 41-67.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012. DOI: 10.6064/2012/963401.

GLICK, B. R. **Beneficial plant-bacterial interactions**. Switzerland: Springer, 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-13921-0.

GOLOS, P. J.; DIXON, K. W. Waterproofing topsoil stockpiles minimizes viability decline in the soil seed bank in an arid environment. **Restoration Ecology**, v. 22, p. 495-501, 2014. DOI: 10.1111/rec.12090.

GONÇALVES, G. L. M. **Recomendação de adubação para *Eucalyptus*, *Pinus* e espécies típicas da Mata Atlântica**. Piracicaba: IPEF, 1995. 23 p. (Documentos Florestais. N° 15, 1995).

GOSS-SOUZA, D.; MENDES, L. W.; BORGES, C. D.; BARETTA, D.; TSAI, S. M.; RODRIGUES, J. L. Soil microbial community dynamics and assembly under long-term land use change. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 10, 2017. DOI: 10.1093/femsec/fix109.

GOSSNER, M. M.; LEWINSOHN, T. M.; KAHL, T.; GRASSEIN, F.; BOCH, S.; PRATI, D.; BIRKHOFER, K.; RENNER, S. C.; SIKORSKI, J.; WUBET, T.; ARNDT, H.; BAUMGARTNER, V.; BLASER, S.; BLÜTHGEN, N.; BÖRSCHIG, C.; BUSCOT, F.; DIEKÖTTER, T.; JORGE, L. R.; JUNG, K.; KEYEL, A. C.; KLEIN, A. M.; KLEMMER, S.; KRAUSS, J.; LANGE, M.; MÜLLER, J.; OVERMANN, J.; PAŠALIĆ, E.; PENONE, C.; PEROVIĆ, D. J.; PURSCHKE, O.; SCHALL, P.; SOCHER, S. A.; SONNEMANN, I.; TSCHAPKA, M.; TSCHARNTKE, T.; TÜRKE, M.; VENTER, P. C.; WEINER, C. N.; WERNER, M.; WOLTER, V.; WURST, S.; WESTPHAL, C.; FISCHER, M.; WEISSE, W. W.; ALLAN, E. Land-use intensification causes multitrophic homogenization of grassland communities. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 266–269, 2016. DOI: 10.1038/nature20575.

GRACE, C.; STRIBLEY, D. P. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v. 95, p. 11160-11162, 1991.

GRIESMANN, M.; CHANG, Y.; LIU, X.; SONG, Y.; HABERER, G.; CROOK, M.B.; BILLAULT-PENNETEAU, B.; LAURESSERGUES, D.; KELLER, J.; IMANISHI, L.; ROSWANJAYA, Y. P.; KOHLEN, W.; PUJIC, P.; BATTENBERG, K.; ALLOISIO, N.; LIANG, Y.; HILHORST, W.; SALGADO, M. G.; HOCHER, V.; GHERBI, H.; SVISTOONOFF, S.; DOYLE, J. J.; HE, S.; XU, Y.; QU, J.; GAO, Q.; FANG, X.; FU, Y.; NORMAND, P.; BERRY, A. M.; WALL, L. G.; ANÉ, J. M.; PAWLOWSKI, K.; XU, X.; YANG, H.; SPANNAGL, M.; MAYER, K. F. X.; WONG, G. K. S.; PARNISKE, M.; DELAUX, P. M.; CHENG, S. Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. **Science**, v. 361, n. 6398, eaat1743, 2018. DOI: 10.1126/science.aat1743.

GROSS, E.; CORDEIRO, L.; CAETANO, F. H. Nodulação e micorrização em *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* em solo de cerrado autoclavado e não autoclavado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 95-101, 2004. DOI: 10.1590/S0100-06832004000100010.

GRZĄDZIEL, J. Functional redundancy of soil microbiota—does more always mean better? **Polish Journal of Soil Science**, v. 50, n. 1, p. 75, 2017. DOI: 10.17951/pjss.2017.50.1.75.

GUTJAHR, C.; PARNISKE, M. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, p. 593-617, 2013. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122413.

GUZMÁN, I.; DÖBEREINER, J. Effectiveness and efficiency in the symbiosis of your cross inoculated tropical legumes. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS, 4., 1968. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1968. p. 81-91.

HALL, S. L.; BARTON, C. D.; BASKIN, C. C. Topsoil Seed Bank of an Oak–Hickory Forest in Eastern Kentucky as a Restoration Tool on Surface Mines. **Restoration Ecology**, v. 18, n. 6, p.834-842, 2010. DOI: 10.1111/j.1526-100X.2008.00509.x.

HART, M. M.; ANTUNES, P. M.; ABBOTT, L. K. Unknown risks to soil biodiversity from commercial fungal inoculants. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 4, p. 1-1, 2017. DOI: 10.1038/s41559-017-0115.

HART, M. M.; ANTUNES, P. M.; CHAUDHARY, V. B.; ABBOTT, L. K. Fungal inoculants in the field: Is the reward greater than the risk? **Functional Ecology**, v. 32, n. 1, p. 126-135, 2018. DOI: 10.1111/1365-2435.12976.

HASSANI, M.; DURÁN, P.; HACQUARD, S. Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2018. DOI: 10.1186/s40168-018-0445-0.

HELENE, L. C. F.; KLEPA, M. S.; HUNGRIA, M. New insights into the taxonomy of bacteria in the genomic era and a case study with rhizobia. **International Journal of Microbiology**, v. 2022, 2022. DOI: 10.1155/2022/4623713.

HOEKSEMA, J. D.; AVERILL, C.; BHATNAGAR, J. M.; BRZOSTEK, E.; BUSCARDO, E.; CHEN, K. H.; LIAO, H. L.; NAGY, L.; POLICELLI, N.; RIDGEWAY, J.; ROJAS, A.; VILGALYS, R. Ectomycorrhizal plant-fungal co-invasions as natural experiments for connecting plant and fungal traits to their ecosystem consequences. **Frontiers in Forests and Global Change**, v. 3, p. 84, 2020. DOI: 10.3389/ffgc.2020.00084.

HOLL, K. D. Restoring tropical forests from the bottom up. **Science**, v. 355, n. 6324, p. 455-456, 2017. DOI: 10.1126/science.aam5432.

HÜLLER, A.; COELHO, G. C.; MENEGHELLO, G. E.; PESKE, S. T. Evaluation of direct seeding and seedling planting of two neotropical tree species with the use of natural inputs. **Revista Árvore**, v. 41, n. 4, 2017. DOI: 10.1590/1806-90882017000400005.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação**. Brasília: IBAMA, 1990. 96 p.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Rio Claro. 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rj/rio-claro>>. Acesso em: 25 fev. 2021.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Cachoeiras de Macacu. 2019. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rj/cachoeiras-de-macacu>>. Acesso em: 25 set. 2021.

IMPROTA, F. M.; LIBÓRIO, M. P.; ALVES, D. F. C.; LAUDARES, S. 2020. Geotecnologia aplicada à gestão de programas de pagamento de serviços ambientais: o caso de Rio Claro, Rio de Janeiro. **Revista Tamoios**, v. 16, n. 2, p. 52-66, 2020. DOI: 10.12957/tamoios.2020.43666.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Dados históricos anuais**. Disponível em: <<https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos>>. Acesso em: 25 mar. 2021.

ISERNHAGEN, I.; BRANCALION, P. H. S.; RODRIGUES, R. R.; NAVE, A. G.; GANDOLFI, S. Diagnóstico ambiental das áreas a serem restauradas visando a definição de metodologias de restauração florestal. In: Rodrigues R.R., Brancalion P.H.S., Isernhagen, I. (Eds.). **Pacto pela restauração da Mata Atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**. São Paulo: Instituto BioAtlântica, 2009. p. 91-130.

IVANOVA, E. A.; PERSHINAA, E. V.; KUTOVAYAB, O. V.; SERGALIEVA, N. K.; NAGIEVAD, A. G.; ZHIENGALIEVD, A. T.; PROVOROVA, N. A.; ANDRONOVA, E. E.

Comparative analysis of microbial communities of contrasting soil types in different plant communities. **Russian Journal of Ecology**, v. 49, n. 1, p. 30-39, 2018. DOI: 10.1134/S106741361801006X.

JAKOVAC, A. C. C. **O uso do banco de sementes florestal contido no topsoil como estratégia de recuperação de áreas degradadas**. 2007. 152 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

JAKOVAC, C. C.; JUNQUEIRA, A. B.; CROUZEILLES, R.; PEÑA-CLAROS, M.; MESQUITA, R. C.; BONGERS, F. The role of land-use history in driving successional pathways and its implications for the restoration of tropical forests. **Biological Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1114-1134, 2021. DOI: 10.1111/brv.12694.

JANSA, J.; ERB, A.; OBERHOLZER, H.; SMILAUER, P.; EGLI, S. Soil and geography are more important determinants of indigenous arbuscular mycorrhizal communities than management practices in Swiss agricultural soils. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 2118-2135, 2014. DOI: 10.1111/mec.12706.

JARVIS, B.; WILRICH, C.; WILRICH, P. T. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 5, p. 1660-1667, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x.

JAUNATRE, R.; BUISSON, E.; DUTOIT, T. Topsoil removal improves various restoration treatments of a Mediterranean steppe (La Crau, southeast France). **Applied Vegetation Science**, v. 17, n. 2, p. 236 -245, 2014. DOI: 10.1111/avsc.12063.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 692, 1964.

JESUS, E. C.; SCHIAVO, J. A.; FARIA, S. M. D. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. **Revista Árvore**, 29, p. 545-552, 2005. DOI: 10.1590/S0100-67622005000400006.

JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009. DOI: 10.1038/ismej.2009.47.

JHA, C. K.; SARAF, M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. **Journal of Agricultural Research and Development**, v. 5, n. 2, p. 108-119, 2015. DOI: 10.13140/RG.2.1.5171.2164.

JIA, Y.; WHALEN, J. K. A new perspective on functional redundancy and phylogenetic niche conservatism in soil microbial communities. **Pedosphere**, v. 30, n. 1, p. 18-24, 2020.

KAFLE, A.; GARCIA, K.; WANG, X.; PFEFFER, P. E.; STRAHAN, G. D.; BÜCKING, H. Nutrient demand and fungal access to resources control the carbon allocation to the symbiotic partners in tripartite interactions of *Medicago truncatula*. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, n. 1, p. 270-284, 2019.

KAMINSKY, L. M.; TREXLER, R. V.; MALIK, R. J.; HOCKETT, K. L.; BELL, T. H. The inherent conflicts in developing soil microbial inoculants. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 140-151, 2019. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.11.011.

KAUSHAL, M.; WANIS, S. P. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 35–42, 2015. DOI: 10.1007/s13213-015-1112-3.

KENAWY, A.; DAILIN, D. J.; ABO-ZAID, G. A.; ABD MALEK, R.; AMBEHABATI, K. K.; ZAKARIA, K. H. N.; SAYYED, R. Z.; EL ENSHASY, H. A. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and their roles in biocontrol of plant diseases. In: **Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable stress management**. Singapore: Springer. p. 1-35. DOI: 10.1007/978-981-13-6986-5_1.

KINDEL, A.; GARAY, I.; DO CARMO, C. A. F. S.; LIMA, J. D. S. **Quantificação dos horizontes húmicos e dinâmica da decomposição de material foliar em solos florestais: contribuição ao estudo de seqüestro de carbono**. Rio de Janeiro, RJ: Embrapa, 2003. 8 p. (Embrapa. Comunicado Técnico 21).

KOCH, A. M.; ANTUNES, P. M.; BARTO, E. K.; CIPOLLINI, D.; MUMMEY, D. L.; KLIRONOMOS, J. The effects of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal and garlic mustard introductions on native AM fungal diversity. **Biological Invasions**, v. 13, n. 7, p. 1627-1639, 2011. DOI: 10.1007/s10530-010-9920-7.

KÖPPEN, W. **Climatología**: con un estudio de los climas de la Tierra. Ciudad del Méjico: Fondo de Cultura Económica, 1948. 479 p.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v. 92, n. 4, p. 486-488, 1989. DOI: 10.1016/S0953-7562(89)80195-9.

KOZIOL, L.; SCHULTZ, P. A.; HOUSE, G. L.; BAUER, J. T.; MIDDLETON, E. L.; BEVER, J. D. The plant microbiome and native plant restoration: the example of native mycorrhizal fungi. **BioScience**, v. 68, n. 12, p. 996-1006, 2018. DOI: 10.1093/biosci/biy125.

KRAMER, J.; ÖZKAYA, Ö.; KÜMMERLI, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 152-163, 2020. DOI: 10.1038/s41579-019-0284-4.

LANCE, A. C.; BURKE, D. J.; HAUSMAN, C. E.; BURNS, J. H. Microbial inoculation influences arbuscular mycorrhizal fungi community structure and nutrient dynamics in temperate tree restoration. **Restoration Ecology**, v. 27, n. 5, p. 1084-1093, 2019. DOI: 10.1111/rec.12962.

LANFRANCO, L.; BONFANTE, P.; GENRE, A. The mutualistic interaction between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. **The Fungal Kingdom**, v. 4, n. 6, p. 727-747, 2016. DOI: 10.1128 / 9781555819583.ch35

LANFRANCO, L.; FIORILLI, V.; GUTJAH, C. Partner communication and role of nutrients in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1031-1046, 2018. DOI: 10.1111/nph.15230.

LEAL FILHO, N.; SANTOS, G. R.; FERREIRA, R. L. Comparando técnicas de nucleação utilizadas na restauração de áreas degradadas na Amazônia brasileira. **Revista Árvore**, v. 37, p. 587-597, 2013. DOI: 10.1590/S0100-67622013000400002.

LELES, P. S. S.; ABAURRE, G. W.; ALONSO, J. M.; NASCIMENTO, D. D.; LISBOA, A. C. Crescimento de espécies arbóreas sob diferentes espaçamentos em plantio de recomposição florestal. **Scientia Forestalis**, v. 39, n. 90, p. 231-239, 2011.

LI, Y.; TIAN, C. F.; CHEN, W. F.; WANG, L.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. High-resolution transcriptomic analyses of *Sinorhizobium* sp. NGR234 bacteroids in determinate nodules of *Vigna unguiculata* and indeterminate nodules of *Leucaena leucocephala*. **PLOS One**, v. 8, n. 8, p. 1337, e70531, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0070531.

LIMA, K. D. R.; CHAER, G. M.; ROWS, J. R. C.; MENDONÇA, V.; RESENDE, A. S. Seleção de espécies arbóreas para revegetação de áreas degradadas por mineração de piçarra na Caatinga. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 1, p. 203-213, 2015.

LIMA, K. D. R.; CAMARA, R.; CHAER, G. M.; PEREIRA, M. G.; RESENDE, A. S. A fauna do solo como bioindicador de recuperação de áreas degradadas no bioma Caatinga. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 2, p. 401-411, 2017. DOI: 10.1590/1983-21252017v30n215rc.

LITCHMAN, E. Invisible invaders: non-pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v. 13, n. 12, p. 1560-1572, 2010. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2010.01544.x.

LIU, X.; LIANG, M.; ETIENNE, R. S.; WANG, Y.; STAEHELIN, C.; YU, S. Experimental evidence for a phylogenetic Janzen–Connell effect in a subtropical forest. **Ecology Letters**, v. 15, n. 2, p. 111-118, 2012. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2011.01715.x.

LPWG - The Legume Phylogeny Working Group. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **TAXON**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017. DOI: 10.12705/661.3.

MACEDO, M. O.; RESENDE, A. S.; GARCIA, P. C.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S.; CAMPOLLO, E. F. C.; FRANCO, A. A. Changes in soil C and N stocks and nutrient dynamics 13 years after recovery of degraded land using leguminous nitrogen-fixing trees. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 5, p. 1516–1524, 2008. DOI: 10.1016/j.foreco.2007.11.007.

MACHADO, R. L.; RESENDE, A. S.; PITARD, R.; DE FARIA, S. M. **Obtenção e seleção de estípites de rizóbio para leguminosas florestais com potencial de uso em áreas degradadas** (Aproximação de 2005). Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2004. 7 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico 70).

MACKENZIE, D. D.; NAETH, M. A. Native seed, soil and atmosphere respond to boreal forest topsoil (LFH) storage. **PloS one**, v. 14, n. 9, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0220367.

MAIA, L. C.; PASSOS, J. H.; SILVA, J. A.; OEHL, F.; ASSIS, D. M. A. Species diversity of Glomeromycota in Brazilian biomes. **Sydowia**, v. 72, p. 181-205, 2020. DOI: 10.12905/0380.sydowia72-2020-0181.

MAITI, S. K.; MAITI, D. Ecological restoration of waste dumps by topsoil blanketing, coir-matting and seeding with grass-legume mixture. **Ecological engineering**, v. 77, p. 74-84, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2015.01.003.

MANGAN, S. A.; SCHNITZER, S. A.; HERRE, E. A.; MACK, K. M.; VALENCIA, M. C.; SANCHEZ, E. I.; BEVER, J. D. Negative plant-soil feedback predicts tree-species relative abundance in a tropical forest. **Nature**, v. 466, n. 7307, p. 752-755, 2010. DOI: 10.1038/nature09273.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1102 p.

MARTINS, E. M.; SILVA, E. R. D.; CAMPELLO, E. F. C.; LIMA, S. S. D.; NOBRE, C. P.; CORREIA, M. E. F.; RESENDE, A. S. O uso de sistemas agroflorestais diversificados na restauração florestal na Mata Atlântica. **Ciência Florestal**, v. 29, p. 632-648, 2019. DOI: 10.5902/1980509829050.

MARTINS, S. V.; NETO, A. M.; RIBEIRO, T. M. Uma abordagem sobre diversidade e técnicas de restauração ecológica. In: MARTINS, S.V. (Ed.) **Restauração Ecológica de Ecossistemas Degradados**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2012. p.1-34.

MARTINS, S. V.; SARTORI, M.; RAPOSO FILHO, F. L.; SIMONELI, M.; DADALTO, G.; PEREIRA, L. M.; SILVA, A. E. S. **Potencial de regeneração natural de florestas nativas nas diferentes regiões do estado do Espírito Santo**. Espírito Santo: CEDAGRO, 2014. 102p.

MARTINS, S. V. Alternative Forest Restoration Techniques. In: VIANA, H. (Ed.). **New Perspectives in Forest Science**. 1 ed. London: InTech, 2018. v. 1, cap. 7, p. 131-148.

MASSON-BOIVIN, C.; SACHS, J. L. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 44, p. 7-15, 2018. DOI: 10.1016/j.pbi.2017.12.001.

MAWARDA, P. C.; LE ROUX, X.; VAN ELSAS, J. D.; SALLES, J. F. Deliberate introduction of invisible invaders: A critical appraisal of the impact of microbial inoculants on soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, p. 107874, 2020. DOI: doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107874.

MCLAUGHLIN, D. J.; SPATAFORA, J. W. (Eds.). **The Mycota**. Systematics and Evolution v. 7, part A. Heidelberg: Springer, 2014. 461 p.

MCMAHEN, K.; LAVKULICH, L. M.; GRAYSTON, S. J.; SIMARD, S. W. Small-volume additions of forest topsoil improve root symbiont colonization and seedling growth in mine reclamation. **Applied Soil Ecology**, v. 180, 104622, 2022. DOI: 10.1016/j.apsoil.2022.104622.

MEIER, S.; CORNEJO, P.; CARTES, P.; BORIE, F.; MEDINA, J.; ANDAZCÓN, R. Interactive effect between Cu-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and biotreated agrowaste residue to improve the nutritional status of *Oenothera picensis* growing in Cu-polluted soils.

Journal of Plant Nutrition and Soil Science, v. 178, n. 1, p. 126-135, 2015. DOI: 10.1002/jpln.201400092.

MENDES, L. W.; TSAI, S. M.; NAVARRETE, A. A.; DE HOLLANDER, M.; VAN VEEN, J. A.; KURAMAE, E. E. Soil-borne microbiome: linking diversity to function. **Microbial ecology**, v. 70, n. 1, p. 255-265, 2015a. DOI: 10.1007/s00248-014-0559-2.

MENDES, L. W.; LIMA BROSSI, M. J.; KURAMAE, E. E.; TSAI, S. M. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151-160, 2015. DOI: 10.1007/s00248-014-0559-2.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Mata Atlântica**. 2020. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas/mata-atl%C3%A2ntica_emdesenvolvimento>. Acesso em 20 fev. 2020.

MIRANDA, J. C. C. **Cerrado**: micorriza arbuscular - ocorrência e manejo. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 152p.

MTSCH, M. J.; DICENZO, G. C.; COWIE, A.; FINAN, T. M. Succinate transport is not essential for symbiotic nitrogen fixation by *Sinorhizobium meliloti* nor *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, e01561-17, 2017. DOI: 10.1128/AEM.01561-17.

MITTERMEIER, R. A.; TURNER, W. R.; LARSEN, F. W.; BROOKS, T. M.; GASCON, C. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. (Eds.). **Biodiversity Hotspots**: distribution and protection of conservation priority areas. Heidelberg: Springer, 2011. p. 3–22. DOI: 10.1007/978-3-642-20992-51.

MOHANRAM, S.; KUMAR, P. Rhizosphere microbiome: revisiting the synergy of plant-microbe interactions. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 307-320, 2019. DOI: 10.1007/s13213-019-01448-9.

MORA-ROMERO, G. A.; CERVANTES-GÁMEZ, R. G.; GALINDO-FLORES, H.; GONZALEZ-ORTIZ, M. A.; FELIX-GASTÉLUM, R.; MALDONADO-MENDOZA, I. E.; SALINAS, P. R.; LEON-FELIX, J.; MARTINEZ-VALUENZUELA, M. C.; LOPEZ-MEYER, M. Mycorrhiza-induced protection against pathogens is both genotype-specific and graft-transmissible. **Symbiosis**, v. 66, n. 2, p. 55–64, 2015. DOI: 10.1007/s13199-015-0334-2.

MORAES, R. P.; CARVALHO, W. A. C.; PEREIRA, J. A. A.; NASCIMENTO, G. O.; BARROS, D.A. Effect of topsoil stockpiling on the viability of seed bank in field phytophysiognomies Campos de Altitude. **Cerne**, v. 23, n. 3, p. 339-347, 2017. DOI: 10.1590/01047760201723032340.

MORALES-GARCÍA, Y. E.; BAEZ, A.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; MOLINA-ROMERO, D.; RIVERA-URBALEJO, A. P.; PAZOS-ROJAS, L. A.; MUÑOZ-ROJAS, J. Bacterial Mixtures, the Future Generation of Inoculants for Sustainable Crop Production. In: **Field Crops: Sustainable Management by PGPR**. Switzerland: Springer, 2019. p. 11-44. DOI: 10.1007/978-3-030-30926-8.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MUS, F.; CROOK, M. B.; GARCIA, K.; GARCIA COSTAS, A.; GEDDES, B. A.; KOURI, E. D.; PARAMASIVAN, P.; RYU, M. H.; OLDROYD, G. E. D.; POOLE, P. S.; UDVARDI, M. K.; VOIGT, C. A.; ANÉ, J. M.; PETERS, J. W. Symbiotic nitrogen fixation and challenges to extending it to non-legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3698-3710, 2016. DOI: 10.1128/AEM.01055-16.

NASTO, M. K.; ALVAREZ-CLARE, S.; LEKBERG, Y.; SULLIVAN, B. W.; TOWNSEND, A. R.; CLEVELAND, C. C. Interactions among nitrogen fixation and soil phosphorus acquisition strategies in lowland tropical rain forests. **Ecology Letters**, v. 17, n. 10, p. 1282-1289, 2014. DOI: 10.1111/ele.12335.

NAVARRETE, D.; SITCH, S.; ARAGÃO, L. E.; PEDRONI, L. Conversion from forests to pastures in the Colombian Amazon leads to contrasting soil carbon dynamics depending on land management practices. **Global Change Biology**, v. 22, n. 10, p. 3503-3517, 2016. DOI: 10.1111/gcb.13266.

NAVARRO, M. O.; BARAZETTI, A.; NIEKAWA, E. T.; DEALIS, M. L.; MATOS, J. M. S.; LIUTI, G.; MODOLON, F.; OLIVEIRA, I. M.; ANDREATA, M.; CELY, M. V. T.; ANDRADE, G. Microbial Biological Control of Diseases and Pests by PGPR and PGPF. In: SINGH, D. P.; GUPTA, V. K.; PRABHA, R. **Microbial interventions in agriculture and environment**. Singapura: Springer, 2019. p. 75-122. DOI: 10.1007/978-981-13-8383-0_3.

NERY, E. R. A.; SARAIVA, C. S.; CRUZ, L. M. S.; SOUZA, M. M. O. R.; GOMES, F. S.; EL-HANI, C. N.; MARIANO-NETO, E. O conceito de restauração na literatura científica e na legislação brasileira. **Revista Caititu**, v. 1, n. 1, p. 43-56, 2013. DOI: 10.7724/caititu.2013.v1.n1.d04.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 334 p.

NOGUEIRA, L. R.; SILVA, C. F.; PEREIRA, M. G.; GAIA-GOMES, J. H.; SILVA, E. M. R. Biological properties and organic matter dynamics of soil in pasture and natural regeneration areas in the Atlantic Forest biome. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, 2016. DOI: 10.1590/18069657rbcs20150366.

NOVAIS, C. B.; SBRANA, C.; JESUS, E. C.; ROUWS, L. F. M.; GIOVANNETTI, M.; AVIO, L.; SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.; FARIA, S. M. Mycorrhizal networks facilitate the colonization of legume roots by a symbiotic nitrogen-fixing bacterium. **Mycorrhiza**, v. 30, p. 389-396, 2020.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. Q.; JESUS, E. C.; PEREIRA, M. G.; CAMARA, R.; FONSECA JÚNIOR, A. M.; SOUSA, A. C. O. Dependency and response of *Apuleia leiocarpa* to

inoculation with different species of arbuscular mycorrhizal fungi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017a. DOI: 10.1590/18069657rbcs20160174.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. Q.; JESUS, E. C.; LISBOA, F. J.; BERBARA, R. L. L.; FARIA, S. M. Nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 95-100, 2017b. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.013.

ONÉSIMO, C. M.; DIAS, D. D.; VALE BEIRÃO, M.; KOZOVITS, A. R.; MESSIAS, M. C. T. Ecological succession in areas degraded by bauxite mining indicates successful use of topsoil. **Restoration Ecology**, v. 29, n. 1, p. e13303, 2021.

PAGANO, M. C.; CABELLO, M. N.; SCOTTI, M. R. Phosphorus response of three native Brazilian trees to inoculation with four arbuscular mycorrhizal fungi. **Journal of Agricultural Technology**, v. 3, p. 231-240, 2007.

PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B.; SILVA, J. M. C. A fauna brasileira ameaçada de extinção: síntese taxonômica e geográfica. In: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G. M., PAGLIA, A. P. (Eds.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**, v. 2. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. p. 63–70.

PAIVA SOBRINHO, S. D.; SIQUEIRA, A. G.; MORAIS, P. D. B.; SILVA, S. J. D. Superação da dormência em sementes de mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam. -Sterculiaceae). **Revista Árvore**, v. 36, n. 5, p. 797-802, 2012. DOI: 10.1590/S0100-67622012000500001.

PALMER, M. A.; RUHL, J. B. Aligning restoration science and the law to sustain ecological infrastructure for the future. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 13, n. 9, p. 512–519, 2015. DOI: 10.1890/150053.

PARROTA, J. A.; KNOWLES, O. H. Restauração florestal em áreas de mineração de bauxita na Amazônia. In: KAGEYAMA, P. Y.; OLIVEIRA, R. E.; MORAES, L. F. D.; ENGEL, V. L.; GANDARA, F. B. (Eds.). **Restauração Ecológica de Ecossistemas Naturais**. São Paulo: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais-FEPAF, 2003. p. 307-330.

PATIL, A. S.; PATIL, S. R.; SAYYED, R. Z. Interaction of Rhizobacteria with soil microorganisms: an agro-beneficiary aspect. In: SAYYED, R.Z. (Ed.). v. 2. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management**. Singapura: Springer, 2019. p. 241-259. DOI: 10.1007/978-981-13-6986-5.

PEAY, K. G.; BARALOTO, C.; PAUL, V. A. Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. **The ISME Journal**, v. 7, n. 9, p. 1852-1861, 2013. DOI: 10.1038/ismej.2013.66.

PEDONE-BONFIM, M. V. L., DA SILVA, D. K. A., MAIA, L. C. Mycorrhizal benefits on native plants of the Caatinga, a Brazilian dry tropical forest. **Symbiosis**, v. 74, p. 79–88, 2018. DOI: 10.1007/s13199-017-0510-7.

PEDRINHO, A.; MENDES, L. W.; MERLOTI, L. F.; FONSECA, M. D. C.; CANNANAN, F. D. S.; TSAI, S. M. Forest-to-pasture conversion and recovery based on assessment of microbial

communities in Eastern Amazon rainforest. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, n. 3, p. fiy236, 2019. DOI: 10.1093/femsec/fiy236.

PELLEGRINO, E.; TURRINI, A.; GAMPER, H. A.; CAFA, G.; BONARI, E.; YOUNG, J. P. W.; GIOVANETTI, M. Establishment, persistence and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal inoculants in the field revealed using molecular genetic tracing and measurement of yield components. **New Phytologist**, v. 194, n. 3, p. 810-822, 2012. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04090.x.

PENG, S.; GUO, T.; LIU, G. The effects of arbuscular mycorrhizal hyphal networks on soil aggregations of purple soil in southwest China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 411-417, 2013. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.10.026.

PEREIRA, E. G.; SIQUEIRA, J. O.; CURI, N.; MOREIRA, F. M. S.; PURCINO, A. A. C. Efeitos da micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 1, p. 59-65, 1996.

PETERSON, R. L.; FARQUHAR, M. L. Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. **Botanical Review**, v. 62, p. 1-40, 1996.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, A. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, n. 55, p. 158-161, 1970. DOI: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3.

PILON, N. A.; BUISSON, E.; DURIGAN, G. Restoring Brazilian savanna ground layer vegetation by topsoil and hay transfer. **Restoration Ecology**, v. 26, p. 73-81, 2018. DOI: 10.1111/rec.12534.

PINHEIRO, H. S. K.; ANJOS, L. H. C.; CHAGAS, C. S. **Mapeamento Digital de Solos por Redes Neurais Artificiais** - Estudo de caso da bacia hidrográfica do rio Guapi-Macacu. 1. ed. Saarbrucken: Novas Edições Acadêmicas - NEA, 2014. v. 1. 175p.

PINTO, S. R.; MELO, F.; TABARELLI, M.; PADOVESI, A.; MESQUITA, C. A.; SCARAMUZZA, C. M.; CASTRO, P.; CARRASCOSA, H.; CALMON, M.; RODRIGUES, R.; CÉSAR, R. G.; BRANCALION, P. H. S. Governing and delivering a biome-wide restoration initiative: the case of Atlantic Forest restoration pact in Brazil. **Forests**, v. 5, n. 9, p. 2212-2229, 2014. DOI: 10.3390/f5092212.

PIOTROWSKI, J. S.; LEKBERG, Y.; HERNER, M. J.; RAMSEY, P. W.; RILLIG, M. C. Dynamics of mycorrhizae during development of riparian forests along an unregulated river. **Ecography**, v. 31, n. 2, p. 245-253, 2008. DOI: 10.1111/j.0906-7590.2008.5262.x.

PIVETA, G.; MENEZES, V. O.; PEDROSO, D. C.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E.; WIELEWICKI, A. P. Superação de dormência na qualidade de sementes e mudas: influência na produção de *Senna multijuga* (L.C Rich.) Irwin & Barneby. **Acta Amazônica**, v. 40, n. 2, p. 281-288, 2010. DOI: 10.1590/S0044-59672010000200006.

PLASSARD, C.; BECQUER, A.; GARCIA, K. Phosphorus transport in mycorrhiza: how far are we? **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 9, p. 794-801, 2019. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.06.004.

POOLE, P.; RAMACHANDRAN, V.; TERPOLILLI, J. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 291-303, 2018. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.171.

PULLEMAN, M.; CREAMER, R.; HAMER, U.; HELDER, J.; PELOSI, C.; PÉRÈS, G.; RUTGERS, M. Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services - an overview of European approaches. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 4, n. 5, p.529-538, 2012. DOI: 10.1016/j.cosust.2012.10.009.

PÜSCHEL, D.; JANOUŠKOVÁ, M.; VOŘÍŠKOVÁ, A.; GRYNDLEROVÁ, H.; VOSÁTKA, M.; JANSA, J. Arbuscular mycorrhiza stimulates biological nitrogen fixation in two *Medicago* spp. through improved phosphorus acquisition. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 390, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.00390.

RAHMAN, M. H.; KHATUN, S.; ALI, S. R.; YASMIN, S.; KAMRUZZAMAN, M.; RASHID, M. H. Morpho-physiological diversity of root nodule rhizobia from Mimosa (*Mimosa pudica* L.) and water Mimosa (*Neptunia oleracea* L.). **Journal of Bacteriology and Mycology**, v. 5, n. 1, p. 1061, 2018.

RAJKUMAR, M.; AE, N.; PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, 142-149, 2010. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.12.002.

RAZA, W.; LING, N.; YANG, L.; HUANG, Q.; SHEN, Q. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016. DOI: 10.1038/srep24856.

REGUA – RESERVA ECOLÓGICA DE GUAPIAÇU. **Conservando a Mata Atlântica no Brasil**. Disponível em: <https://regua.org.br>. Acesso em: 29 set. 2021.

REIS, A.; BECHARA, F. C.; TRES, D. R.; TRENTIN, B. E. Nucleation: Biocentric conception for the ecological restoration. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 2, p. 509-519, 2014. DOI: 10.5902/1980509814591.

REMIGI, P.; ZHU, J.; YOUNG, J. P. W.; MASSON-BOIVIN, C. Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 1, p. 63-75, 2016. DOI: 10.1016/j.tim.2015.10.007.

REZENDE, C. L.; SCARANO, F. R.; ASSAD, E. D.; JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; STRASSBURG, B. B. N.; TABARELLI, M.; FONSECA, G. A.; MITTERMEIER, R. A. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. **Perspectives in ecology and conservation**, v. 16, n. 4, p. 208-214, 2018. DOI: 10.1016/j.pecon.2018.10.002.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed?

Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009. DOI: 10.1016/j.biocon.2009.02.021.

RIO DE JANEIRO. SECRETARIA ESTADUAL DO AMBIENTE. **O estado do ambiente: indicadores ambientais do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: SEA; INEA, 2011. 160 p.

RODRIGUES, L. A.; BARROSO, D. G.; MARTINS, M. A.; MENDONÇA, A. V. R. Revegetação de áreas degradadas pela extração de argila no Norte do estado do Rio de Janeiro. **Revista Perspectivas**, v. 5, n. 10, p. 88-105, 2006.

RODRIGUES, R. R.; BRANCALION, P. H. S.; ISERNHAGEN, I. (Orgs.) **Pacto para a restauração ecológica da Mata Atlântica**: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal. São Paulo: Instituto BioAtlântica, 2009.

RODRIGUES, J. L. M.; PELLIZARI, V. H.; MUELLER, R.; BAEK, K.; JESUS, E. C.; PAULA, F. S.; MIRZA, B.; HAMAQUI JR., G. S.; TSAI, S. M.; FEIGL, B.; TIEDJE, J. M.; BOHANNAN, B. J. M.; NÜSSLEIN, K. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 3, p. 988-993, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1220608110.

ROTH, R.; PASZKOWSKI, U. Plant carbon nourishment of arbuscular mycorrhizal fungi. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 39, p. 50-56, 2017. DOI: 10.1016/j.pbi.2017.05.008.

RUIZ, H. A. Incremento da exatidão da análise granulométrica do solo por meio da coleta da suspensão (silte + argila). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p. 297-300, 2005.

SAHA, M.; SARKAR, S.; SARKAR, B.; SHARMA, B. K.; BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 3984-3999, 2016. DOI: 10.1007/s11356-015-4294-0.

SALEEM, M.; HU, J.; JOUSSET, A. more than the sum of its parts: microbiome biodiversity as a driver of plant growth and soil health. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 50, n. 1, 2019. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-110617-062605.

SÁNCHEZ-CAÑIZARES, C.; JORRÍN, B.; POOLE, P. S.; TKACZ, A. Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 188-196, 2017. DOI: 10.1016/j.mib.2017.07.001.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 551, n. 111, p. 743-767, 2013. DOI: 10.1093/aob/mct048.

SANTOS, E. S. P. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e de rizóbios em um fragmento de floresta atlântica em regeneração em Pernambuco**. 2006. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SANTOS, R.; SCORIZA, R.; FERREIRA, J. Avaliação de inoculante de FMA nativo de solo de diferentes coberturas florestais. **Encyclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, 2014.

SANTOS, R. S.; SCORIZA, R. N.; SILVA, E. M. R.; SAGGIN JÚNIOR, O. J. S. Selection of mycorrhizal fungi for the initial growth of *Albizia polyccephala*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 2, p. 98-103, 2016. DOI: 10.5039/agraria.v11i2a5362.

SANTOS, T. A.; RESENDE, A. S.; SILVA, F. F.; MORAES, L. F. D.; CHAER, G. M. Growth of tree species in coexistence with palisade grass *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf cv. Marandu. **Planta Daninha**, v. 37, 2019. DOI: 10.1590/s0100-83582019370100113.

SBRANA, C.; TURRINI, A.; GIOVANNETTI, M. The crosstalk between plants and their arbuscular mycorrhizal symbionts: a mycocentric view. In: Seckbach, D. (Ed.), **Biocommunication: Sign-mediated Interactions Between Cells and Organisms**, 2017. p. 285–308.

SCARANO, F. R.; CEOTTO, P. Brazilian Atlantic Forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 9, p. 2319-2331, 2015. DOI: 10.1007/s10531-015-0972-y.

SHTARK, O.; KUMARI, S.; SINGH, R.; SULIMA, A.; AKHTEMOVA, G.; ZHUKOV, V.; SHCHERBAKOV, A.; SHCHERBAKOVA, E.; ADHOLEYA, A.; BORISOV, A. Advances and prospects for development of multi-component microbial inoculant for legumes. **Legume Perspectives**, v. 8, p. 40-44, 2015. DOI: 10.13140/RG.2.1.1634.0247.

SCHENCK, N. C.; PEREZ, Y. **A manual for identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi**. 2 ed. Gainesville: University of Florida, 1988. 241 p.

SCHMIDT, K. T.; MALTZ, M.; TA, P.; KHALILI, B.; WEIHE, C.; PHILLIPS, M.; ARONSON, E.; LULOW, M.; LONG, J.; KIMBALL, S. Identifying mechanisms for successful ecological restoration with salvaged topsoil in coastal sage scrub communities. **Diversity**, v. 12, n. 4, p.150, 2020.

SCHLAEPPPI, K.; BULGARELLI, D. The plant microbiome at work. Molecular **Plant-Microbe Interactions**, v. 28, p. 212-217, 2015. DOI: 10.1094/MPMI-10-14-0334-FI.

SCOTTI, M. R.; CORRÊA, E. J. A. Growth and litter decomposition of woody species inoculated with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi in Semiarid Brazil. **Annals of Forest Science**, v. 61, n. 1, p. 87-95, 2004. DOI: 10.1051/forest:2003088.

SENE, G.; SAMBA-MBAYE, R.; THIAO, M.; KHASA, D.; KANE, A.; MANGA, A.; MBAYE, M. S.; SYLLA, S. N. The abundance and diversity of legume-nodulating rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungal communities in soil samples from deforested and man-made forest systems in a semiarid Sahel region in Senegal. **European Journal of Soil Biology**, v. 52, p. 30–40, 2012. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2012.05.005.

SER - SOCIETY FOR ECOLOGICAL RESTORATION INTERNATIONAL & POLICY WORKING GROUP. **The SER primer on ecological restoration**. 2004. Disponível em: <<http://www.ser.org>>. Acesso em: 01 jan. 2020.

SILVA, C. F.; PEREIRA, M. G.; DOS SANTOS, V. L.; MIGUEL, D. L.; SILVA, E. M. R. Arbuscular mycorrhizal fungi: Composition, length extraradical mycelium and glomalin in

areas of Atlantic Forest, Rio de Janeiro. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 2, p. 419-433, 2016. DOI: 10.5902/1980509822743.

SILVA, C. F.; CÂMARA, R.; PEREIRA, M. G.; SANTOS, G. L.; AGUIRAR, G.; FAGUNDES, H. D. S.; SILVA, E. M. R. Arbuscular mycorrhizal fungal communities and soil organic matter in pasture and analog agroforestry systems. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.16, n.2, e8942, 2021. DOI: 10.5039/agraria.v16i2a8942.

SILVA, F. F. **Uso de *topsoil* como fonte de inóculo de microrganismos simbiontes para leguminosas florestais usadas na recuperação de áreas degradadas na Caatinga**. 2018. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais) – Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SILVA, F. F. **Avaliação da associação simbiótica entre bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos micorrízicos arbusculares e leguminosas arbóreas nativas da Caatinga**. 2022. 123 p. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Conservação) – Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé.

SILVA, M. M.; ATAÍDE, G. M.; RIBEIRO, L. P.; CATARINA, A.; CUNHA, M. C.; SILVA, L. B. J. Superação da dormência e germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* (Fabaceae) em diferentes temperaturas. In: Conquista. **Anais...** Vitória da Conquista: UESB, 2013. p. 1214-1219.

SINGH, D.; GHOSH, P.; KUMAR, J.; KUMAR, A. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs): functions and benefits. In: SINGH, D.P.; GUPTA, V.K.; PRABHA, R. **Microbial interventions in agriculture and environment**. Singapura: Springer, 2019. p. 205-227. DOI: 10.1007/978-981-13-8383-0_7.

SIZONENKO, T. A.; DUBROVSKIY, Y. A.; NOVAKOVSKIY, A. B. Changes in mycorrhizal status and type in plant communities along altitudinal and ecological gradients—a case study from the Northern Urals (Russia). **Mycorrhiza**, 2020. DOI: 10.1007/s00572-020-00961-z.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**, 3 ed. London: Academic Press, 2018. 800 p.

SMITH, P.; COTRUFO, M. F.; RUMPEL, C.; PAUSTIAN, K.; KUIKMAN, P. J.; ELLIOTT, J. A.; MCDOWELL, R.; GRIFFITHS, R. I.; ASAKAWA, S.; BUSTAMANTE, M.; HOUSE, J. I.; SOBOCKÁ, J.; HARPER, R.; PAN, G.; WEST, P. C.; GERBER, J. S.; CLARK, J. M.; ADHYA, T.; SCHOLES, R. J.; SCHOLES, M. C. Biogeochemical cycles and biodiversity as key drivers of ecosystem services provided by soils. **SOIL**, v. 1, n. 1, p. 665–685, 2015. DOI: 10.5194/soil-1-665-2015.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume-*Rhizobium* technology**. Paia, Maui: University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, College of Tropical Agriculture and Human Resources. p. 365, 1985.

SONG, W.; KIM, M.; TRIPATHI, B. M.; KIM, H.; ADAMS, J. M. Predictable communities of soil bacteria in relation to nutrient concentration and successional stage in a laboratory culture experiment. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 1740-1753, 2016. DOI: 10.1111/1462-2920.12879.

SOUZA, C. A. **Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas**. 2010. 49 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SOUZA, M. P.; CHAER, G. M.; GONÇALVES, F. L. A. Efeito da transposição de *topsoil* e *mulching* de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore na revegetação de área degradada na Caatinga. **Scientia Forestalis**, v. 50, p. 1, 2022. DOI: 10.18671/scifor.v50.39.

SPATAFORA, J. W.; CHANG, Y.; BENNY, G. L.; LAZARUS, K.; SMITH, M. E.; BERBEE, M. L.; BONITO, G.; CORRADI, N.; GRIGORIEV, I.; GRYGGANSKYI, A.; JAMES, T. Y.; O'DONNELL, K.; ROBERSON, R. W.; TAYLOR, T. N.; UEHLING, J.; VILGALYS, R.; WHITE, M. M. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. **Mycologia**, v. 108, n. 5, p. 1028-1046, 2016. DOI: 10.3852/16-042.

SHTARK, O.; KUMARI, S.; SINGH, R.; SULIMA, A.; AKHTEMOVA, G.; ZHUKOV, V.; SHCHERBAKOV, A.; SHCHERBAKOVA, E.; ADHOLEYA, A.; BORISOV, A. Advances and prospects for development of multi-component microbial inoculant for legumes. **Legume Perspectives**, v. 8, p. 40-44, 2015. DOI: 10.13140 / RG.2.1.1634.0247.

STUCKE, N.; FLÖSER, B. M.; WEYRICH, T.; TUCZEK, F. Nitrogen fixation catalyzed by transition metal complexes: recent developments. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2018, n. 12, p. 1337-1355, 2018. DOI: 10.1002/ejic.201701326.

STÜRMER, S. L.; KLAUBERG FILHO, O.; QUEIROZ, M. H. D.; MENDONÇA, M. M. D. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in soils of early stages of a secondary succession of Atlantic Forest in South Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 513-521, 2006. DOI: 10.1590/S0102-33062006000300002.

SUN, Y.; LUO, C.; JIANG, L.; SONG, M.; ZHANG, D.; LI, J.; OSTLE, N. J.; ZHANG, G. Land-use changes alter soil bacterial composition and diversity in tropical forest soil in China. **Science of the Total Environment**, v. 712, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.136526.

SWARNALAKSHMI, K.; PRASANNA, R.; KUMAR, A.; PATTNAIK, S.; CHAKRAVARTY, K.; SHIVAY, Y. S.; SINGH, R.; SAXENA, A. K. Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilmed biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat. **European Journal of Soil Biology**, v. 55, p. 107-116, 2013. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2012.12.008.

SYMANCZIK, S.; COURTY, P. E.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; AL-YAHYA'EI, M. N. Impact of water regimes on an experimental community of four desert arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) species, as affected by the introduction of a non-native AMF species. **Mycorrhiza**, v. 25, n. 8, p. 639-647, 2015. DOI: 10.1007/s00572-015-0638-3.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. Manual de métodos de análise de solo. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 574 p.

TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Growth and nutritional status of Brazilian wood species *Cedrela fissilis* and *Anadenanthera peregrina* in bauxite spoil in response to arbuscular

mycorrhizal inoculation and substrate amendment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 257-265, 2000.

ULLOA-OGAZ, A. L.; MUÑOZ-CASTELLANOS, L. N.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V. Biocontrol of phytopathogens: antibiotic production as mechanism of control. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **The Battle Against Microbial Pathogens**: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs. Badajoz: Formatex, 2015. p. 305-309.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; BARDGETT, R. D.; VAN STRAALEN, N. M. 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. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; MARTIN, F. M.; SELOSSE, M. A.; SANDERS, I. R. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. **New phytologist**, v. 205, n. 4, p. 1406-1423, 2015. DOI: 10.1111/nph.13288.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; DE BRUIN, S.; LUCKERHOFF, L.; VAN LOGTESTIJN, R. S.; SCHLAEPPPI, K. A widespread plant-fungal-bacterial symbiosis promotes plant biodiversity, plant nutrition and seedling recruitment. **The ISME Journal**, v. 10, n. 2, p. 389-399, 2016. DOI: 10.1038/ismej.2015.120.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A; HARTMANN, M. Networking in the plant microbiome. **PLOS Biology**, v. 14, n. 2, 2016. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002378.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 703-707, 1987.

VANDENKOORNHUYSE, P.; QUAISER, A.; DUHAMEL, M.; LE VAN, A.; DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1196-1206, 2015. DOI: 10.1111/nph.13312.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v. 255, p. 571-586, 2003. DOI: 10.1023/a:1026037216893.

VILELA, L. A. F.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; PAULINO, H. B.; SIQUEIRA, J. O.; SANTOS, V. L. S.; CARNEIRO, M. A. C. Arbuscular mycorrhizal fungus in microbial activity and Aggregation of a Cerrado Oxisol in crop sequence. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n. 1, p.34-42, 2014. DOI: 10.1590/S1413-70542014000100004.

WAGG, C.; BENDER, S. F.; WIDMER, F.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n.14, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1320054111.

WILLE, L.; MESSMER, M. M.; STUDER, B.; HOHMANN, P. Insights to plant–microbe interactions provide opportunities to improve resistance breeding against root diseases in grain legumes. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, n. 1, p. 20-40, 2019. DOI: 10.1111/pce.13214.

WINAGRASKI, E.; KASCHUK, G.; MONTEIRO, P. H. R.; AUER, C. G.; HIGA, A. R. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in forest ecosystems of Brazil: A review. **Cerne**, v. 25, p. 25-35, 2019. DOI: 10.1590/01047760201925012592.

WUBS, E. R. J. D; VAN DER PUTTEN, W. H.; BOSCH, M.; BEZEMER, T. M. Soil inoculation steers restoration of terrestrial ecosystems. **Nature Plants**, v. 2, p. 16107, 2016. DOI: 10.1038/nplants.2016.107.

XU, Z.; YU, G.; ZHANG, X.; HE, N.; WANG, Q.; WANG, S.; XU, X.; WANG, R.; ZHAO, N. Biogeographical patterns of soil microbial community as influenced by soil characteristics and climate across Chinese forest biomes. **Applied Soil Ecology**, v. 124, p. 298-305, 2018. DOI: 10.1016/j.apsoil.2017.11.019.

YANG, J.; KLOEPPE, J. W.; RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 1-4, 2009. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.10.004.

ZANGARO, W.; ASSIS, R. L.; MOTTA, A. M.; ROSTIROLA, L. V.; SOUZA, P. B.; GONÇALVES, M. C.; ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M. A. Arbuscular mycorrhizal association and fine root traits changes during succession in southern Brazil. **Mycorrhiza**, v. 19, p. 37-45, 2008.

ZANGARO, W.; MOREIRA, M. Micorrizas arbusculares nos biomas Floresta Atlântica e Floresta de Araucária. In: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. (Eds.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**, p. 279-310, 2010.

ZANGARO, W.; ANSANELO, A. P.; LECANO, L. E. A. M.; ALVES, R. C.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A. Infection intensity, spore density and inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi decrease during secondary succession in tropical Brazilian ecosystems. **Journal of Tropical Ecology**, v. 28, p. 453-462, 2012. DOI: 10.1017/S0266467412000399.

ZATELLI, K. S. **Transposição de topsoil e serapilheira para restauração ecológica no Parque Nacional da Serra do Itajaí, SC**. 2017. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ZHANG, W.; LI, X. G.; SUN, K.; TANG, M. J.; XU, F. J.; ZHANG, M.; DAI, C. C. Mycelial network-mediated rhizobial dispersal enhances legume nodulation. **The ISME Journal**, v. 14, n. 4, p. 1015-1029, 2020. DOI: 10.1038/s41396-020-0587-5.

ZHOU, Y.; NING, L.; BAI, X. Spatial and temporal changes of human disturbances and their effects on landscape patterns in the Jiangsu coastal zone, China. **Ecological Indicators**, v. 93, p.111-122, 2018. DOI: 10.1016/j.ecolind.2018.04.076.

14 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do Capítulo I evidenciam a potencialidade da técnica de adição de um pequeno volume de *topsoil* florestal para uso na produção de mudas de espécies arbóreas nativas. A microbiota existente no *topsoil* adicionado aos vasos propiciou maiores ganhos no crescimento das mudas em casa de vegetação.

Novos estudos poderão elucidar se o *topsoil* apresenta eficiência semelhante a inoculantes de estirpes selecionadas de bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares. Caso evidenciado o sucesso da técnica nessas condições, essa poderá ser uma alternativa simples e econômica a ser recomendada para a produção de mudas de qualidade em viveiros próximos aos locais de plantio, aumentando as chances de sucesso no estabelecimento e crescimento das mudas em projetos de reflorestamento.

Contudo, constatou-se no capítulo II que o emprego da técnica em berços de plantio não foi satisfatório para incrementar a sobrevivência e o crescimento das espécies florestais em condições de campo, apresentando efeito similar ao tratamento controle (*topsoil* esterilizado). Estudos devem ser realizados para adequar a dose aplicada em condições de campo, visando o fornecimento satisfatório de microrganismos compatíveis com as espécies vegetais e baixos custos de coleta, transporte e aplicação do material.

O presente trabalho de campo não esgota o assunto, mas serve como base para futuras pesquisas complementares com *topsoils* obtidos de diferentes florestas, a fim de se obter conclusões mais robustas em condições experimentais heterogêneas. Sugere-se a realização de estudos que avaliem qual época e estágio sucessional da floresta deva ser coletado o *topsoil*, visando ofertar maior diversidade biótica e funcional da microbiota. Além disso, estudos de campo que utilizem mudas previamente colonizadas pelos microrganismos nativos do *topsoil*, com o intuito de restabelecer os processos ecológicos no sistema solo-planta, com maior chance inicial de ocupação de nicho dessa microbiota.

ANEXO

Solução nutritiva de Norris para espécies arbóreas florestais, modificada por Guzmán & Döbereiner (1968) para metade da concentração de sal:

Quantidade de reagentes para o preparo de 1 L de solução de Norris

Reagente	Massa (g)	Concentração (mmol/L)
KCl	0,149	20
K ₂ HPO ₄	0,05	0,3
KH ₂ PO ₄	0,1	0,7
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,344	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,493	2
FeEDTA	0,033	0,09
Ácido cítrico	0,005	0,03

Adicionar 0,5 mL da solução estoque de micronutrientes e completar o volume para 1 L de água destilada.

Solução de micronutrientes

Reagente	Massa (g)	Concentração (mmol/L)
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,004	0,03
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,011	0,04
MnSO ₄ .2H ₂ O	0,01	0,05
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,0005	0,0004
H ₃ BO ₃	0,036	0,58

Completar o volume da solução de micronutrientes (estoque) para 1 L de água destilada.