

Estratégias biotecnológicas inovadoras para melhorar a tolerância de árvores à seca e a diversidade microbiana visando à restauração florestal

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Instituição: Universidade Estadual de Londrina

1 – Introdução:

O relatório especial apresentado em Genebra pelo Painel Intergovernamental sobre Alterações Climáticas (IPCC) indica um aumento na temperatura global e mudanças nos padrões de precipitação de chuvas, sinalizando a importância do combate ao desmatamento, recuperação florestal, degradação do solo e mudança nas práticas agrícolas (IPCC, 2019).

As alterações climáticas afetam o funcionamento de ecossistemas, eventos drásticos de seca por exemplo, promovem impactos negativos na Ecofisiologia das plantas como: a redução na condutividade hidráulica do xilema, condutância estomática e na fotossíntese, diminuindo a produção e o acúmulo de carboidratos e conseqüentemente o crescimento da planta (BRODRIBB, T. et al. 2020).

A composição e o funcionamento das comunidades microbianas presentes no solo, também são afetadas por períodos de seca e, portanto, influenciam vários ciclos biogeoquímicos ancorados neste ambiente (BARDGETT; CARUSO, 2020). Políticas climáticas vistas no Acordo de Mudança Climática de Paris vem sendo trabalhadas com objetivo de diminuir a emissão dos gases de efeito estufa e o aumento da temperatura da superfície terrestre.

Neste sentido, a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) destaca a restauração florestal como uma solução crucial baseada na natureza para mitigar as mudanças climáticas em curso, pois influencia o ciclo da água e aumenta os sumidouros de carbono (onde as absorções de dióxido de carbono são maiores do que as emissões), podendo reduzir os níveis de gases de efeito estufa na atmosfera.

A restauração florestal com árvores nativas é uma alternativa importante para melhorar o funcionamento de ecossistemas florestais e a valorização da biodiversidade, resultando em ecossistemas, economias e sociedades resilientes para o desafio de combate às mudanças do clima. No entanto, as iniciativas de restauração florestal com plantio de mudas nativas enfrentam várias restrições socioeconômicas, que incluem desde os altos

custos de sua implementação até a carência de tecnologias e informações que subsidiem estas iniciativas (MELO et al. 2013a, 2013b; BRANCALION et al. 2019). Os custos do plantio de árvores nativas em projetos de restauração são estimados na faixa de US \$ 2.000-3.000 por hectare no Brasil, e em torno de € 2.000-5.500 na Alemanha e na França (BRANCALION et al. 2019). Este custo elevado está relacionado a alta mortalidade de mudas de árvores no campo e a necessidade de replantio, uma vez que o estabelecimento das mudas consiste no estágio mais vulnerável às adversidades climáticas que ocorrem durante o período de restauração florestal (NOLAN et al. 2018).

De modo geral, os locais de restauração possuem baixa disponibilidade de água, solo compactado e baixa cobertura do dossel, o que favorece a erosão e dificulta a infiltração da água no solo e sua absorção pelas raízes, aumentando a evapotranspiração. As mudas arbóreas são particularmente sensíveis à seca, principalmente por causa do tamanho limitado de seu sistema radicular, e muitos estudos demonstram o impacto negativo da limitação de água no desempenho de mudas de espécies de árvores tropicais, mediterrâneas e temperadas (PRETZSCH et al. 2014). Espera-se que esse problema se intensifique devido às mudanças climáticas, dificultando ainda mais o sucesso dos esforços de restauração florestal (NOLAN et al. 2018).

Além disso, a demanda crescente para o uso intensivo do solo para a produção agrícola de alimentos tende a destinar áreas com solos mais degradados para os eventos de restauração, o que também afetaria negativamente o estabelecimento de mudas arbóreas nestes ambientes (FORD; HILLERISLAMBERS, 2020). De maneira geral, existe uma demanda urgente por estudos voltados ao entendimento da ecofisiologia de mudas arbóreas neotropicals nativas para incrementar as taxas de estabelecimento destas espécies para fins de restauração florestal.

Mudas de árvores podem desenvolver respostas morfofisiológicas que permitem a aclimatação à seca, como à diminuição da transpiração (por exemplo, área foliar específica baixa, fechamento estomático), para melhor absorção de água (por exemplo, alocação de biomassa para enraizar em detrimento do rebento, alterações morfológicas em sistema radicular), à proteção contra o estresse oxidativo (por exemplo, indução de mecanismos antioxidantes) e à alta resistência à cavitação (por exemplo, diâmetro dos vasos do xilema pequeno) (NOLAN et al. 2018; BRODRIBB et al. 2020).

Apesar das plantas desenvolverem suas estratégias de adaptação para sua elas também necessitam da parceria microbiana para juntos sobreviver e se defender das adversidades da natureza de Vries et al. 2020. A complexa interação entre plantas e

microrganismos indica a necessidade de explorar sua interdependência para atingir uma alta taxa de sobrevivência de mudas de árvores em um local de restauração.

Sendo assim, a criação de estratégias que favoreçam a interação das plantas com a microbiota benéfica surge como uma solução de base natural que poderia permitir a produção de mudas de árvores de alta qualidade com baixos custos econômicos, ambientais e sociais, favorecendo seu estabelecimento em áreas de restauração. O trabalho visa avaliar, em floresta atlântica sazonal, respostas das árvores e da microbiota do solo ao estresse hídrico, o que forneceria informações importantes sobre o funcionamento do ecossistema. A maioria dos estudos tem foco em respostas acima do solo, e a compreensão de como os extremos do clima afetam as comunidades microbianas do solo ainda é limitada (BARDGETT; CARUSO, 2020). Além disso, apesar da sua enorme biodiversidade a Mata Atlântica tem recebido pouca atenção sobre os impactos das mudanças climáticas em seus ecossistemas.

Soluções baseadas na natureza visam explorar a diversidade microbiana do solo da floresta atlântica para selecionar consórcios de PAM adequados para a produção de mudas de alta qualidade que tenham maior tolerância à seca para otimizar a restauração do ecossistema. Apesar dos PAMs terem sido amplamente usados para desencadear a tolerância ao estresse e o crescimento de espécies agrícolas, poucos estudos se concentraram em seu uso para induzir a tolerância à seca em mudas de árvores usadas para restauração (TIEPO et al. 2018). Além disso, a maioria dos estudos com árvores explora a interação simbiótica entre rizóbio e plantas leguminosas ou a associação árvore-fungo micorrízico, e o estudo de árvores como holobionte ainda são escassos.

Este estudo visa explorar as interações planta-micróbio em ecossistemas florestais que enfrentam o aumento do estresse hídrico devido às mudanças climáticas, buscando compreender como as árvores e a microbiota do solo respondem à seca, um importante componente das mudanças climáticas, permitindo o desenvolvimento de soluções baseadas na natureza com auxílio da biotecnologia para melhorar as iniciativas de restauração florestal.

2 – Justificativa:

As projeções climáticas para este século indicam uma maior ocorrência de eventos extremos, como secas e temperaturas elevadas. Eventos de seca possuem grande influência na dinâmica funcional de ecossistemas, em particular os ecossistemas agrícolas

e florestais, além de afetar a diversidade e atividade de microrganismos dos solos. Os efeitos negativos da mudança climática sobre o funcionamento de ecossistemas implicam em um grande desafio para a atividade de recuperação florestal, devido há carência de informações sobre o funcionamento de ecossistemas tropicais e sobre técnicas de manejo que possam mitigar estes efeitos. Neste sentido, um dos principais problemas relacionados com a ineficiência dos esforços de recuperação de ecossistemas está na elevada mortalidade de mudas arbóreas após seu transplante ao campo, visto que em locais de restauração há limitação na disponibilidade de água para as plantas, compactação do solo e elevada exposição à luz solar. As mudas arbóreas utilizadas em trabalhos de recuperação de ecossistemas são particularmente sensíveis à seca, principalmente por causa de seu sistema radicular limitado, e este problema deve ser intensificado devido às mudanças climáticas. Por outro lado, ambientes tropicais como os encontrados no Brasil são privilegiados em sua biodiversidade, embora a biodiversidade e funcionalidade da microbiota existente nos diferentes biomas brasileiros ainda é pouco explorada e conhecida. Considerando a presença ubíqua da associação de microrganismos colonizando diferentes órgãos e tecidos de diferentes espécies vegetais, e a potencialidade destas associações elevarem a resiliência de macro e microrganismos quando expostos a condições adversas, é possível visualizar que o maior conhecimento da funcionalidade e biodiversidade microbiana existente em ambientes florestais pode levar ao desenvolvimento de bioprodutos e estratégias de manejo que favoreçam a obtenção de material vegetal de elevada qualidade produtiva, fisiológica e fitossanitária. O presente projeto busca desenvolver ações para ampliar o conhecimento da influência de eventos de seca sobre a funcionalidade de ecossistemas florestais conservados, e também sobre o impacto do uso de bioinsumos na fisiologia e desenvolvimento de mudas arbóreas neotropicais e no respectivo microbioma. A avaliação das respostas ao estresse hídrico em espécies de árvores representativas e comunidades microbianas de grupos funcionais distintos de diferentes ecossistemas florestais tropicais podem levar à identificação de padrões que possibilitem prever o impacto das mudanças climáticas no funcionamento destes ecossistemas. Em adição, o acompanhamento do impacto do uso de bioinsumos sobre o processo de formação de mudas arbóreas possibilita definir estratégias para mitigar os efeitos negativos das mudanças climáticas no estabelecimento destas mudas a campo.

3 – Objetivo:

Avaliar o funcionamento do ecossistema do solo de Mata Atlântica sob impacto do stress hídrico em condições naturais.

4 - Material e Métodos:

4.1. Coleta e amostragem do solo em área florestal

A coleta de solos será feita em dois locais de Mata Atlântica no Estado do Paraná: Parque Estadual Mata dos Godoy e Fazenda Alvorada. Ambos os locais correspondem a Florestas Estacionais Semidecíduais, com solo do tipo Ferralsol Ródico composto por cerca de 80% de argila originada de rocha basáltica. No entanto, Alvorada apresenta solo raso, maior perturbação antropogênica e menor precipitação anual, resultando em eventos de seca mais severos do que na Mata dos Godoy.

As coletas de solo serão feitas em três anos consecutivos, no final do período de seca (agosto-setembro) e no início do período chuvoso (setembro-outubro). Para amostragem cinco transectos de 60 m serão estabelecidos aleatoriamente em cada área para coleta de amostras de solo a granel. Em cada transecto, 12 subamostras de solo (coletadas a cada 5 m) serão agrupadas como amostras compostas para favorecer as comparações entre locais e diminuir a diversidade química e biológica intra-local (Rondina et al. 2019).

Cada subamostras terá um volume de 19cm³ de solo, coletados através de sondas de cano pvc com 100mm de comprimento e 50mm de diâmetro. As sondas de amostragem são descartáveis e devem ser desinfetadas antes do uso (70% de etanol, 2% de cloreto, etc). Após a coleta a sonda contendo o volume de solo será fechada e armazenada em coolers com gelo e encaminhadas até ao laboratório.

As amostras direcionadas para as análises químicas e biológicas serão secas, peneiradas (2,0 mm) e armazenadas como terra fina seca ao ar (TFSA) em local fresco e ao abrigo da luz até o momento das análises.

4.2. Caracterização química do solo em área florestal

As amostras de solo serão caracterizadas quanto ao pH, condutividade elétrica, concentração de acidez trocável (H + Al), alumínio (Al), cátions principais (K, Ca, Mg e Na), fósforo (P), carbono total, carbono orgânico, nitrogênio total e conteúdo de matéria orgânica de acordo com métodos padrão (PAVAN, et al. 1992). A partir dos valores

acima, a razão carbono para nitrogênio (C: N), saturação de bases (V), capacidade de troca catiônica (CEC) e a soma de bases (SB) serão calculadas.

4.3. Caracterização funcional do solo em área florestal

4.3.1. Carbono da biomassa microbiana

As amostras compostas coletadas na área experimental serão submetidas a determinação do carbono da biomassa microbiana (C-BMS) seguindo o método de fumigação-extração (VANICE et al., 1987). As determinações serão realizadas com padronização do teor de umidade para 55%, da capacidade de campo.

As determinações serão realizadas com padronização do teor de umidade para 55%, da capacidade de campo. Estas amostras serão mantidas sob incubação estacionária a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias, previamente à realização do processo de extração dos compostos lábeis de carbono pelo método de fumigação-extração (GONÇALVES et al, 2002). Os teores de carbono lábil dos extratos serão obtidos colorimetricamente em leitura no espectrofotômetro a 495nm (absorbância) após oxidação com Mn^{3+} (BARTLETT; ROSS, 1988).

A partir destes resultados, serão calculados os valores de biomassa microbiana do solo (C-BMS), pelas diferenças entre o carbono lábil das amostras fumigadas subtraído do valor de carbono lábil das amostras não fumigadas: $\text{C-BMS (mg C kg}^{-1}\text{ amostra)} = \text{FC/Kc}$, onde (FC) corresponde à diferença entre a quantidade de C (mg kg⁻¹) recuperada no extrato da amostra fumigada e a recuperada da amostra não fumigada, e (Kc) corresponde ao fator de correlação 0,33 utilizado para expressar a fração de C-BMS recuperada (SPARLING; WEST, 1988).

4.3.2. Nitrogênio da biomassa microbiana

O nitrogênio da biomassa microbiana (N-BMS) será determinada a partir dos extratos fumigado e não fumigado das amostras de solo como descrito no item anterior. A medida do nitrogênio será feita com auxílio de curva de calibração produzida com concentrações crescentes de sulfato de amônio (0; 2ppm; 4ppm 8ppm), os teores de nitrogênio serão obtidos por Colorimetria em leitura no espectrofotômetro, no comprimento de onda 630nm e os resultados serão expressos em mg N kg⁻¹ solo.

Os teores de nitrogênio da biomassa microbiana (N-BMS) serão obtidos pela relação da quantidade de nitrogênio determinada nas amostras fumigadas (N-SF)

subtraído pela quantidade de nitrogênio presente nas amostras não fumigadas (N-NF): N-BMS (mg kg⁻¹) = (N-SF - N-NF)

4.3.3. Respiração Basal

As determinações da respiração basal (RBS) e o quociente metabólico (qCO₂) das amostras de solo serão obtidas segundo Silva, Azevedo e De-Polli (2007). Previamente às determinações, as amostras serão condicionadas a 50% de umidade a 28 ± 2°C por 7 dias como descrito para a determinação de C-BMS. O procedimento analítico será realizado em triplicata para cada amostra composta, e as determinações da RBS e qCO₂ serão obtidas com auxílio das seguintes fórmulas:

RBS (mg C-CO₂ kg⁻¹ amostra hora⁻¹) = (((V_b - V_a) × M × 6 × 1000)/P_s)/T, sendo (V_b) o volume (mL) de HCl gasto na titulação do controle, (V_a) o volume (mL) de HCl gasto na titulação da amostra, (M) a molaridade exata do HCl, (O_s) a massa seca (g) amostra, e (T) o tempo (h) de incubação das amostras.

4.3.4. Atividade enzimática do solo em área de floresta

Serão determinadas atividades das enzimas: β-glucosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e desidrogenase pela metodologia de Mendes, et al. 2019, protease, urease e celulase pela metodologia de Alef e Nannipieiri, 1995. Este método baseia-se na determinação colorimétrica do p-nitrofenol (coloração amarela) formado após a adição de substratos incolores específicos para cada enzima avaliada. Para cada amostra de solo, coletada no campo, foram efetuadas três repetições analíticas no laboratório. A atividade enzimática do solo foi expressa em µg p-nitrofenol g⁻¹ de solo h⁻¹

Perfis fisiológicos em nível de comunidade (CLPP) serão obtidos usando Biolog EcoPlates (placas de 96 poços consistindo em três réplicas de 31 diferentes fontes de carbono e um controle de água; Biolog Inc, Hayward, CA, EUA) serão analisadas. Brevemente, suspensões microbianas serão preparadas a partir de 1 g de solo rizosférico fresco em 10 mL de solução salina estéril solução (0,85% p / v NaCl) e agitação a 180 rpm durante 30 min.

Então, a suspensão será diluída em série para 10⁻³ usando solução salina estéril e alíquotas de 150 µL adicionadas a cada um dos 93 poços por placa. As placas serão incubadas a 28 ° C e a densidade óptica a 590 nm será registrada a cada 24 h em 168 h.

Os valores de densidade óptica do poço será ajustado subtraindo o valor de absorvância do poço de controle (contendo água) a partir dos valores de absorvância de cada poço contendo uma fonte de carbono.

Para estimar a atividade microbiana geral, o desenvolvimento médio da cor do poço (AWCD) será calculado conforme descrito por (PENG et al., 2016) usando a equação $AWCD = \sum ODi / 31$ onde ODi será o valor da densidade óptica ajustado de cada poço.

A diversidade funcional da comunidade é expressa como a de Shannon diversidade (H) e regularidade (E), calculada conforme descrito por (GE et al., 2018) com base no Biolog EcoPlates obtidos em 96 h. A riqueza do substrato (R) será estimada como o número total de C substratos ($ODi > 0,2$) oxidados às 96 h pelas comunidades microbianas.

A fim de avaliar as diferenças no CLPP, os dados às 96 h serão normalizados dividindo cada valor ODi pelo AWCD e uma análise de componente principal (PCA) será estabelecida de acordo com a (GE et al., 2018). Uma análise de mapa de calor irá representar as diferenças de consumo em cada tratamento para o mesmo substrato. Os 31 substratos no Biolog EcoPlate serão divididos em seis grupos de fontes de carbono (carboidratos, aminoácidos, ácidos carboxílicos, aminas, compostos fenólicos e polímeros) e em seguida, as taxas de utilização de carbono serão determinadas para cada um dos grupos de substratos (CHOI; DOBBS, 1999).

4. Análise estatística

Quando pertinente, os dados obtidos serão submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Box-Cox) e, quando necessário, serão corrigidos para possibilitar as análises comparativas. A análise de variância (ANOVA) será aplicada para identificar diferenças entre as variáveis de resposta (biológicas e químicas) e havendo diferenças significativas, será aplicado o teste Tukey ($P < 0.05$). As análises serão conduzidas com auxílio do programa R (<https://www.r-project.org>), com aplicação de pacotes adequados para as avaliações pretendidas. A interpretação quimiométrica dos dados metabolômicos será realizada com auxílio do programa Mass Profiler Professional B.12.06 (Agilent Technologies). A abundância dos compostos será transformada por \log_2 e em 75%, utilizando a mediana com linha de corte. Uma análise de agrupamento não supervisionado será conduzida para obter uma descrição preliminar da correlação e

distância entre perfis metabolômicos dos diferentes microcosmos. Uma análise discriminante supervisionada (Pareto-scaling and Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis - OPLS-DA) será conduzida com auxílio do programa SIMCA 13 (Umetrics, Malmo, Sweden). A projeção de importância variável (Variable Importance in Projection - VIP) permitirá a seleção dos metabólitos com maior poder discriminatório entre os diferentes modelos OPLS-DA construídos, e os compostos com valor VIP > 1.1 serão selecionados para análises quantitativas. A estruturação dos metabólitos por similaridade química será aplicada para o seu agrupamento em classes não sobrepostas (BARUPAL; FIEHN, 2017).

Correlações entre as variáveis de resposta (metabolômica, perfil funcional, atributos biológicos, atributos químicos e biodiversidade) serão realizadas pelo teste de Pearson para determinar a força de associação. Para avaliação da eficiência da promoção do crescimento pelas BPCP, todas as variáveis serão consideradas. Serão utilizados os métodos de dados por escalonamento multidimensional (MDS) e por análise de componentes principais (ACP). A ACP será construída assumindo componentes com altos autovalores e variáveis com alto fator de carga, que melhor representem as propriedades dos microcosmos.

Dentro de cada PCA, fatores altamente ponderados serão aqueles com valores absolutos dentro de 10% do maior peso do fator de carga, e somente variáveis não correlacionadas ($r < 0,60$) serão utilizadas para a construção do MDS (Andrews et al., 2002). Entre as variáveis correlacionadas, aquela com maior soma de correlação será selecionada MDS (ANDREWS; CARROLL, 2001). Devido a diferentes unidades utilizadas para a descrição das variáveis, uma função de padronização (FP) será aplicada ao conjunto total de dados previamente a sua aplicação nos métodos MDS e ACP. O ACP será conduzido com todas as variáveis mensuradas, e o peso para cada indicador será calculado pela sua comunidade, no qual será igual a razão da sua comunidade dividida pela soma de todas os indicadores. Para o método MDS, as variáveis selecionadas pelos ACP serão submetidas a outro ACP, e o peso de cada indicador MDS também será atribuído por sua comunidade (SHUKLA, A. et al.,2006).

5. Referências bibliográficas:

ADENIJI, A. A.; AREMU, O. S.; LOOTS, D. T.; BBALOLA, O. O. 2020. *Pseudomonas fulva* HARBPS9.1: Candidate anti-Fusarium agente in South Africa. Eur. J. Plant Pathol. 157:767-781.

ANDREWS, S.S.; CARROL, C.R. 2001. Designing a soil quality assessment tool for sustainable agroecosystem management: Soil quality assessment of a poultry litter management case study. Ecol. Appl., 11 (6) (2001), pp. 1573-1585.

ALVES, B.J.R.; SANTOS, J.C.F. dos; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.E.; ARAÚJO, R.S. (Ed.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.449-470.

BARDGETT, Richard; CARUSO, Tancredi. Soil microbial community responses to climate extremes: resistance, resilience and transitions to alternative states. Disponível em:< <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rstb.2019.0112>>. Acesso em: 07 jul. 2021.

BARUPAL, D. K.; FIEHN, O. Chemical similarity enrichment analysis (ChemRICH) as alternative to biochemical pathway mapping for metabolomic datasets. Scientific Reports, v.7, n. 14567, p. 1–11, 2017.

BARTLETT, R.J. & ROSS, D.S. Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions. Soil Sci. Soc. Am. J., 52:1191-1192, 1988.

BRANCALION, Pedro; MELI, Paula; TYMUS, Julio; LENTI, Felipe; BENINI, Rubens; SILVIA, Paula; ISERNHAGEN, Ingo; HOLL, Karen. 2019. What makes ecosystem restoration expensive? A systematic cost assessment of projects in Brazil. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108274>.

BRODRIBB, Timothy; COCHARD, Hervé; CHOAT, Brendan. Hanging by a thread? Forests and drought. Disponível em:< <file:///C:/Users/N%C3%A1dia%20Souza%20Jayme/Downloads/Brodribbetal2020.pdf>> . Acesso em: 07 jul. 2021

CHOI, K.; DOBBS, F. C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. Journal of Microbiological Methods, v. 36, p. 203–213, 1999.

EMBRAPA. Embrapa Informação Tecnológica. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, DF, 2009. 627p.

FORD, K.; HILLERISLABERS, J. 2019. Soil alters seedling establishment responses to clima. <https://doi.org/10.1111/ele.13416>.

GALKOVSKYIM, T.; MILEYKO, Y.; BUCKSCH, A.; MOORE, B.; SYMONOVA, O.; PRICE, C. A.; TOPP, C. N.; IYER-PASCUZZI, A. S.; ZUREK, P. R.; FANG, S.; HARER, J.; BENFEY, P. N.; WEITZ, J. 2012. GIA Roots: Software for the high throughput analysis of plant root system architecture. doi:10.1186/1471-2229-12-116

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 59, p. 309-314, 1977.

GE, Z. et al. Analysis on metabolic functions of stored rice microbial communities by BIOLOG ECO microplates. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. JUL, p. 1–8, 2018.

HAASE, S. et al. Elevation of atmospheric CO₂ and N-nutritional status modify nodulation, nodule-carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 39, n. 9, p. 2208–2221, 2007.

LIEBEKE, M.; PUSKAS, 2019. Drying enhances signal intensity for global GC-MS metabolomics. *Metabolites* 9:68.

NAKANO, Y.; ASADA, K. 1981. Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880.

NOLAN, C. et. al. 2018. Past and future global transformation of terrestrial ecosystems under climate change. DOI: 10.1126/science.aan5360.

MELO, F.; ARROYO-RODRIGUEZ, V.; FAHRING, L.; MARTINEZ-RAMOS, M.; TABARELLI, M. 2013a. On the hope for biodiversity-friendly tropical landscapes. *Trends in Ecology & Evolution*. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.tree.2013.01.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2013.01.001)

MELO, F.; PINTO, S.; BRANCALION, P.; CASTRO, P.; RODRIGUES, R.; ARONSON, J.; TABARELLI, M.. 2013b. Priority setting for scaling-up tropical forest restoration projects: Early lessons from the Atlantic Forest Restoration Pact. *Environmental Science & Policy*, 33:395-404. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envsci.2013.07.013>

NEUMANN, G. et al. Root exudation and root development of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Tizian) as affected by different soils. *Frontiers in microbiology*, v. 5, n. January, p. 2, 2014.

OLIVEIRA, H. C.; SODEK, L. 2013. Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism of soybean root segments. *Amino Acids* 44: 743–755

IPCC. Relatório especial inédito do Disponível em: < <https://www.ipcc.ch/srccl/> > Acesso em: 19 jul. 2021.

PAVAN, M. A.; BLOCH, M.; ZEMPULSKI, H. C.; MIYAZAWA, M.; ZACOLER, D. C. 1992. Manual de análise química de solo e controle de qualidade.

PEIXOTO, P.H.P., CAMBRAIA, J., SABBATANA, R., MOSQUIM, R., MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, n.11, v.3, p. 137-143. 1999

PENG, C. et al. Effects of long term rice straw application on the microbial communities of rapeseed rhizosphere in a paddy-upland rotation system. *Science of the Total Environment*, v. 558, p. 231–239, 2016. PRETZSCH, H. 2014. Canopy space filling and tree crown morphology in mixed-species stands compared with monocultures. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.04.027>.

RATAJCZAK, L.; RATAJCZAK, W.; MAZUROWA, H. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. *Physiologia Plantarum*, v..51, p.277-280, 1981.

SILVA, E. E.; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO₂). Comunicado Técnico 99, Seropédica (RJ), 2007.

SHUKLA, A. et al. 2006. SAGA-associated Sgf73p facilitates formation of the preinitiation complex assembly at the promoters either in a HAT-dependent or independent manner in vivo. *Nucleic Acids Res* 34(21):6225-32

SOUZA, N. L.; ROCHA, S. S.; NAREZZI, N. T.; TIEPO, A. N.; OLIVEIRA, A. L. M.; OLIVEIRA, H.C; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; STOLF-MOREIRA, R. Differential impacts of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on seeds of neotropical tree species with contrasting tolerance to shade. 2020. doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.07.021

SPARLING, G.P.; WEST, A.W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C labelled cells. *Soil Biology and Biochemistry*, v.20, p. 337-343, 1988.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. 2.ed. Porto Alegre, Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5)

TIEPO, C.; BRANDLI, L.; KALIL, R.; ROCHA, V. 2018. Education for Sustainability as a Tool to Promote Sustainable Development: An Experience in the South of Brazil. doi:10.1007/978-3-319-69474-0_13

TIEPO, A.; HERTEL, M.; ROCHA, S. S.; CALZAVARA, A. K.; SOUZA, N. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; PIMENTA, J. A.; OLIVEIRA, C.; BIANCHINI, E.; STOLF-MOREIRA, R. Enhanced drought tolerance in seedling of neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria. 2018. doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.07.021

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

YEMM, E.W.; COCKING, E.C. (1955) The Determination of Amino Acids with Ninhydrin. *Analyst*, 80, 209-213. <http://dx.doi.org/10.1039/an9558000209>