



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GABRIEL WOLFSDORF

EFEITOS DO LEGADO E DA INOCULAÇÃO DE SOLOS
DE ORIGENS DISTINTAS EM UMA ESPÉCIE INVASORA
E OUTRA USADA NA RESTAURAÇÃO DE ÁREAS
CAMPESTRES DE CERRADO

LEGACY AND DIFFERENT ORIGIN SOIL INOCULA
EFFECTS IN AN INVASIVE SPECIES AND A SPECIES
USED IN CERRADO GRASSLAND RESTORATION

CAMPINAS

2020

GABRIEL WOLFSDORF

**EFEITOS DO LEGADO E DA INOCULAÇÃO DE SOLOS DE
ORIGENS DISTINTAS EM UMA ESPÉCIE INVASORA E OUTRA
USADA NA RESTAURAÇÃO DE ÁREAS CAMPESTRES DE
CERRADO**

**LEGACY AND DIFFERENT ORIGIN SOIL INOCULA EFFECTS IN
AN INVASIVE SPECIES AND A SPECIES USED IN CERRADO
GRASSLAND RESTORATION**

*Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção
do Título de Mestre em Ecologia*

*Dissertation presented to the Institute
of Biology of the University of
Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of
Master in Ecology*

Orientador: RAFAEL SILVA OLIVEIRA

Co-Orientador: ANNA ABRAHÃO

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO GABRIEL
WOLFSDORF E ORIENTADA PELO PROF. DR.
RAFAEL SILVA OLIVEIRA

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

W833e Wolfsdorf, Gabriel, 1992-
Efeitos do legado e da inoculação de solos de origens distintas em uma espécie invasora e outra usada na restauração de áreas campestres de Cerrado / Gabriel Wolfsdorf. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Rafael Silva Oliveira.
Coorientador: Anna Abrahão.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ecologia de restauração. 2. Solos - Inoculação. 3. Plantas e solo. 4. Plantas invasoras. 5. Atributos funcionais. I. Oliveira, Rafael Silva, 1974-. II. Abrahão, Anna, 1988--. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Legacy and different origin soil inoculation effects in an invasive species and a species used in Cerrado grassland restoration

Palavras-chave em inglês:

Restoration ecology

Soil inoculation

Plant-soil relationships

Invasive plants

Functional traits

Área de concentração: Ecologia

Titulação: Mestre em Ecologia

Banca examinadora:

Rafael Silva Oliveira [Orientador]

Sara Adrian Lopez de Andrade

Caroline Signori Müller

Data de defesa: 18-12-2020

Programa de Pós-Graduação: Ecologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6473-5589>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4880616259618284>

Campinas, 18 de dezembro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira

Profa. Dra. Sara Adrián López Andrade

Dra. Caroline Signori Müller

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia do Instituto de Biologia.

Agradecimentos

Ninguém nasce sozinho. Nenhum ser humano consegue se criar e desenvolver plenamente sem a ajuda dos nossos próximos. Somos de fato uma espécie social. Gostaria então de destacar algumas pessoas que ao longo da minha caminhada acredito que mereçam especial reconhecimento.

A minha co-orientadora Anna Abrahão, que mesmo antes de aceitar a posição, já havia indiretamente tomado este lugar de fala. Obrigado. Às minhas parceiras de casa de vegetação, Larissa Verona (Capo) e Luísa Lobo (Balú), que com certeza, sem a sua ajuda nas regas da casa de vegetação, não teria havido plantas suficientes vivas para fazer as análises no fim do período de crescimento. Ao Rafael Oliveira (Rafa), que mesmo sem me conhecer, aceitou me orientar nesta jornada.

À toda equipe do Laboratório de Ecologia Vegetal, que em conversas aqui e ali, me ajudaram, além de em pequenas ajudas com as plantas e os experimentos aqui e acolá, nos campos e no dia-a-dia. Tenho certeza que este trabalho não teria sido o mesmo sem vocês, com especial ênfase para Gabriel Faustinoni (Gabi), Lorena Lima, André Giles, Patrícia Britto (Pat), André Mouro, Fernanda Piccolo (Fer), José Roberto Aragão (Beto), Thaíse Emílio e Amanda Petroni. Ao meu amigo e antigo orientador durante a graduação, Sérgio Tadeu, que mesmo a distância sempre esteve lá pra me ajudar com as estatísticas da vida. Agradeço também ao comitê de acompanhamento, quem me auxiliou nesta empreitada Simone Vieira e Michelle Dechoum, meu muito obrigado. À professora Sara Adrián, deixo meu mais sincero agradecimento, por sempre me ajudar quando recorri a ela, assim como por me deixar utilizar as dependências de seu laboratório.

Agradeço também a todos os co-autores do artigo que está sendo produzido neste trabalho, por seu empenho e dedicação nas colaborações, análises e interpretação dos dados obtidos neste trabalho. Graças a vocês, acredito que o este trabalho alcançará níveis mais altos.

Houveram também aqueles que mesmo não sendo parte da área de ecologia vegetal puderam dedicar um pouco do seu tempo para ajudar seja na coleta de dados, seja na coleta de terra, na formatação do texto ou outras coisas, obrigado a vocês: Priscilla Rumin (Pri), Ryuji Soma, Janaína Andrade (Tuba), Natalia Paes (Nati), Felipe Rocha (Fifo), Bruna Guissi, Tiago

Marques (Harry), Juliana Di Beo entre outros, que espero não estar esquecendo. E o grande Fernando que me ajudou na programação, gracias amigo!

Gostaria de agradecer também à toda a rede de amigos que criei nesse período que vivi em Barão Geraldo. Do começo ao fim, as amizades foram muito importantes, para conselhos, para simplesmente ouvir e para claro, se divertir. Thai, Ryuji, Bellinha, Carol, Márcio, Luna, Mari, Vina, Caconde, Tessaro, Nicoll, Lucirene, Bagaço, todo o pessoal da escalada, do circo, da natação. Momentos assim, ajudaram a manter a cabeça no lugar. Obrigado!

Tenho de agradecer também aos meus amigos de outros cantos porque mesmo distantes estavam ali para me apoiar ou somente prostrar. Uri, Teté, Manue, Rulo, Purpa e todo o pessoal da Bio-USP, que mantém minha sanidade quando vou pra babilônia que é São Paulo.

Gostaria de agradecer à Unicamp e à Universidade Pública de maneira geral, por ter me propiciado tratamento fisioterapêutico necessário para a recuperação após uma cirurgia no joelho, que através do Dr. Fábio Martins, me proporcionou uma ampla melhoria nas minhas capacidades motoras pós-cirúrgicas, além de bons momentos, obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, sem o qual, mesmo com todos os privilégios que a vida me concedeu não teria conseguido realizar a tese, e desejo de coração, que dias melhores voltem a correr sob os céus dessa e de outras agências de fomento à pesquisa. Agradeço à FAPESP (Fundação De Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desse projeto (Processo NERC-FAPESP 2019/07773-1). Agradeço também ao pessoal do IPEN-USP (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), em especial ao Paulo, por me possibilitarem a esterilização gratuita de meus solos, simplesmente porque eram destinados à pesquisa científica. À toda equipe do laboratório de anatomia vegetal, que me permitiu usar suas instalações para realizar parte de meu trabalho. À Rede de Coletores de Sementes do Cerrado, que viabilizaram meu projeto, assim como a restauração e conservação necessária desse ambiente tão precioso para todos nós, meus mais sinceros agradecimentos.

E por último e mais importante, agradeço àqueles que me deram a vida. Meus pais, Neyla e Pablo, que me deram este presente que é viver, meus irmãos Bruno e Daniel, que através de

risadas, conversas, brigas e viajadas, ajudaram a moldar quem eu sou, além de mesmo que indiretamente me ensinarem muito mais sobre ciência e pesquisa do que muitas aulas que tive ou experimentos que fiz. Minha tia Ismênia, que me iniciou na paixão pelas plantas. E também aqueles que já não se encontram mais presentes fisicamente, como meus avós, mas que parte deles segue conosco participando em nossa existência dia após dia.

E obrigado a você. Que chegou até aqui. Espero que aproveite a leitura, e que, de alguma forma, lhe seja útil.

Gabriel Wolfsdorf

Epígrafe

Viver por si só já é um ato de resistência: estar vivo. Lutar, mesmo que inconscientemente, com todas as forças simplesmente para existir.

Vivemos. E vivemos tempos difíceis, sobretudo para os sonhadores. Aqueles, que quando acordados vagam por muitos lugares, os olhos mirando um horizonte distante. Pensando em como vão de fato conseguir melhorar, mudar ou deixar sua marca no mundo. Pelo tamanho das olheiras que encontramos pelas ruas é possível imaginar que os sonhadores andam convivendo com muitos pesadelos.

Pesadelos como a ignorância e a brutalidade que atualmente rondam todos os círculos sociais. Relinchando bobagens e conceitos que há muito já deviam ter sido abandonados, em cantos longínquos de lugar nenhum. Maus-sonhos que corroem o bem-estar do nosso dia-a-dia.

Nós, sonhadores, temos sofrido ataques constantes. Não acreditamos mais no mundo que existe ao nosso redor – embora tentemos compreendê-lo sob a intensidade de nossas questões. Temos a impressão de que estamos sendo atacados hoje em dia. Na realidade temos esta certeza. Saúde, educação, ciência, sendo verozmente empobrecidas. E nos perguntamos – pois se há algo que os sonhadores gostam, e sabem fazer, é perguntar. Por quê?

E dói saber a resposta: esse é um projeto de mundo buscado por alguns dementadores. Pessoas que sabe-se-lá como chegaram a possuir o papel e a força que possuem. E causam estragos mais rápidos e certos do que conseguem soletrar o alfabeto.

São tempos difíceis para os sonhadores. Parece que estamos rapidamente voltando para a idade das trevas. Alguns, com olhares alentadores vêm olhando a pandemia recente sob outras lentes. Dizem que ela trará novos ares e maneiras de pensar. Uma nova visão para o mundo, quiçá, quebrems a nova ordem mundial!

Oxalá seja possível... Mas agora falando de um sonho um pouco mais próximo da minha realidade. No ambiente acadêmico, é doloroso perceber que cedemos e vamos cedendo cada vez mais à lógica produtivista. Publicação atrás de publicação, vamos dando nossos lugares disponíveis às pessoas que tem a capacidade de criar conforme o sistema espera que criem, e dessa forma, a matiz do arco-íris de ideias e possibilidades, se torna cada vez mais larga, porém mono-tonal. Apenas sete cores, ainda que muito grandes dentro do arco, não são o

suficiente para abranger a imensidão de perguntas e questionamentos que temos a respeito do mundo.

Sabemos todos, que o sistema não está certo. Mas ainda assim continuamos dando espaço para sua lógica, competindo com quem deveríamos colaborar. Torna-se então muito difícil sonhar junto, quando secretamente se pensa em dar uma rasteira em seu colega, passando assim a sua frente.

A liberdade de pensamento anda cerceada. As perguntas que fazemos têm de ser relevantes. Mas quem define a relevância de minhas questões? Quem define a importância dos meus sonhos? Quando foi que meu sonho se tornou em um pesadelo?

Está na hora de acordar.

Acordar, pois não devemos ceder a um sistema que de nós cobra dezenas de funções a troca de lucros enormes que não são repartidos conosco, e principalmente com a sociedade. Conhecimento é direito. Conhecimento tem de ser público. E quem não é partidário dessas ideias, não entende o que é ciência, ainda que formule as melhores hipóteses ou desenvolva as mais corroboradas teorias. Sem entender a amplitude da questão humana na ciência e no conhecimento – e suas implicações – não se é nada além de máquina, que serve a quem não sabe. Somos humanos, somos animais, mas acima de tudo, somos.

Existem iniciativas interessantes no sentido de fortalecer a distribuição do conhecimento. Sci-hub, lib.gen, dentre outras, que lutam constantemente para disponibilizar informação, e são atacados por empresas e governos. Porque continuamos a viver em um mundo que alguns poucos detêm o que deveria ser de todos? E pior, com o apoio de sistemas de justiça inteiros. Há muito percebi que os sistemas de justiça não estão aí para serem justos, mas para manter o *status quo*.

Sou grato ao olhar para trás e ver o quanto cresci e me desenvolvi nos últimos dez anos. Saí da minha caverna, ou pelo menos estou mais próximo da entrada para sua saída. E cada dia mais procuro dar as mãos oferecendo direções para os que estão mais imersos em suas próprias cavernas. O caminho, porém, é de cada um e só sou capaz de realizar a minha própria trilha.

Tenho a esperança de um dia acordar e poder continuar sonhando. Até lá, vou gritar o mais alto que puder contra todo esse sistema que vem corrompendo o que acredito.

Sou grato à vida. Tanto a minha, quanto a ela em seu sentido mais amplo, abarcando toda a existência, a infinitude de linhagens que hoje luta para simplesmente existir, frente a ameaça que nossa espécie é para as outras, para o planeta e para si mesma.

É revoltante, e para mim incompreensível, ter de explicar que os outros seres vivos tem o direito a existir, sem nenhuma outra ideia utilitarista por de trás. Quem sabe um dia entenderá o grandioso ser humano que ao pó ele também retornará?

Sonhos, sonhos, sonhos... Somos bilhões sonhando com o amanhã, sonhos particulares, sonhos singulares, sonhos esquisitos, sonhos felizes e sonhos confusos. Todos nós nos agarramos ao desejo que temos de viver com uma força que não sabemos de onde vem. Embora sim saibamos. Nosso desejo de viver, e não desapegar da existência vem do nosso sonhar.

Sonhamos que amanhã vai ser melhor que hoje. Que um dia tudo isso vai passar. Que a gente vai poder dar as mãos, sorrir e o que mais puder criar. Sonhamos que ficaremos ricos, que as injustiças acabarão, que nos enxergaremos como iguais, que conheceremos o mar, que um amor vamos encontrar.

Os sonhos são expressões de nossos desejos, medos, ânsias, alegrias... Os sonhos são a manifestação das nossas emoções.

Um dia, há muito tempo, eu disse a mim mesmo que ia mudar o mundo. Há algum tempo percebi que sozinho dificilmente serei capaz de realizar algo assim. Então, peço que sonhem comigo. Porque já não quero mais acordar.

.....

Resumo

As interações entre planta e solo são responsáveis por boa parte dos padrões de distribuição vegetal que observamos, assim como parte dos mecanismos biológicos que buscamos compreender. A interação entre plantas e micro-organismos do solo vem recebendo crescente atenção, com possibilidade de aplicações práticas, na restauração ecológica e na agricultura. Atualmente, busca-se melhorar as técnicas e práticas de restauração de ambientes campestres tropicais, a inoculação com solos de ambientes nativos de áreas em vias de restauração tem se mostrado bastante eficaz em áreas de clima temperado. Plantas ao interagirem com o solo acabam por modificar algumas de suas propriedades, sejam elas químicas, físicas ou biológicas. Após uma planta ser removida, todas as modificações geradas por ela e que permanecem no solo são conjuntamente chamadas de efeito do legado. O efeito do legado vem recebendo crescente atenção em estudos ecológicos principalmente de *feedback* planta e solo. É possível que com o planejamento correto ele possa ser útil para auxiliar a restauração ecológica. Este trabalho buscou através de um experimento em duas etapas, verificar como uma espécie invasora e outra utilizada na restauração ecológica são afetadas pela presença de inóculos de origens distintas, sob vegetação campestre nativa, sob vegetação campestre invadida por *Urochloa eminii* e solo completamente esterilizado. Buscou-se também verificar os efeitos do legado próprio e alheio, associados aos inóculos distintos. Atributos funcionais, biomassa e características químicas do solo foram medidos para auxiliar a interpretar dos resultados. A espécie invasora é indiferente à inoculação em um primeiro momento enquanto a outra é beneficiada. Quando há efeito do legado, a interação com o inóculo de solo se torna mais importante, podendo alterar o *feedback* planta-solo para positivo ou negativo dependendo da origem do inóculo. O legado da planta utilizada na restauração tende a estimular a produção de raízes mais finas, enquanto que o legado da planta invasora estimula a colonização por fungos micorrízicos arbusculares. É possível que exista um efeito de baixa diversidade microbiana ocasionando incrementos em biomassa para gramíneas perenes. Há indícios fortes da possibilidade de aplicação de efeitos do legado e inoculação de solos para a restauração de ambientes campestres em áreas tropicais. Recomenda-se fortemente que *D. fastigiata* não seja mais utilizada em projetos de restauração. Este trabalho agrega em conhecimento para a ecologia microbiana de gramíneas nos trópicos, trazendo também discussões sobre cuidados que devemos ter ao realizar pesquisas científicas.

Abstract

Plant-soil interactions are responsible for a good part of plant distribution patterns. The interactions between plants and soil microorganisms have been receiving growing attention, with possibilities of practical applications in ecological restoration and agriculture. Today, we aim to improve tropical grasslands restoration techniques and practices, in temperate environments inoculation with soils of native origin in areas undergoing restoration has been shown to be quite effective. While interacting with the soil, plants end up modifying some soil properties, biological, chemical or physical. After a plant is removed, all the modifications caused by the plant during its lifetime and that remain in the soil are collectively termed legacy effects. The legacy effect has gotten increasing attention as of lately in ecological studies, especially those focusing in plant-soil feedbacks. It is possible that with correct planning it can be useful to help ecological restoration. This work wanted, through an experiment in two phases, to verify how an invasive species and another used in Cerrado ecological restoration are affected by the presence of soil inoculi of different origins: soil below native Cerrado grasslands, soil beneath grasslands invaded by *Urochloa eminii* and completely sterilised soils. We also wanted to verify the effects associated with combination of plant legacies and the different inoculi. Functional traits, aboveground biomass and soil chemical characteristics were measured to help interpret the effects. The invasive species is indifferent to inoculation in a first moment, while the other species is benefitted by inoculation regardless of its origin. When legacies come into play, interactions with soil inoculi become more important, previous inoculation being capable of changing the net feedback between plant and soil, from positive to negative or vice-versa depending on inoculum origin. The legacy from the plant used in restoration stimulates the production of finer roots whereas the legacy from the invasive species stimulates the colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. It is possible that an effect of low microbe diversity leading to gains on biomass production exists for perennial grasses. There are strong indications that both soil legacy effects and inoculation can be used for tropical grassland restoration. It is strongly advised that the use of *D. fastigiata* should be discontinued in restoration projects. This work adds to knowledge about microbial ecology of tropical grasses, bringing also discussions about cares scientists should have while performing academic research.

Lista de Ilustrações

Figura 1.1. Registros de coleta de *Urochloa eminii*.

Figura 1.2. Área de distribuição global de *Diectomis fastigiata*.

Figura 2.1. Desenho experimental do projeto.

Figura 2.2. PCA da primeira etapa do experimento.

Figura 2.3. Boxplots com atributos funcionais medidos na primeira etapa do experimento.

Figura 2.4. PCA contendo informações do solo após a primeira etapa do experimento.

Figura 2.5. PCA contendo informações do solo após a segunda etapa do experimento.

Figura 2.6. Boxplots da colonização micorrízicas de *Diectomis fastigiata* e *Urochloa eminii* na segunda etapa do experimento.

Figura 2.7. Boxplots com atributos funcionais medidos na segunda etapa do experimento – biomassa aérea, LMA e SRL.

Figura 2.S1 Boxplots com atributos funcionais relacionados à crescimento na segunda etapa do experimento.

Figura 2.S2 PCA de *Urochloa eminii* na segunda etapa do experimento.

Figura 2.S3 Boxplot da colonização micorrízica na primeira etapa do experimento.

Figura 3.S1. PCA representando *Diectomis fastigiata* na segunda fase do experimento.

Figura 3.S2. Boxplots contendo atributos funcionais medidos na segunda etapa do experimento – altura, número de folhas e número de clones.

Figura 3.S3. PCA representando *Urochloa eminii* na segunda fase do experimento.

Figura 3.S4. Imagem de um fungo possivelmente desconhecido para a ciência.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sobrevivência das duas espécies em ambas as etapas do experimento

Tabela 2.S1 Análise de *bootstrap* comparando atributos funcionais da primeira etapa do experimento.

Tabela 2.S2 Análise de *bootstrap* comparando atributos funcionais de *Diectomis fastigiata* após a segunda etapa do experimento.

Tabela 2.S3.Análise de *bootstrap* comparando atributos funcionais de *Urochloa eminii* após a segunda etapa do experimento.

Tabela 2.S4 Características do solo após a primeira etapa do experimento.

Tabela 2.S5 Características do solo após a segunda etapa do experimento.

Tabela 3.S1 Relação de indivíduos sobreviventes e indivíduos floridos para todo o experimento.

Tabela 3.S2 Comparação por *bootstrap* da colonização por fungos DSE após a primeira fase do experimento.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMF – Fungos micorrízicos arbusculares (arbuscular mycorrhizal fungi)

AMF% - Porcentagem de colonização por micorrizas arbusculares

DSE – endófitos escuro-septados (dark-septate endophytes)

EEI – Estação Ecológica de Itirapina

EMBRAPA – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

LMA – Massa foliar por área (leaf mass per area)

PCA – Análise dos componentes principais (principal component analysis)

SRL – Tamanho específico da raiz (specific root length)

UFV – Universidade Federal de Viçosa

Unicamp – Universidade Estadual de Campinas

USP – Universidade de São Paulo

#L – Número de folhas

Sumário

Resumo	18
Capítulo 1 – Introdução geral	18
1.1 As interações planta-solo, feedbacks e efeito do legado	18
1.2. Espécies exóticas, invasões biológicas e a microbiota associada	23
1.3. Invasão biológica e a restauração do Cerrado	24
1.4. Perguntas e hipóteses da dissertação	26
1.5. A escolha das espécies	26
Referências	29
Capítulo 2 – Inoculum origin and soil legacy can shape plant-soil feedback outcomes for tropical grassland restoration	38
Abstract	38
1. Introduction	39
2. Methods	41
2.1. Soil sampling	41
2.2. First phase of the experiment: inoculation and soil conditioning	42
2.3. Second phase of the experiment: soil legacies	42
2.4. Aboveground biomass and functional traits measurements	42
2.4.1 Aboveground biomass	43
2.4.2 Leaf mass per area (LMA)	43
2.4.3 Specific root length (SRL)	43
2.4.4 Plant size	43
2.4.5. Arbuscular Mycorrhizal Fungi colonization (AMF%)	43
2.5. Soil analyses	44
2.6. Statistical analyses	44

3. Results	45
3.1. Conditioning phase	45
3.2. Conditioned phase – Legacies	48
3.2.1. <i>Diectomis fastigiata</i>	51
3.2.2. <i>Urochloa eminii</i>	53
4. Discussion	55
4.1. Soil inoculation effects and mycorrhizal responses	56
4.2. Legacy effects	58
4.3. Ecological considerations and restoration applications	59
4.4. Future directions	61
References	61
Supplementary Material	68
Capítulo 3 – Discussão Geral	79
1. Escopo geral: Sobre fazer ciência	79
2. A respeito da ecologia microbiana de gramíneas	82
3. Considerações finais	87
Referências	88
Material Suplementar	90
Anexos	95
Anexo 1: Declaração de Ética e Biossegurança	95
Anexo 2: Declaração de Direitos Autorais	96

Capítulo 1 – Introdução geral

1.1 As interações planta-solo, feedbacks e efeito do legado

As interações entre planta e solo, embora estudadas há bastante tempo, tem sido foco de um crescente número de estudos científicos (Kulmatiski et al., 2008; Crawford et al., 2019), dado que tais interações tem se mostrado um fator importante para a determinação da composição de comunidades vegetais (Crawford et al., 2019). O solo, que é uma matriz complexa, composta de partes de água, ar, minerais e seres vivos, é essencial para sustentar a vida, principalmente dada a sua interação intrínseca com os vegetais, que dele absorvem os nutrientes que vão sustentar toda a cadeia alimentar em ambientes terrestres. Em um contexto global em que a perda de solo é um fator preocupante, perdemos no mínimo de duas a dez vezes mais solo do que a natureza é capaz de produzir (Pimentel, 2006; Montgomery, 2007). Na América do Sul, por exemplo, uma das taxas mais elevadas de erosão é encontrada, estimada em 3,53 toneladas/hectare/ano (Borrelli et al., 2017; FAO e ITPS, 2015). O estudo do solo, e mais especificamente de suas interações com as plantas é de fundamental importância para o desenvolvimento de culturas e tecnologias que promovam o bem-estar social e natural, sendo, portanto, de extrema importância para a sustentabilidade e o desenvolvimento sustentável (FAO, 2019). Com crescentes taxas de desmatamento e destruição de ambientes nativos é de extrema importância que compreendamos como plantas e solo interagem a fim de obtermos uma efetiva mitigação dos danos que o ser humano vem causando à natureza.

As plantas são organismos eucariontes complexos. São capazes de utilizar a energia luminosa para transformar gás carbônico – CO_2 – em cadeias carbônicas mais complexas, como açúcares. As plantas absorvem o CO_2 do ar e os demais nutrientes como Nitrogênio, Fósforo, Potássio e Cálcio do solo. Como todos os outros organismos, as plantas não vivem alheias aos outros seres vivos ao seu redor. Além de interagir com o Sol, a água, o ar e o solo, elas interagem com outros organismos presentes acima e abaixo do solo. O conjunto de micro-organismos presentes no solo é conhecido como a microbiota do solo. Os encontros que ocorrem entre plantas e a microbiota do solo podem acarretar em uma série de interações. O resultado destas interações pode ter benefícios, ser neutro ou ser maléfico tanto para a planta como para os microorganismos (Hassani et al., 2018). As interações benéficas que podem ser desempenhadas pelos micróbios podem variar do auxílio na absorção de

nutrientes (Brundrett, 2004) a auxílios mútuos no sistema imune de ambos os participantes da interação (Teixeira et al., 2019). Na contramão, os micro-organismos podem ser patogênicos e causar a morte ou enfermidades nas plantas (Garcia e McKay, 1970), como comumente observamos em nossos jardins com o apodrecimento de nossas plantas. Interações neutras seriam aquelas em que os organismos simplesmente habitam na superfície do vegetal, sem interagir ou influenciar diretamente a planta em questão.

Casos bastante conhecidos no universo vegetal de interações com os micróbios dizem respeito, por exemplo, às associações micorrízicas, amplamente distribuídas ao longo da árvore filogenética das plantas, em que fungos fornecem nutrientes em troca de açúcares produzidos pelas plantas, incrementando a nutrição mineral dos vegetais (Brundrett, 2004). Há também as conhecidas associações entre plantas e microorganismos estimuladores de crescimento (em inglês: PGPR – plant-growth promoting rhizobacteria). De acordo com Glick em 2012, o estímulo ao crescimento pode ocorrer através da facilitação pelas bactérias na obtenção de nutrientes como Nitrogênio fixado, Ferro e Fósforo. As PGPR podem ainda liberar hormônios vegetais no solo (Jacoby et al., 2017), estimulando o crescimento das plantas, mesmo que este mecanismo ainda não seja bem compreendido. Bactérias patogênicas também são capazes de liberar hormônios vegetais, em concentrações diferentes do que é produzido pelas plantas, o que parece afetar as plantas de outras maneiras (Ma e Ma, 2016). Ainda que seja conhecido que alguma espécie vegetal não depende diretamente de micro-organismos para o pleno desenvolvimento, em última instância, a absorção de nutrientes do solo depende do crescimento de micróbios do solo que por sua vez possuem a capacidade de catalisar reações químicas no solo e mineralizar nutrientes essenciais como nitrogênio e potássio em sua forma orgânica, elementos que por sua vez serão liberados quando ocorre a lise destas células (Jacoby et al., 2017). Podemos afirmar então, que no mundo vegetal, ninguém vive sozinho, todos dependem de micro-organismos, no mínimo para a sua nutrição.

Uma visão atual acerca de plantas e outros seres vivos, é que eles são na verdade holobiontes, significando que são organismos que interagem e dependem de um conjunto microbiano que permite a realização de funções fisiológicas básicas para os seres vivos, como por exemplo, a absorção de nutrientes no caso das plantas (Van der Heijden et al., 2008; Vandenkoornhuyse et al., 2015). Neste contexto, o alvo da seleção natural deixaria de ser apenas no indivíduo, passando a englobar as comunidades microbianas que são passadas de geração a geração atuando em simbiose com o eucarionte em questão (Guerrero et al., 2013;

Rosenberg e Zilber-Rosenberg, 2016). Esta definição considera que os macro-organismos e sua microbiota possuem uma relação íntima e persistente, hipotetizando-se que exista uma microbiota central, compartilhada por todos os organismos de determinada espécie. Esta microbiota central também poderia ser determinado por funções microbianas compartilhadas preditas (Vanderkoornhuyse et al., 2015), ou seja, determinado por funções metabólicas desempenhadas pelos micro-organismos. Ainda de acordo com Vanderkoornhuyse e colaboradores (2015), há diferentes hipóteses a respeito do funcionamento da microbiota central. A hipótese da espécie-chave prediz que uma função é realizada por uma espécie apenas (Paine, 1969), enquanto que a hipótese da redundância funcional prediz a existência de toda uma gama de organismos capazes de realizar uma determinada função (Walker, 1992). As hipóteses não são mutuamente exclusivas, mas talvez pendam um pouco mais para a redundância funcional, dada a natureza da evolução de bactérias por si só, que ocorre através de tempos geracionais muito curtos, contando ainda com a possibilidade de transferências horizontais de genes (Koskella et al., 2017). A constituição do holobionte gozaria portanto de certa plasticidade na construção de seu próprio ser (Vanderkoornhuyse et al., 2015). De acordo com Bulgarelli e colaboradores (2012), as comunidades microbianas presentes no solo são mais importantes para determinar a composição microbiana associada às raízes do que o genótipo da planta por si só. O solo é, portanto, a fonte de micróbios para as partes subterrâneas das plantas. Atuando em conjunto com o meio-ambiente, e as próprias plantas, o solo ajuda a modular a identidade dos participantes microbianos da interação, baseado tanto em sua disponibilidade (ou seja, presença ou ausência) quanto em fatores bióticos e abióticos do sistema (Aires et al., 2016).

É importante ressaltar, que as plantas tem a habilidade de recrutar ativamente os micro-organismos do solo. Os exudatos liberados pelas raízes são capazes de moldar as comunidades bacterianas (Sasse et al., 2018). Espécies distintas liberarão exudatos diferentes, tanto em termos de composição molecular quanto em termos de quantidades, e a liberação destes é ainda modulada pelo meio em que as plantas cresceram, meios ricos em Alumínio ou pobres em Cálcio por exemplo, devem estimular a produção de exudatos com conteúdos distintos (Sasse et al., 2018). Portanto, a composição dos micro-organismos que habitam as raízes das plantas será alterada não apenas pela identidade do vegetal, pela composição do solo ou pela disponibilidade de taxa microbianos específicos, mas por um conjunto destes, e provavelmente alguns outros fatores.

A evolução das espécies, fruto da seleção natural, é a teoria mais aceita nas ciências biológicas. Nela os seres vivos mais adaptados ao seu ambiente tem mais chance de ter filhos bem sucedidos, se a razão do sucesso for herdável para os seus descendentes (Darwin, 1859). Atualmente o número de espécies de plantas com flores no planeta é de aproximadamente 370 mil (Kew, 2017), cada uma com uma história evolutiva singular associada ao seu local de origem assim como cenário e contexto ecológico. Um único grão de areia é habitado por dezenas de milhares de micro-organismos de centenas, se não milhares de espécies diferentes (Probandt et al., 2017). Neste contexto, as possibilidades de interação para o holobionte são enormes.

Como já discutido, as plantas de maneira geral, ao possuírem intrincada relação com o solo e com os organismos que nele habitam, são capazes de modificar algumas de suas propriedades ao longo do tempo (Angers e Caron, 1998). As plantas podem atuar em conjunto com os micro-organismos ou podem ter maior independência e atuar mais através de exsudatos radiculares próprios, por exemplo (Roelofs et al., 2001; Lambers et al., 2006). A interação direta entre planta e solo e os resultados desta interação são conhecidos como *feedbacks* planta-solo. Tais *feedbacks* podem ter efeitos negativos, ocasionando, por exemplo, um aumento da quantidade de patógenos no solo, resultando em dependência negativa da densidade para uma determinada espécie de planta. Ao ocasionar um efeito de estímulo negativo para os indivíduos da própria espécie, a denso-dependência negativa acaba indiretamente beneficiando uma espécie distinta, promovendo um aumento na diversidade local (Bever et al., 1997), ou seja, a coexistência de espécies (Crawford et al., 2019). Os *feedbacks* podem também ser positivos, onde a espécie acaba modificando o solo de tal maneira que ela própria se beneficia, gerando uma perda de diversidade local (Levine et al., 2006). O *feedback* positivo é particularmente importante para as invasões biológicas ou dominâncias mono-específicas, pois ocorre uma retroalimentação na qual a espécie focal beneficia indivíduos conspecíficos (Levine et al., 2006).

Quando determinada planta é removida de um sistema, seja de maneira natural ou artificial e ainda assim afeta plantas que venham a colonizar o ambiente após sua remoção ocorre o chamado efeito do legado (Corbin e D'Antonio, 2012). Este pode ser definido como o *feedback* promovido pela espécie original, ou seja, suas alterações nos diversos componentes do solo afetando outros organismos, quando esta espécie já não se encontra mais

presente no ambiente (Cuddington, 2011). Neste caso, os efeitos da presença e interações prévias da planta focal permanecem espacial e temporalmente no solo.

O efeito do legado é de particular interesse para a restauração biológica, posto que para restaurar áreas invadidas é imperativa a remoção ou supressão da espécie invasora. Dado que as espécies estabelecem interações particulares com os organismos no solo, e estas interações são capazes de alterar a química, física e a biologia do solo (Subbarao et al., 2009; Angers e Caron, 1998), compreender como é o legado de espécies invasoras no solo é de grande importância para o delineamento de técnicas e procedimentos efetivos para restaurar ambientes invadidos (Nsikani et al., 2018). Espécies anuais, por exemplo, tendem a sofrer mais efeitos negativos pela concentração de organismos patogênicos do que espécies perenes (Kulmatiski et al., 2008), devido a um *trade-off* na alocação de recursos para defesa ou crescimento.

Uma técnica que vem sendo testada e utilizada para a restauração de comunidades vegetais, principalmente em áreas de clima temperado, é o transplante de solos. Esta técnica consiste na adição de um inóculo do solo nativo, ou seja, a transferência de parte da camada superior do solo (inóculo) de uma área conservada para áreas degradadas em vias de recuperação, transportando assim, a microbiota e sementes presentes no banco de sementes (Wubs et al., 2016). Tal técnica já foi empregada para a restauração de áreas úmidas (Brown e Bedford, 1997) e de urzais (Wubs et al., 2016) também conhecidas como *heathland* em inglês, ambientes arbustivos com grande abundância de espécies da família Ericaceae, conhecidas em inglês como *heath*. Também já foi demonstrado que a utilização de solos transplantados é eficiente para restaurar o cerrado, quando este solo inclui o banco de gemas no solo (Pilon et al., 2019), consistindo em uma camada de solo consideravelmente maior do que a transferência superficial apenas. Esta estratégia, portanto, não é sustentável, uma vez que a transferência do solo e consequente recuperação de uma área implicam na destruição de outra área. Entretanto, pode ser uma medida efetiva para recuperar áreas adjacentes a áreas de cerrado que tiverem autorização para serem suprimidas.

Experimentos comparando os efeitos de espécies nativas e exóticas no solo vêm sendo realizados para analisar os efeitos que as plantas têm sobre a biota e a microbiota do solo. Schittko e Wurst (2014) demonstraram que uma espécie nativa pode se beneficiar das mudanças promovidas na microbiota do solo por uma espécie invasora, e ao mesmo tempo outra espécie nativa é indiferente à origem do solo, mostrando a complexidade das interações

planta-solo, sendo estas provavelmente espécie-específicas. Callaway e colaboradores (2008) demonstraram que uma espécie invasora é capaz de liberar compostos no solo que suprimem os fungos micorrízicos no hábitat invadido, mas não em seu hábitat original. Esta hipótese é conhecida como a hipótese das novas armas, pois os organismos invasores liberam compostos com os quais a biota local nunca teve contato anteriormente. A hipótese da fuga do inimigo postula que espécies exóticas passam por uma diminuição na quantidade de inimigos naturais no novo hábitat, e essa redução de inimigos seria responsável em parte por seu sucesso e expansão na área introduzida, como demonstrado por Keane e Crawley (2002), que em seu artigo mostram que a fuga de inimigos ocorre em níveis distintos em relação às guildas de inimigos, podendo haver escape de herbívoros, mas não de bactérias patogênicas por exemplo. É possível ainda que a espécie exótica seja beneficiada ao estabelecer interações fortes com micro-organismos nos novos hábitats, chamada hipótese de mutualismo melhorado (Reinhart e Callaway, 2006), que apesar de pouca evidência na sua recorrência, deve ser levada em consideração.

1.2. Espécies exóticas, invasões biológicas e a microbiota associada

Desde o início da história humana, o homem migrou. E como todas as espécies dependem de outros seres para sobreviver, ao longo das migrações humanas, espécies foram levadas por nossos antepassados de um local a outro, intencionalmente ou não (Minchin, 2009). Os cachorros foram levados para a Austrália vindos das atuais ilhas da Indonésia há mais de 5000 anos e se tornaram os famosos dingos, cachorros selvagens australianos (Oskarsson et al., 2011). A batata-doce foi levada pelo homem para praticamente todas as ilhas do Pacífico antes mesmo dos europeus chegarem às Américas (Clarke, 2009), e o gado vem sendo levado por onde o homem passa há milhares de anos (Ajmone-Marsan et al., 2010). Às espécies oriundas de outras regiões e que acabam por se estabelecer em locais diferentes de sua origem, chamamos de espécies exóticas. Dentro das espécies exóticas, algumas ainda podem tornar-se o que chamamos de espécies invasoras. Tais espécies, ao chegar a um novo território, são capazes de se proliferar com tanto êxito, que as espécies nativas, oriundas do local de destino, passam a ser prejudicadas e tem seu sucesso reprodutivo diminuído pela presença destas novas espécies. Este fenômeno é conhecido como invasão biológica (Richardson et al., 2000; Keller et al., 2011).

As invasões biológicas vêm ocorrendo com maior frequência desde a descoberta das Américas pelos europeus em 1492 (Essl et al., 2018), que é inclusive um marco temporal para os estudiosos do tema, que consideram espécies introduzidas a partir de tal ano parte da neobiota, a nova biota (Richardson et al., 2000). Houve necessidade em definir este marco temporal pelos estudiosos devido ao aumento na pressão de propágulos decorrente das grandes navegações a partir de então.

A invasão biológica é uma das maiores causas de perda de biodiversidade nos tempos modernos (Vitousek et al., 1996). Associada a pressões antropogênicas, como o desmatamento e a transformação da paisagem pelos seres humanos, invasões biológicas podem ter efeitos bastante nocivos para ambientes nativos. O estudo das invasões biológicas é uma ciência emergente, com implicações diretas para a conservação da biodiversidade. No Brasil, atualmente são reconhecidas ao menos 117 espécies de plantas invasoras (Zenni e Ziller, 2011). É importante salientar que tais organismos quando introduzidos, trazem consigo parte de seu holobioma, sendo estas invasões, portanto, muitas vezes invasões conjuntas de plantas e micróbios (Dickie et al., 2017), sobre as quais ainda se sabe muito pouco.

1.3. Invasão biológica e a restauração do Cerrado

O Cerrado brasileiro é tido como a savana mais biodiversa do planeta (Klink e Machado, 2005), sendo habitado por pelo menos 12000 espécies de plantas com endemismo estimado em 35% da sua vegetação (BFG, 2015). Desde a metade do século XX até hoje, mais de 55% de sua área original já foi degradada e transformada em pastagens ou outras culturas vegetais (Klink e Machado, 2005), com perda efetiva de ao menos 46% de sua cobertura vegetal original e menos de 20% da vegetação original intacta (Strassburg et al., 2017). O estrato herbáceo do Cerrado é composto majoritariamente por gramíneas, além de leguminosas, ciperáceas e compostas (Pivello et al., 1999), sendo este estrato o mais ameaçado pela substituição dos sistemas nativos por pastagens. Há também a pressão de algumas espécies invasoras, que são capazes de aos poucos substituir o rico estrato herbáceo, inibindo o seu desenvolvimento (Pivello et al., 1999; Kolb et al., 2016).

Atualmente no cerrado brasileiro, milhares de hectares foram transformados em pastagens e estão tomados por espécies de capim africanas do gênero *Urochloa* (Sano et al., 2008, Zenni e Ziller, 2011), gramíneas utilizada amplamente para o forrageamento do gado. Embora estas pastagens não tenham sido invadidas, mas plantadas, espécies do gênero

Urochloa possuem características que facilitam sua dispersão e propagação, como rápidas taxas de crescimento, alta eficiência na utilização de recursos, além de eficiência na reprodução vegetativa (Levine et al., 2003, Dusi, 2001), sendo capazes de invadir áreas próximas. *U. eminii* é ainda, uma planta focal para melhoramento genético na EMBRAPA (Monteiro et al., 2016), ou seja, se por um lado ela é capaz de prejudicar os ecossistemas naturais, tomando o lugar das espécies nativas, por outro é responsável, ou está ao menos diretamente associada por parte da produção bovina no país, tornando difícil o uso de técnicas de manejo como o controle biológico (introduzir inimigos naturais da espécie como fungos ou parasitas) para manejar a espécie, podendo haver consequências catastróficas para a economia do país. Todos estes fatores evidenciam a complexidade do manejo da espécie. É importante ressaltar então, o aspecto social da conservação biológica, não podendo ser observada apenas através de olhares conservacionistas, pois o manejo de espécies pode ter impacto direto sobre a vida dos habitantes e a economia do país. Importante ressaltar, contudo, que iniciativas utilizando o controle biológico como para espécies invasoras de interesse econômico são possíveis, porém exigem planejamento e cuidado (Impson et al., 2008)

A maior parte dos solos do cerrado possuem pH ácido no solo e baixa disponibilidade de nutrientes, desta forma uma das maneiras encontradas para o cultivo é a alteração das propriedades químicas do solo através de aditivos como cal e fertilizantes (Klink e Machado, 2005). A adição de tais “corretivos” ao solo ocasiona mudanças significativas no solo, alterando não apenas a química do solo, mas também os organismos que ali estavam presentes (Bååth e Arnebrant, 1994; Ekenler e Tabatabai, 2003; Silveira et al., 2020). Alterando toda a biologia do sistema, afetando inclusive quais espécies serão capazes de colonizar estas áreas modificadas.

Atualmente não dispomos de tecnologia e conhecimentos que nos permitam restaurar eficientemente o solo e o ambiente do cerrado, embora hajam importantes iniciativas nessa direção (Pellizzaro et al., 2017, Coutinho et al., 2019, Sampaio et al., 2019; Assis et al., 2020). Boa parte das pastagens que encontramos no Brasil, que em 2000 representavam 50 milhões de hectares no bioma cerrado apenas, são abandonadas em alguns anos por não suportarem a produção continuada (Sano et al., 2006). Assim, o Brasil possui um passivo ambiental de ao menos 18 milhões de hectares de pastagens improdutivas (Pereira et al., 2018) e campos agropecuários abandonados que, frente aos desafios modernos como as mudanças climáticas, precisa ser atenuado ou mitigado (Bustamante et al., 2019). A

recuperação de vegetações nativas é uma das formas possíveis de sequestrar gás carbônico (Benayas, 2009; Dass et al., 2018; Silveira et al., 2020).

1.4. Perguntas e hipóteses da dissertação

Este trabalho busca melhorar a compreensão que temos sobre as interações entre planta e solo, e como estas afetam o desempenho ecológico das espécies. Busca-se promover conhecimentos aplicáveis a restauração de ambientes campestres de Cerrado, assim como compreender o funcionamento dos mesmos a partir de uma perspectiva da interação entre plantas e solo. Para tanto utilizamos dois aspectos das interações planta-solo: o efeito do legado e da origem da microbiota:

- A primeira pergunta é qual o nível de dependência, da presença de microbiota no solo para o pleno desenvolvimento de duas espécies. Para tal foram cultivadas uma espécie utilizada na restauração e outra invasora, em solo esterilizado e com solo inoculado, contendo micro-organismos.
- A segunda pergunta busca compreender se a origem do inóculo, sob vegetação campestre nativa e sob vegetação campestre invadida por *Urochloa eminii*, afeta diferencialmente o desempenho das duas espécies.
- A terceira pergunta foca no legado do solo, visando descobrir como as espécies são afetadas por legados tanto da própria espécie quanto da outra, associados a a inóculos de solo de origens distintas.

Esperava-se que a presença de inóculo fosse ser benéfica para ambas as espécies, devido à presença de micro-organismos. Que a espécie invasora seria indiferente à origem do inóculo e que se beneficiaria de legado próprio, enquanto que a espécie utilizada na restauração seria beneficiada pelo inóculo nativo, porém estaria mais sujeita a efeitos negativos oriundos do legado da própria espécie.

1.5. A escolha das espécies

As espécies escolhidas para o trabalho foram *Urochloa eminii* (Mez) Davidse, e *Diectomis fastigiata* (Sw.) P.Beauv. *Urochloa eminii* foi utilizada, pois é uma espécie amplamente distribuída no Brasil como invasora (Pivello et al., 1999), e está bastante presente em pastagens abandonadas na Chapada dos Veadeiros, onde estão sendo realizadas iniciativas

de restauração do Cerrado (Coutinho et al., 2019). *Diectomis fastigiata*, por sua vez foi utilizada neste estudo por ser uma espécie utilizada no projeto de restauração na Chapada dos Veadeiros, a qual apresenta altas taxas de crescimento e cobertura relativa do solo superior a 50% no primeiro ano (Coutinho et al., 2019).

De acordo com o site Plants of the world online (2020), *Urochloa eminii* (Mez) Davidse é uma gramínea de origem africana, com distribuição natural da República Democrática do Congo até a Zâmbia e Malawi. É uma planta perene e que atualmente está presente na Índia, Austrália, América Central e América do Sul. No Brasil, é classificada como uma planta invasora (Pivello et al., 1999), e é capaz de se reproduzir por sementes e por estolões (Williams e Baruch, 2000). Alguns dos seus sinônimos mais conhecidos no Brasil são *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster e *Brachiaria decumbens* Stapf. A espécie atualmente possui ampla área de distribuição no Brasil, principalmente em áreas dos biomas Cerrado e Mata Atlântica (Figura 1.1).

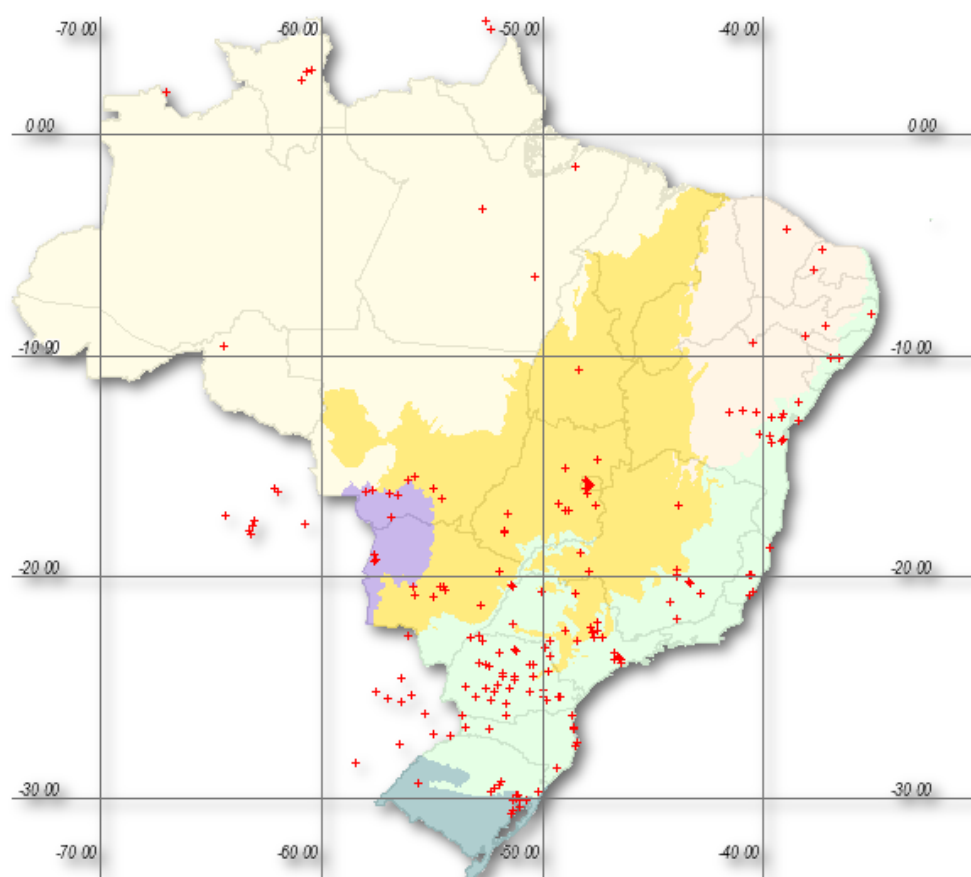


Figura 1.1. Registros de observação e coleta para *Urochloa eminii* disponíveis na plataforma species link

para o Brasil e regiões adjacentes. O bioma Cerrado está representado em amarelo.

Ainda de acordo com o site Plants of the world online (2020), *Diectomis fastigiata* (Sw.) P.Beauv. é uma planta anual com distribuição pantropical (Figura 1.2.), tem por sinônimo o nome *Andropogon fastigiatus* Sw. Filgueiras em 1988 considerou *D. fastigiata* uma espécie introduzida, nativa da África tropical, porém, Zanin (2001), considerou a espécie como nativa. Consultando especialistas no grupo, e através de uma abordagem preventiva, no momento a espécie deve ser considerada como criptogênica (Cassiano Welker, comunicação pessoal), ou seja, uma espécie da qual não se tem certeza sobre a origem. É uma das plantas utilizadas na semeadura direta para restauração do cerrado (Coutinho et al., 2019) e, portanto, de grande interesse para pesquisas sobre sua ecologia e origem.

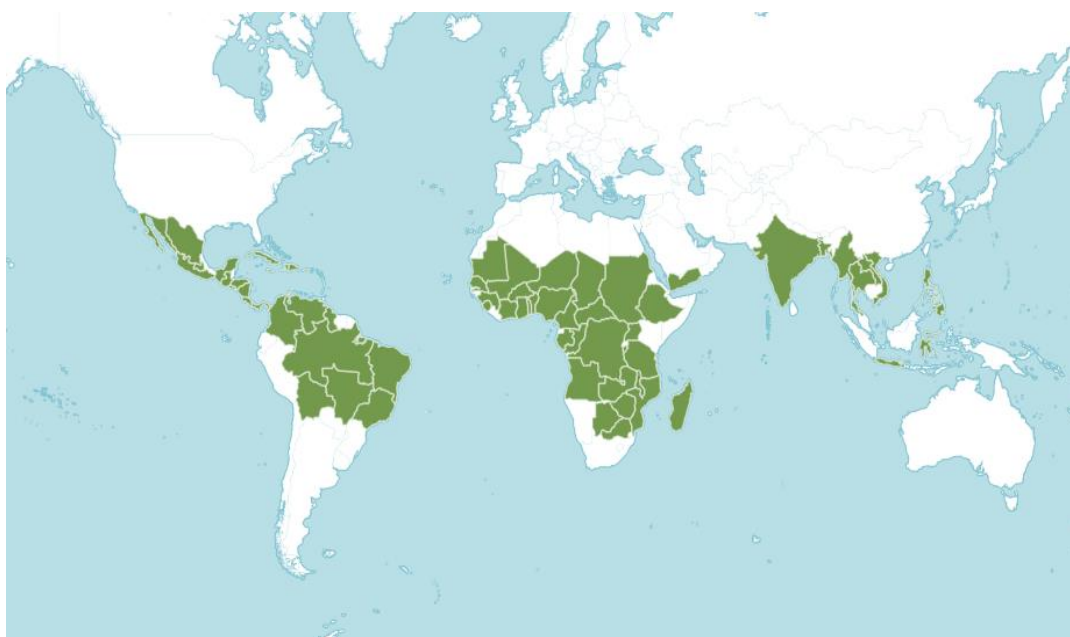


Figura 1.2. Área de distribuição global para *Diectomis fastigiata*. Obtida através do site [plantsoftheworldonline](http://plantsoftheworldonline.org).

1.6. Proposta e objetivos

Busca-se, portanto, compreender como as interações entre plantas e micro-organismos molda o desempenho das plantas, a fim de melhorarmos a nossa compreensão da fisiologia dos vegetais, assim como melhorar as técnicas atualmente

utilizadas na restauração.

Referências

- Aires, T., Serrão, E. A., & Engelen, A. H. (2016). Host and Environmental Specificity in Bacterial Communities Associated to Two Highly Invasive Marine Species (Genus *Asparagopsis*). *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00559
- Ajmone-Marsan, P., Garcia, J. F., & Lenstra, J. A. (2010). On the origin of cattle: How aurochs became cattle and colonized the world. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 19(4), 148–157. doi:10.1002/evan.20267
- Angers, D. A., & Caron, J. (1998). Plant-induced changes in soil structure: Processes and feedbacks. *Biogeochemistry*, 42(1/2), 55–72. doi:10.1023/a:1005944025343
- Assis, G. B., Pilon, N. A. L., Siqueira, M. F., Durigan, G. 2020. Effectiveness and costs of invasive species control using diferente techniques to restore cerrado grasslands. *Restoration Ecology*. doi:10.1111/rec.13219
- Bååth, E., & Arnebrant, K. (1994). Growth rate and response of bacterial communities to pH in limed and ash treated forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(8), 995–1001. doi:10.1016/0038-0717(94)90114-7
- Benayas, J. M. R., Newton, A. C., Diaz, A., & Bullock, J. M. (2009). Enhancement of Biodiversity and Ecosystem Services by Ecological Restoration: A Meta-Analysis. *Science*, 325(5944), 1121–1124. doi:10.1126/science.1172460
- Benítez, M.-S., Hersh, M. H., Vilgalys, R., & Clark, J. S. 2013. Pathogen regulation of plant diversity via effective specialization. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(12), 705–711.
- Bever, J. D., K. M. Westover, and J. Antonovics. 1997. Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *Journal of Ecology*, 85:561-573.
- BFG. 2015. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, 66(4): 1085-1113.

Borrelli, P., Robinson, D. A., Fleischer, L. R., Lugato, E., Ballabio, C., Alewell, C., Meusburger, K., Modugno, S., Schütt, B., Ferro, V., Bagarello, V., Van Oost, K., Montanarella, L., Panagos, P. 2017. An assessment of the global impact of 21st century land use change on soil erosion. *Nature Communications* 8, 2013 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02142-7>

Brown, S. C., Bedford, B. L. 1997. Restoration of wetland vegetation with transplanted wetland soil: an experimental study. *Wetlands*, 17(3), 424-437.

Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79(3), 473–495. doi:10.1017/s1464793103006316

Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E et al. 2012. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488:91–95.

Burr, T. J., Schroth, M. N., Suslow, T. (1978). Increased potato yields by treatment of seed-pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* 68, 1377–1383. doi:10.1094/Phyto-68-1377

Bustamante et al. 2019. Ecological restoration as a strategy for mitigating and adapting to climate change: lessons and challenges from Brazil. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 24: 1249-1270.

Callaway, R. M., Cipollini, D., Barto, K., Thelen, G. C., Hallett, S. G., Prati, D., Stinson, K., Klironomos, J. 2008. Novel Weapons: invasive plant suppresses fungal mutualists in America but not in its native Europe. *Ecology*, 89(4): 1043-1055.

Clarke, A. 2009 Origins and dispersal of the Sweet potato and bottle gourd in Oceania: Implications for prehistoric human mobility. PhD thesis (Massey Univ, Palmerston North, New Zealand).

Corbin, J. D., D’Antonio, C. M. 2012. Gone but not forgotten? Invasive plants’ legacies on community and ecosystem properties. *Invasive Plant Science and Management*, 5:117-124

- Coutinho, A. G., Alves, M., Sampaio, A. B., Schmidt, I. B., & Vieira, D. L. M. (2019). Effects of initial functional-group composition on assembly trajectory in savanna restoration. *Applied Vegetation Science*. doi:10.1111/avsc.12420
- Crawford, K. M., Bauer, J. T., Comita, L. S., Eppinga, M. B., Johnson, D. J., Mangan, S. A., Queenborough, S. A., Strand, A. E., Suding, K. N., Umbanhowar, J., Bever, J. D. 2019. When and where plant-soil feedback may promote plant coexistence: a meta-analysis. *Ecology Letters*. 22:1274-1284. doi:10.1111/ele.13278
- Cuddington, K. 2011. Legacy Effects: The Persistent Impact of Ecological Interactions. *Biological Theory*, 6: 203-210.
- Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or, the preservation of favoured races in the struggle for life*. London: J. Murray.
- Dass, P., Houlton, B. Z., Wang, Y., & Warlind, D. (2018). Grasslands may be more reliable carbon sinks than forests in California. *Environmental Research Letters*, 13(7), 074027. doi:10.1088/1748-9326/aacb39
- Dickie, I. A., Bufford, J. L., Cobb, R. C., Desprez-Lostau, M., Grelet, G., Hulme, P. E., Klironomos, J., Makiola, A., Nuñez, M. A., Pringle, A., Thrall, P. H., Tourtellot, S. G., Waller, L., Williams, N. M. 2017. The emerging science of linked plant-fungal invasions. *New Phytologist*, 215(4).
- Dusi, D. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf. Tese (Doutorado em Botânica) – Department of Plant Sciences, Wageningen University. Wageningen, p. 167. 2001.
- Ekenler, M., & Tabatabai, M. A. 2003. Effects of liming and tillage systems on microbial biomass and glycosidases in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 39(1), 51–61. doi:10.1007/s00374-003-0664-8
- Essl, F., et al. 2018. Which taxa are alien? Criteria, application, and uncertainties. *BioScience*, 68(7): 496-509.
- FAO. 2019. *Soil erosion: the greatest challenge to sustainable soil management*. Rome. 100 pp. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

FAO and ITPS. 2015. Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy

Filgueiras, T. S. 1988. Africanas no Brasil: gramíneas introduzidas da África. *Caderno de Geociências*, 5: 57:63.

Garcia, M. M., McKay, K. A. 1970. Pathogenic Microorganisms in Soil: An Old Problem in a New Perspective. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 34(2): 105–110.

Guerrero, R., Margulis, L., Berlanga, M. 2013. Symbiogenesis: the holobionte as a unit of evolution. *International Microbiology*, 16:133-143.

Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, 6(1). doi:10.1186/s40168-018-0445-0

Impson, F. A. C., Kleinjan, C. A., Hoffmann, J. H., Post, J. A. 2008. *Dasineura rubiformis* (Diptera: Cecidomyiidae), a new biological control agent for *Acacia mearnsii* in South Africa. *South African Journal of Science*, 104(7-8): 247-249.

Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, 8. doi:10.3389/fpls.2017.01617

Keane, R. (2002). Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(4), 164–170. doi:10.1016/s0169-5347(02)02499-0

Keller, R. P., Geist, J., Jeschke, J. M., & Kühn, I. (2011). Invasive species in Europe: ecology, status, and policy. *Environmental Sciences Europe*, 23(1), 23. doi:10.1186/2190-4715-23-23

Klink, C. A., Machado, R. B. 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1(1): 147-155.

Kolb, R. M., Pilon, N. A. L., Durigan, G. 2016. Factors influencing seed germination in Cerrado grasses. *Acta Botanica Brasilica*, 30(1): 87-92.

Koskella, B., Hall, L. J., Metcalf, J. E. 2017. The microbiome beyond the horizon of ecological and evolutionary theory. *Nature Ecology & Evolution*, 1: 1606-1615.

- Kulmatiski, A., Beard, K. H., Stevens, J. R., & Cobbold, S. M. (2008). Plant-soil feedbacks: a meta-analytical review. *Ecology Letters*, 11(9), 980–992. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01209.x
- Lambers, H., Shane, M. W., Cramer, M. D., Pearse, S. J., Veneklaas, E. J. 2006. Root Structure and Functioning for Efficient Acquisition of Phosphorus: Matching Morphological and Physiological Traits. *Annals of Botany*, 98(4): 693-713.
- Levine, J. M., Pachepsky, E., Kendall, B. E., Yelenik, S. G., & Lambers, J. H. R. (2006). Plant-soil feedbacks and invasive spread. *Ecology Letters*, 9(9), 1005–1014. doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00949.x
- Levine, J. M., Vilá, M., D'Antonio, C. M., Dukes, J. S., Grigulis, K., Lavorel, S. 2003. Mechanisms underlying the impacts of exotic plants invasions. *Proceedings of the Royal Society*, v. 270, n. 1517, p. 775-781.
- Lind. E. M., et al. 2013. Life-history constraints in grassland plant species: A growth-defense trade-off is the norm. *Ecology letters*, 16(4): doi: 10.1111/ele.12078.
- Ma, K.-W., Ma, W. 2016. Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. *Plant Molecular Biology*. 91: 713-725.
- Minchin, D. (2009). *Exotic Species, Introduction of. Encyclopedia of Ocean Sciences*, 332–344. doi:10.1016/b978-
- Monteiro, L. C., Verzignassi, J. R., Barrios, S. C. L., Valle, C. B., Fernandes, C. D., Benteo, G. L., Libório, C. B. 2016. *Brachiaria decumbens* intraspecific hybrids: characterization and selection for seed production. *Journal of Seed Sciences*, 38: 62-67.
- Montgomery, D. R. 2007. Soil erosion and agricultural sustainability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(33):13268-13272.
- Nsikani, M. M., van Wilgen, B. W., Gaertner, M. 2018. Barriers to ecosystem restoration presented by soil legacy effects of invasive alien N-fixing woody species: implication for ecological restoration. *Restoration Ecology*, 26(2): 235-244.

Oskarsson, M. C. R., Klutsch, C. F. C., Boonyaparakob, U., Wilton, A., Tanabe, Y., & Savolainen, P. (2011). Mitochondrial DNA data indicate an introduction through Mainland Southeast Asia for Australian dingoes and Polynesian domestic dogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1730), 967–974. doi:10.1098/rspb.2011.1395

Paine RT. 1969. A note on trophic complexity and community stability. *The American Naturalist* 103:91–93.

Pellizzaro, K. F., Cordeiro, A. O. O., Alves, M., Motta, et al. (2017). “Cerrado” restoration by direct seeding: field establishment and initial growth of 75 trees, shrubs and grass species. *Brazilian Journal of Botany*, 40(3), 681–693. doi:10.1007/s40415-017-0371-6

Pereira, O., Ferreira, L., Pinto, F., & Baumgarten, L. (2018). Assessing Pasture Degradation in the Brazilian Cerrado Based on the Analysis of MODIS NDVI Time-Series. *Remote Sensing*, 10(11), 1761. doi:10.3390/rs10111761 w

Pilon, N. A. L., Assis, G. B., Souza, F. M., & Durigan, G. (2018). Native remnants can be sources of plants and topsoil to restore dry and wet cerrado grasslands. *Restoration Ecology*. doi:10.1111/rec.12902

Pimentel, D. (2006). Soil Erosion: A Food and Environmental Threat. *Environment, Development and Sustainability*, 8(1), 119–137. doi:10.1007/s10668-005-1262-8

Pivello, V. R., Shida, C. N., Meirelles, S. T. (1999). Alien grasses in Brazilian savanas: a threat to the biodiversity. *Biodiversity and conservation*, 8: 1281-1294.

POWO (2019). "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/> Retrieved 14 August 2020."

Probandt, D., Eickhorst, T., Ellrott, A., Amann, R., & Knittel, K. (2017). Microbial life on a sand grain: from bulk sediment to single grains. *The ISME Journal*, 12(2), 623–633. doi:10.1038/ismej.2017.197

Reinhart, K. O., Callaway, R. M. 2006. Soil biota and invasive plants. *New Phytologist*, 170: 445-457.

- Reynolds, H. R., Packer, A., Bever, J. D., Clay, K. 2003. Grassroots Ecology: Plant-Microbe-Soil Interactions as Drivers of Plant Community Structure and Dynamics. *Ecology*, 84(9), 2281-2291.
- Richardson, D. M., Pysek, P., Rejmanek, M., Barbour, M. G., Panetta, F. D., & West, C. J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity Distributions*, 6(2), 93–107. doi:10.1046/j.1472-4642.2000.00083.x
- Roelofs, R. F. R., Rengel, Z., Cawthray, G. R., Dixon, K. W., & Lambers, H. (2001). Exudation of carboxylates in Australian Proteaceae: chemical composition. *Plant, Cell and Environment*, 24(9), 891–904. doi:10.1046/j.1365-3040.2001.00741.x
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2016). Microbes Drive Evolution of Animals and Plants: the Hologenome Concept. *mBio*, 7(2). doi:10.1128/mbio.01395-15
- Sampaio, A. B., Vieira, D. L. M., Holl, K. D., Alves, M., Coutinho, A. G., Cordeiro, A. O. O., Ribeiro, J. F., Schmidt, I. B. 2019. Lessons on direct seeding to restore Neotropical savana. *Ecological Engineering*, 138: 148-154.
- Sano, E. E., Barcellos, A. O., Bezerra, H. S. 2000. Assessing the spatial distribution of cultivated pastures in the Brazilian savanna. *Pasturas Tropicales*, 22(3): 2-15.
- Sano, E. E., Rosa, R., Brito, J. L. S., Ferreira, L. G. 2008. Mapeamento semi-detalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 153–156.
- Sasse, J., Martinoia, E., Northen T. 2018. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science*, 23(1): 25-41.
- Schittko, C., Wurst, S. 2014. Above- and belowground effects of plant-soil feedback from exotic *Solidago Canadensis* on native *Tanacetum vulgare*. *Biological Invasions*, 16: 1465-1479
- Silveira, F. A. O., et al. 2020. Myth-busting tropical grassy biome restoration. *Restoration Ecology*. doi:10.1111/rec.13202

- Silveira, R., de Mello, T. R. B., Silva, M. R. S. S., Krüger, R. H., Bustamante, M. M. C. 2020. Long-term liming promotes drastic changes in the composition of the microbial community in a tropical savana soil. *Biology and Fertility of Soils*. doi:10.1007/s00374-020-01504-6
- Strassburg, B. B. N., Brooks, T., Feltran-Barbieri, R., Iribarrem, A., Crouzeilles, R., Loyola, R., Latawiec, A. E., Oliveira Filho, F. J. B., Scaramuzza, C. A. M., Scarano, F. R., Soares-Filho, F., Balmford, A. (2017). Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nature Ecology & Evolution*, 1(4), 0099. doi:10.1038/s41559-017-0099
- Subbarao, K.N., Hurtado, M. P., Ono, H., Moreta, D. E., Salcedo, A. F., Yoshihashi, A. T., Ishikawa, T., Ishitani, M., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., Rondon, M., Rao, I. M., Lascano, C. E., Berry, W. K., Ito, O. (2009). Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proceedings of the Nation Academy of Sciences*, 106(41), 17302-17307.
- Teixeira, P. J. P., Colaianne, N. R., Fitzpatrick, C. R., & Dangel, J. L. (2019). Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. *Current Opinion in Microbiology*, 49, 7–17. doi:10.1016/j.mib.2019.08.003
- Van der Heijden, M. G., Bardgett, R. D., van Straalen, N. M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(3): 296-310.
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., Dufresne A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206: 1196-1206.
- Vitousek, P. M., D'Antonio, C. M., Loope, L.L. & Westbrooks, R. 1996. Biological invasions as global environmental change. *American Scientist*, 84:468-478.
- Walker BH. 1992. Biodiversity and Ecological Redundancy. *Conservation Biology* 6:18–23.
- Williams e Baruch. 2000. African grass invasion in the Americas: ecosystem consequences and the role of ecophysiology. *Biological Invasions*, 2: 123-140.
- Wubs, E. R. J., van der Putten, W. H., Bosch, M., Bezemer, T. M. 2016. Soil inoculation steers restoration of terrestrial ecosystems. *Nature plants*, 2: 16107.

Zanin, A. 2001. Revisão de *Andropogon* L. (Poaceae – Panicoideae – Andropogoneae) no Brasil. Tese (Doutorado em Botânica) – Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 401. 2001.

Zenni, R. D., Ziller, S. R. 2011. An overview of invasive plants in Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, 34(3), 431-446.

Capítulo 2 – Inoculum origin and soil legacy can shape plant-soil feedback outcomes for tropical grassland restoration

Artigo submetido para a revista Restoration Ecology

Abstract

Restoration techniques tailored to grasslands are needed to improve restoration effectiveness in tropical landscapes. In this work, we investigated the joint effects of plant-soil legacies and soil inocula from native and invaded Cerrado grasslands to test whether different microbial origins affect plant-soil feedbacks in ways that can foster restoration techniques. Using two grass species, we measured aboveground biomass, and several plant traits over two growing cycles. Species responded differently to inocula and legacies. The legacy of the invasive *Urochloa eminii* and invaded soil inocula positively affected mycorrhizal colonization. The legacy of *Diectomis fastigiata* resulted in a negative self-feedback discouraging its use in restoration. The invasive species success is in part due to its broad ecological niche, easily coping with soil differences. Our research points to the possibility of using soil inocula and legacies to aid restoration efforts in the tropics; allowing restorers to target desired functional trait stimulation for a given ecosystem.

Key-words: plant-soil feedback, soil inoculation, legacy effects, invasive species, restoration techniques, Cerrado.

Implications for practice

- Soil inoculation should be used for the restoration of non-forested ecosystems in the tropics as a soil improvement tool enriching the soil with local microbes
- Restoration practitioners need to consider carefully soil feedbacks, especially from annual plants, ensuring they restore the soil as well as the vegetation
- Soil legacies must be considered in restoration planning in order to generate long-term restoration success, thus maximizing cost-benefits.

1. Introduction

One of the main challenges of current restoration efforts in tropical areas is to develop cost-effective techniques for the restoration of non-forested landscapes (Silveira et al., 2020). Most of the restoration knowledge currently available was designed for forests (Overbeck et al., 2013); and temperate ecosystems (Hartemink 2002) knowledge for grasslands and particularly tropical grasslands is largely lacking (Overbeck et al. 2015). At the present, many techniques are being tested in tropical grasslands, from direct seeding (Coutinho et al. 2018), to top-soil transfer (Pilon et al. 2019), with varying degrees of success and applicability.

A relatively novel restoration technique being explored is the use of microbes to foster restoration initiatives (Kardol et al. 2009; Wubs et al. 2016), given they affect plant-performance above and belowground (Kardol & Wardle 2010). Top-soil inoculation is an example of such technique to improve restoration (Wubs et al. 2016); consisting on the transfer of small amounts of top soil, containing microbiota from a natural area, to an area that will be restored. It considers that the transfer of such microbes is capable of stimulating native plant regeneration. Its theoretical framework postulates that microbes present in the soil are capable of improving plant colonization through multiple pathways, from pathogen suppression to growth stimulation (Ortíz-Castro et al. 2009). Soil inoculation has been used as an effective tool to promote growth of target grassland species in the Netherlands (Carbajo et al. 2011), where it has been shown that inoculant origin is capable of directing final desired environments towards grasslands or heathlands, demonstrating the strong role microbes can have in community assembly (Wubs et al. 2016).

Associations developed by plants with microbes during their lifetime which can last in the soil even after the focal plant has died, termed legacy effects (Grman & Suding 2010), mean the colonization history of a soil patch can influence the future outcomes of plant succession (Kardol et al. 2007). Legacy effects act on soil physical, chemical, and biological properties (Kardol et al. 2007; Corbin & D'Antonio 2012). Soil legacies can be an important factor regulating plant community dynamics, hence, they can be used to target plant community development improving the management of restored ecosystems (Wubs et al. 2019). Wubs et al. (2019) have shown that in temperate systems, plant community composition has long-lasting effects on both plant and soil communities.

Plants grow in the presence of several groups of organisms in the soil, from bacteria to fungi (Compant et al. 2019); altering microbial populations due to associations they develop during their lifetime (Haichar et al. 2008); and developing positive, negative or neutral feedbacks (Hassani et al. 2018). Of particular interest in the tropics are the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which allow plants to obtain nutrients from the soil, besides helping in soil water flow (Delavaux 2017). Moreover, soil microbial populations are capable of stimulating biomass production (Bailly & Weiskopf 2012) and pathogen suppression (Beneduzi et al. 2012) or build-up (Packer & Clay 2002). Therefore, microbes can be great allies in restoration ecology (Trevelline et al. 2019), for instance, AMF inoculation in restored plots yields a gain in biomass averaging 1.7 times that of non-inoculated plots (Neuenkamp et al. 2018).

Soil inocula from beneath invaded and native plant communities have both been demonstrated to be biomass enhancers compared to sterilized soils (Phillips et al. 2020). Invasive species usually tend to develop more positive feedbacks compared to native species (Klironomos 2002), perhaps explaining in-part their success in biological invasions. Many factors influence the interplay between plants and microbes. For instance, late successional species are more likely to be positively affected by feedbacks with soil microbes, whereas early successional plants and annuals tend to be negatively affected (Middleton & Bever 2012). This happens most likely due to a trade-off in resource investment between defenses and growth (Lind et al. 2013), making these early-successional species more susceptible to pathogens, (Kardol et al. 2006) which accumulate over-time.

It is possible to develop strategies that encompass plant-microbial interactions to reach the desired final ecosystems of interest, specially the non-forested ones. These techniques could improve current common Cerrado grassland restoration techniques, like direct seeding (Coutinho et al. 2018). Within existing direct seeding initiatives in the Cerrado *Diectomis fastigiata* (Sw.) P.Beauv, a cryptogenic pantropical annual species (PWO, 2020; CAD Welker, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, personal communication), is commonly used and dominates the plant cover in the beginning of grassland restoration (Coutinho et al. 2019). Restoration plots are also jeopardized by the invasion of African grasses, noteworthy *Urochloa eminii* (Mez) Davidse (Pivello et al. 1999; Coutinho et al. 2019). Currently no studies have investigated the role which soil inoculation

and legacy effects could have on promoting the successful growth of native over non-native grass species.

Given the importance of understanding plant-microbial interactions, we investigated the effects of native and invasive soil inocula and of sterilized soil, upon *U. eminii* and *D. fastigiata* analyzing functional traits and using aboveground biomass as a proxy for performance. We also investigated both species legacy effects in order to understand the different outcomes the species can develop in terms of soil conditioning, and if their presence can be detrimental or beneficial for restoration efforts. We hypothesized that the native inoculum would be beneficial for the species used in restoration, and that the invasive species would be indifferent to inoculum origin, both species should be negatively affected by plain sterilized soil due to a lack of microbial diversity in them. The annual *D. fastigiata* should be negatively affected by its own-legacy due to a build-up of pathogens and annual species generally presenting trade-offs between defenses and growth. The invasive *U. eminii* species should be favored by its own-legacy, as invasive species usually present self-positive-feedback. Regarding inoculum-legacy interactions, we believe the interactions will lead to multiple different effects depending on treatment combination, with an overall less pronounced effect on the invasive *U. eminii*.

2. Methods

2.1. Soil sampling

Soil was collected at the Estação Ecológica de Itirapina (EEI), a protected area where scientific experimentation is encouraged. The area is a sandy-soil Cerrado remnant located in the middle of the state of São Paulo, Brazil, in November 2018. In total 570 kg of soil was collected from the upper 20 cm of a firebreak, which are areas around the park devoid of vegetation, which inhibit the spread of fire. No vegetation grows on firebreaks due to constant soil upturning and management. Native soil was collected at the EEI, from a native grassland, containing several grass species, although no *D. fastigiata* were readily observed at the collection site. The invaded soil was collected from a highly disturbed patch at EEI, heavily colonized by *U. eminii*.

The soil was put in five liter pots, lined with bidim® blanket to avoid soil leaching, and finally transferred to six liter plastic bags. Pots were then transported to the

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), at the Universidade de São Paulo (USP), where they were sterilized with gamma radiation, in a Cobalt-60 Irradiator, with effective minimal radiation of 40 kGy according to Buchan et al. (2012). One day prior to the beginning of the experiment, soil beneath native grassland and beneath a grassland invaded by *Urochloa eminii* was collected in order to inoculate pots.

2.2. First phase of the experiment: inoculation and soil conditioning

A total of 96 pots were prepared with 6 kg of gamma-irradiated soil each, to each 32 pots we inoculated 120 g of native soil, 120 g of invaded soil and finally 120 g of sterilized soil, accounting for soil manipulation. After inoculation half the numbers of pots with each inoculum (16) were sown with *Diectomis fastigiata* seeds, a species used in direct seeding Cerrado restoration efforts (Coutinho et al. 2018). The other half were sown with *Urochloa eminii* seeds, an African invasive species widespread in Brazil (Pivello et al. 1999). Pots were watered daily and thinned out to six individuals. Pot position was randomized in the greenhouse every three weeks. Plants were grown at the greenhouse under natural light and mean daily temperature conditions - for Campinas this is 22.1° C in January and 15.7 in July, the shortest days of light in winter have less than 12 hours of light and the longest light days in the summer have more than 13 hours of light. After 14 weeks, plants were collected and the two tallest individuals from each pot were selected for subsequent functional attributes and biomass analyses.

2.3. Second phase of the experiment: soil legacies

After removing all individuals from each pot, each treatment was divided in two and each half was sown with either *U. eminii* or *D. fastigiata* in 8 pots for each treatment in May 2019. In the second week after sowing, when seedlings emerged, a small wire was placed next to the tallest individual in the pot, to mark the individual for continuous growth follow-up, thinning of plants occurred as previously cited, collecting the marked individual and the tallest individual left in the pot. The experimental design is shown in figure 2.1.

2.4. Aboveground biomass and functional traits measurements

Two individuals from each pot were used for analyses, thus, each pot had two repeated measurements. Functional traits were measured according to the standard methods described in Pérez-Harguindeguy et al. (2013).

2.4.1 Aboveground biomass

Aboveground biomass was measured collecting the aboveground part of the selected individuals (leaves and rhizome) after harvesting the plants. Leaves were scanned to measure leaf mass per area and then dried. Rhizomes and excess leaves were stored in a paper bag and left to oven dry at 60 °C for three days, when they were weighed. Leaves and rhizome weight were then added to compound total aboveground biomass.

2.4.2 Leaf mass per area (LMA)

In the first phase, all leaves of the two tallest individuals in each pot were collected, and in the second phase of the experiments, LMA was obtained using four leaves from each of the two individuals measured in each pot.

2.4.3 Specific root length (SRL)

Root sampling happened through gently excavating the soil beneath the same two selected individuals following the roots in order to avoid breaking them, and keeping a high degree of certainty regarding root origin. For scanning, roots were placed in a transparent plastic tray covered with a water film and then scanned and analyzed with WinRHIZO™ Pro 2017a software.

2.4.4 Plant size

Plant size was measured as number of leaves, final plant height and number of clones. All leaves were counted in each one of the two selected individuals; plant height, which was measured just before plant harvesting, was done from the base of the plant in the soil to the highest point of the plant; and number of clones, which were counted as plants were thinned.

2.4.5. Arbuscular Mycorrhizal Fungi colonization (AMF%)

Root sampling for mycorrhizal colonization analysis was conducted after sampling for SRL. Fine roots were collected in each pot, regardless of which individual they belonged to, to a total of at least 30 cm of roots per pot whenever possible. Six samples from each treatment in the first phase and four samples from each treatment in the second phase were collected. Methodology for staining is available in the supplementary material.

2.5. Soil analyses

Soil samples were sent to the Department of Soil of the Universidade Federal de Viçosa (UFV) for analysis. Air-dried soil samples from three pots per treatment in the first phase of the experiment and mixed soil samples from three pots for the second phase of the experiment were collected and sent for analysis at the soil laboratory at UFV. Methodologies used for soil measurements are available in the supplementary material

2.6. Statistical analyses

In order to understand general plant responses to the treatments, we performed Principal component analyses (PCA) jointly and separately for each. In order to compare variables among treatments, we performed bootstrap analyses. All variables were compared only between pairs of the same species, within the same experimental phase (conditioning or legacy phase). The metric used consisted in the mean group difference, repeated 10.000 times, creating a normal distribution, which can be compared to the measured values.

Data were analyzed using R software version 3.6.1. (R Core Team 2013). Packages ggplot2 (Wickham 2016) and FactoMineR (Le et al. 2008) were used for data visualization. Packages Rsampling (Prado et al. 2016), shiny (Chang et al. 2020) and PerformanceAnalytics (Peterson & Carl 2020) were used for performing bootstrap analysis in order to make pair-pair comparisons.

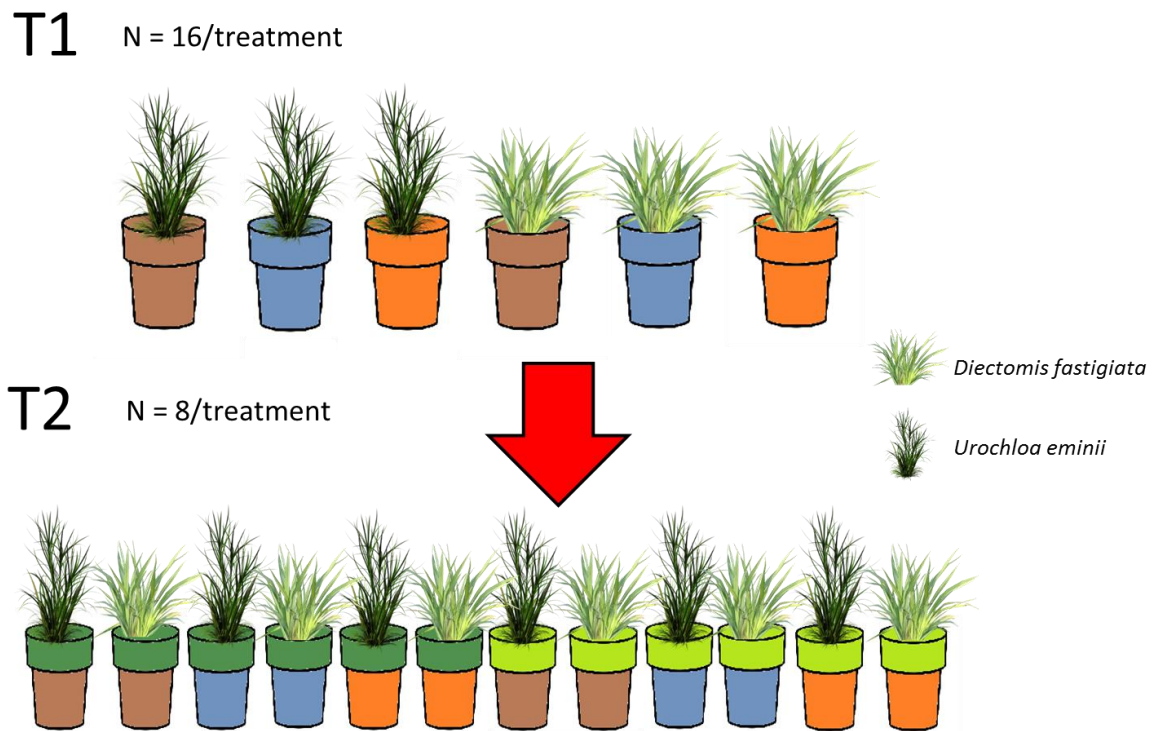


Figure 2.1. Schematic design of the experiment. T1 corresponds to the conditioning/inoculation phase, pot color represents soil inoculum. T2 corresponds to the legacy phase, color in the base of the pot represents inoculum from T1, and color in the top of the pot represents previous legacy, dark green representing *U. eminii* legacies and light green *D. fastigiata* legacies.

3. Results

3.1. Conditioning phase

A PCA with all the treatments and all traits from the conditioning phase (Figure 2.2) generated a first axis of (PC1) explaining 56.2% of the variation and PC2 accounting for 25.1%, together they represented 81.3% of the variation. *Diectomis fastigiata* and *U. eminii* were separated along the second axis of the PCA. *Urochloa* was mostly dispersed in the positive half whereas *Diectomis* dispersed mostly in the negative half. *Diectomis* tended towards higher height and biomass values, and *U. eminii* tended towards higher LMA, especially in the sterilized-soil treatment. *Diectomis fastigiata* in sterile soil showed the highest SRL values, segregating from other *D. fastigiata* treatments, towards negative PC1 values, meaning a lesser investment in biomass production. The PCA shows the two species allocate resources in different ways; hence, each species was hereafter treated independently.

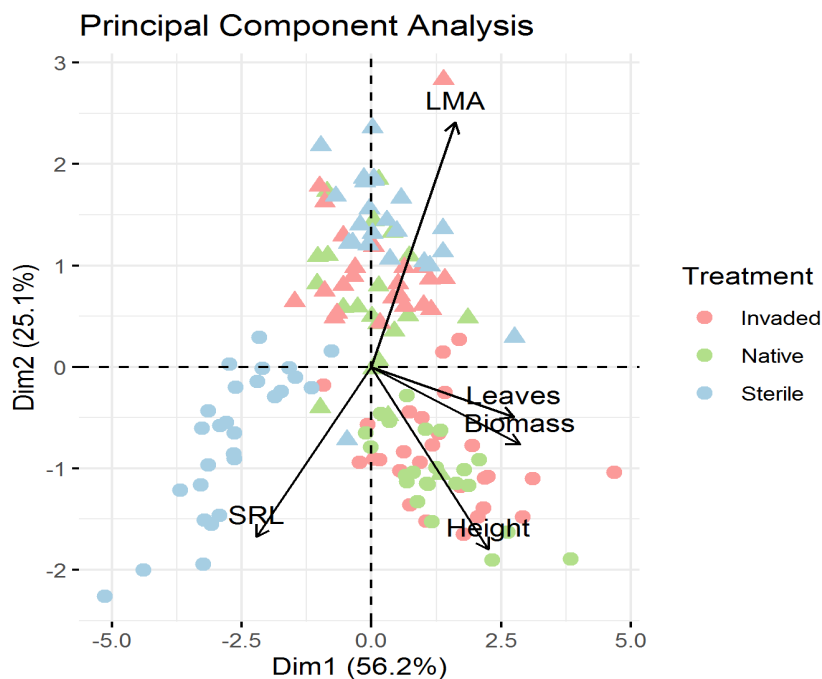


Figure 2.2. PCA with plant functional traits and biomass from the conditioning phase of the experiment. Triangles represent *Urochloa eminii* and circles represent *Diectomis fastigiata*. Colors indicate inoculum origin.

We observed that *D. fastigiata* performed better when inoculated with living soil than when grown on sterilized soil, presenting higher biomass and height values ($p < 0.0001$) (Figure 2.3-A; Table 2.S1). *Diectomis fastigiata* grown in the sterilized treatment showed smaller values for all the measured traits, except values, when compared to both invaded and native soil inoculum treatments (Figure 2.3-E). Mycorrhizal colonization could not be compared to the sterile treatment due to insufficient root production.

Regarding the growth and functional traits of *U. eminii*, LMA values were different among all three treatments (Table 2.S1), being highest for the sterile treatment ($p < 0.0001$), followed by plants grown with the invaded ($p = 0.011$) and then the native soil inoculum ($p = 0.017$). *Urochloa eminii* grown with native soil inoculum showed higher SRL values compared to the other treatments ($p = 0.04$). Although grown in completely sterilized soil, *U. eminii* had much lower mycorrhizal colonization than the other two treatments ($p < 0.0001$). No other differences were observed amongst *Urochloa eminii* treatments.

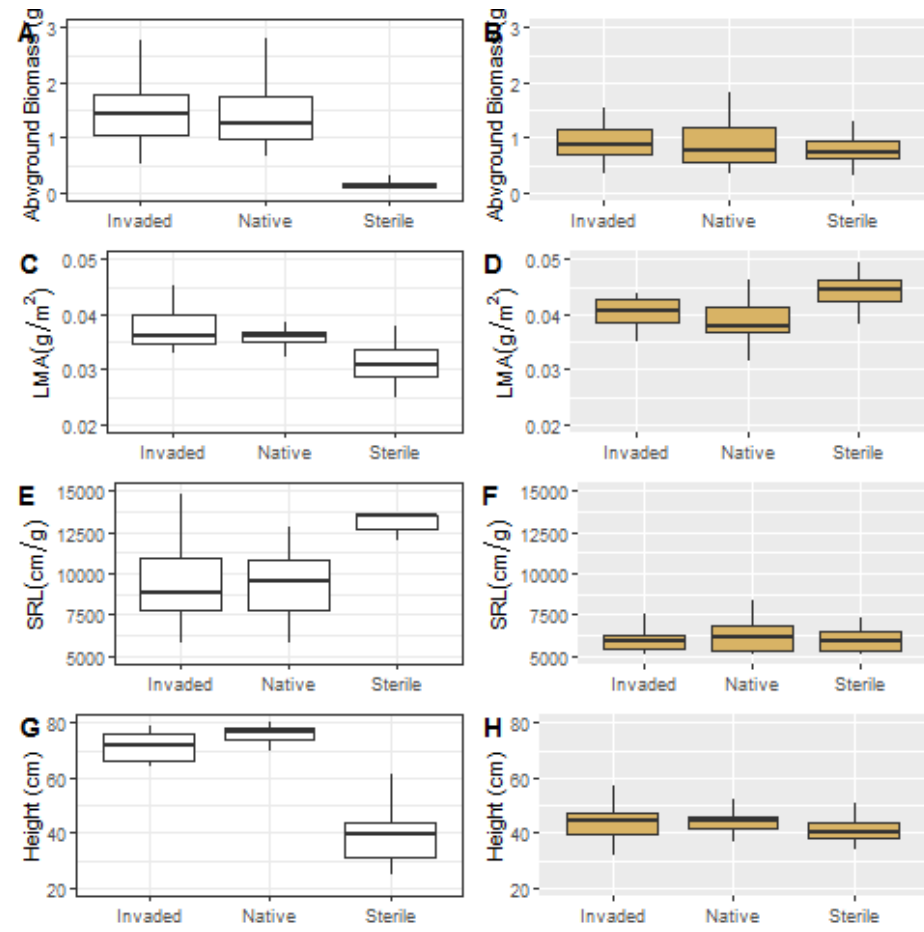


Figure 2.3. Functional traits of *D. fastigiata* (white; left) and *U. eminii* (orange; right) grown in the conditioning phase in sterilized soil with different soil inoculi: Aboveground biomass (A, B); leaf mass per area (LMA) (C, D), specific root length (SRL) (E, F) and final plant height (G, H).

Regarding soils, after the first phase, they tended to be grouped by inocula rather than species, the exception being the invaded soil inoculum treatment which dispersed along the second axis of the plot, with a high variation in cation exchange capacity (T) (Figure 2.4). PC1 accounted for 64.1% of the variation whereas PC2 accounted for 19.4%, 83.5% of the variation in soil could be explained by these two axes. Sterilized soils had the highest levels of phosphorus and tended at the same time to have lower values of sum of bases (SB), base saturation (v) and pH measured with water (pH.H₂O), opposing native soil inoculum treatments, values are shown in table 2.S4.

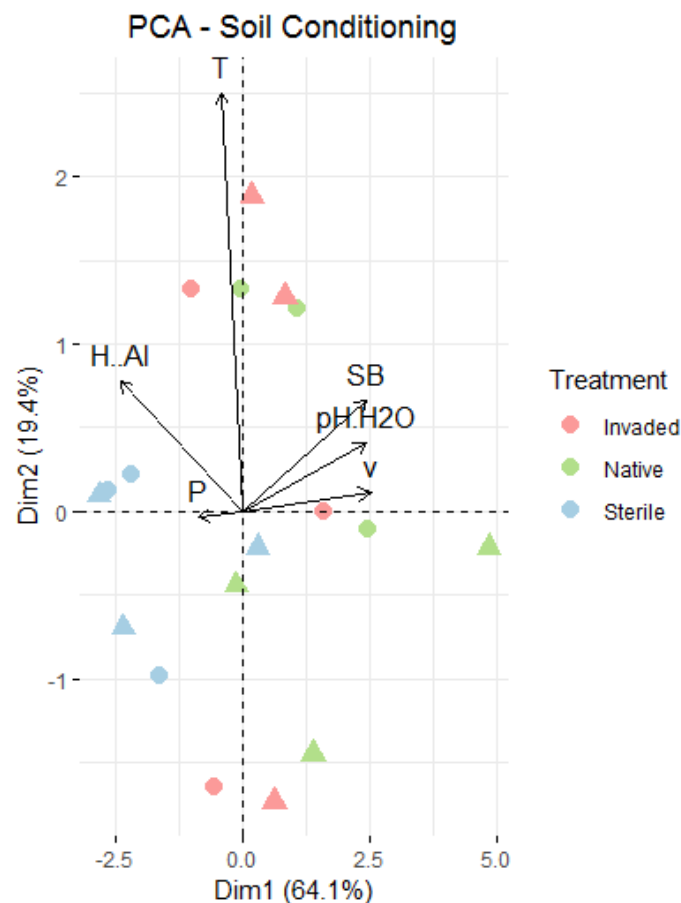


Figure 2.4. Principal component analysis from soils in the conditioning phase. Each point represents a sample, triangles represent *U. eminii* soils and circles represent *D. fastigiata* soils. Colors indicate which inoculum was inoculated into pots. T = cation exchange capacity, SB = sum of bases, pH.H₂O = pH measured in water, v = base saturation, P = Phosphorus, H.Al = potential acidity.

3.2. Conditioned phase – Legacies

Survival of individuals in the legacy phase is given in table 2.1. A PCA regarding soil chemistry explained 71.2% of the variation with axes 1 and 2 only. *Diectomis fastigiata* and *U. eminii* soils segregated mostly along the first axis of the PCA, *D. fastigiata* towards the negative side of PC1 and *U. eminii* towards the positive side (Figure 2.5). Soils where *U. eminii* grew in the second phase were concentrated towards positive PC1 and PC2 axes, the exception being *U. eminii* soil with *D. fastigiata* legacy, which sided with soils where *D. fastigiata* had grown, towards negative PC1 values. Soil P and pH.H₂O were the variables that segregated soils the most, phosphorus was negatively associated with pots where *U. eminii* was grown in the second phase. All the three treatments located within extremes of the figure had *D. fastigiata* grown in the second phase, the treatments were *Diectomis* legacy with

sterilized and invaded soil inocula, and *Urochloa* legacy with invaded soil inoculum. We can see that *U. eminii* legacies scatter around lower base saturation (v) and sum of bases values. Values are shown in Table 2.S5.

Table 1. Survival of individuals (in percentage) used for statistical analysis according to each treatment, in the legacy phase. The species line, corresponds to which species grew in the legacy phase of the experiment, the legacy line indicates which species left a legacy in the pot, inoculum corresponds to the inoculum added to the soil in the conditioning phase: **I** corresponds to invaded-soil inoculum, **N** corresponds to native-soil inoculum and **S** corresponds to sterilized-soil inoculum. Each treatment consisted of 8 pots and two individuals per pot, to a maximum of 16 individuals per treatment.

Species		<i>Diectomis fastigiata</i>						<i>Urochloa eminii</i>					
Legacy		<i>D. fastigiata</i>			<i>U. eminii</i>			<i>U. eminii</i>			<i>D. fastigiata</i>		
Inoculum		I	N	S	I	N	S	I	N	S	I	N	S
Survival		81.25%	62.5%	18.75%	87.5%	93.75%	81.25%	100%	87.5%	87.5%	100%	68.75%	93.75%

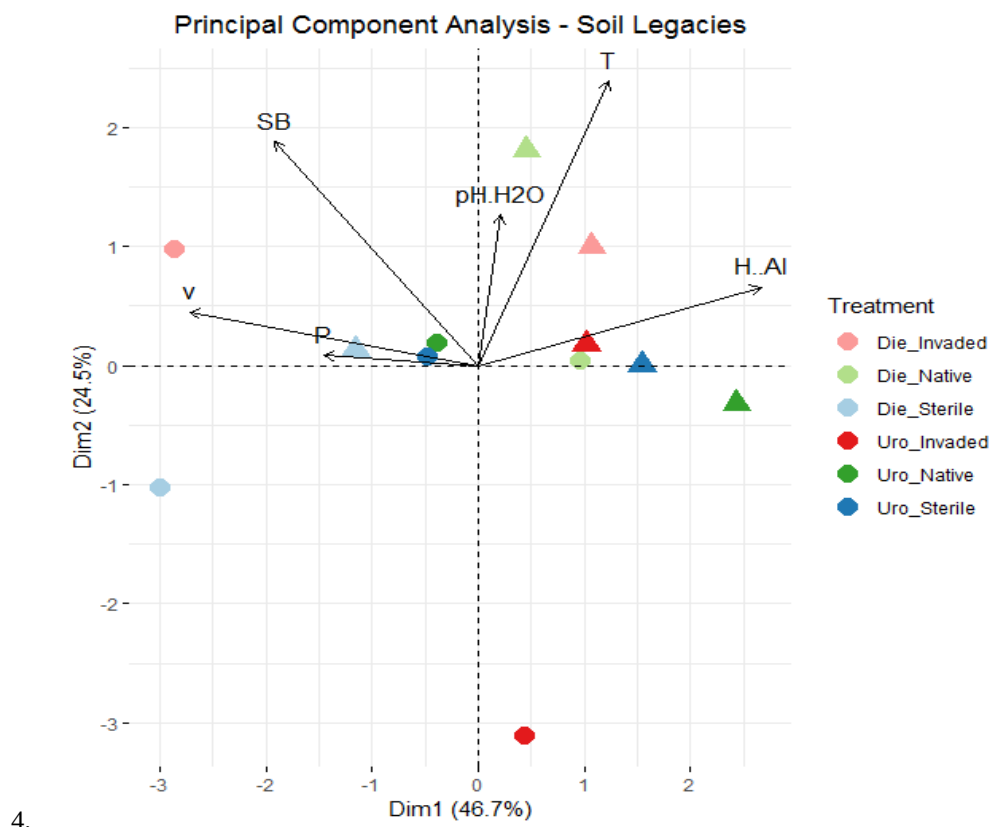


Figure 2.5. Principal Component Analysis of soils from the legacy phase. Samples were compound containing soils from three pots. Point shapes represent the species grown in the legacy phase, circles represent *D. fastigiata* and triangles represent *U. eminii*, colors indicate which plant grew in the conditioning phase (soil legacy) combined with the soil inoculum, lighter colors with the prefix 'die_' indicate *D. fastigiata* legacies whereas darker colors with the prefix 'uro' indicate *U. eminii* legacies.. pH.H2O = pH measured in water, T = cation exchange capacity, H.Al = potential acidity, P = Phosphorus, v = base saturation, SB = sum of bases.

3.2.1. *Diectomis fastigiata*

Diectomis fastigiata with self-legacy and native soil inoculum had lower trait values compared to all other treatments for: aboveground biomass, height, number of leaves and AMF% (Table 2.S2). *Diectomis fastigiata* grown in un-inoculated sterilized soil with *U. eminii* legacy showed the highest values of aboveground biomass, LMA and number of leaves compared to all other treatments (Figures 7; 2.S1). Height of *D. fastigiata* was also higher in sterilized soil inoculum with *U. eminii* legacy than in all treatments except for *D. fastigiata* legacy with invaded soil inoculum (Figure 2.S1). The sterile inoculum with *U. eminii* legacy did not differ in mycorrhizal colonization compared to the other *U. eminii*-legacy treatments (Table 2.S2).

Native soil inoculum was associated with lower mycorrhizal colonization (Table 2.S2) of *D. fastigiata* roots ($p < 0.0001$). *Diectomis fastigiata* legacies seem to be associated with higher SRL values when compared to *Urochloa* legacies with living soil inocula (Table 2.S2; Figure 2.6). Growing with native soil inoculum and self-legacy, *D. fastigiata* presented the smallest values of AMF%, whereas with self-legacy and invaded soil inoculum, AMF% was higher than for *Urochloa* legacy with native inoculum and equal to the other *Urochloa*-legacies treatments (Figure 2.6).

Table 2.1. Survival of individuals used for statistical analysis according to each treatment, in the legacy phase.

Species	<i>Diectomis fastigiata</i>						<i>Urochloa eminii</i>					
Legacy	<i>D. fastigiata</i>			<i>U. eminii</i>			<i>U. eminii</i>			<i>D. fastigiata</i>		
Inoculum	I	N	S	I	N	S	I	N	S	I	N	S
Survival	13	10	3	14	15	13	16	14	14	16	11	15

The species line, corresponds to which species grew in the legacy phase of the experiment, the legacy line indicates which species left a legacy in the pot, inoculum corresponds to the inoculum added to the soil in the conditioning phase: **I** corresponds to invaded-soil inoculum, **N** corresponds to native-soil inoculum and **S** corresponds to sterilized-soil inoculum. Each treatment consisted of 8 pots and two individuals per pot, to a maximum of 16 individuals per treatment.

3.2.2. *Urochloa eminii*

In *Urochloa* most differences were seen in comparison to the sterilized soil inoculum treatments. Self-legacy with sterilized soil rendered higher aboveground biomass, LMA and height values compared to all pots with *D. fastigiata* legacy, and at the same time, also presented lower SRL values (Table 2.S3). *Urochloa eminii* grown with *D. fastigiata* legacy in sterilized soil presented lower aboveground biomass than all other *U. eminii* legacies treatments, as well as lower LMA and height than *U. eminii*-legacies with invaded and sterilized soil inocula (Figures 7, 2.S1). The *U. eminii* treatment with *D. fastigiata* legacy and sterilized soil inoculum also showed similar AMF% compared to *U. eminii* legacy in sterilized soil and *D. fastigiata* legacy with native soil inoculum.

Urochloa eminii with *Diectomis* legacy and invasive soil inoculum had higher SRL than all *Urochloa*-legacy treatments (Figure 2.7), and the only difference when compared to other *D. fastigiata* legacies was in mycorrhizal colonization, which was higher ($p < 0.0001$) (Table 2.S3). *Diectomis fastigiata* with both native and sterilized inocula showed lower AMF% levels than all other *Urochloa* legacy treatments, including sterile *U. eminii* and *D. fastigiata* legacy with invaded soil inoculum. The latter and the *U. eminii* legacies with both native and invaded soil inocula (i.e. living soil inocula), responded in a similar way in respect to AMF%, the three being equal

among themselves, presenting higher values of AMF% than the other treatments (Figure 2.6).

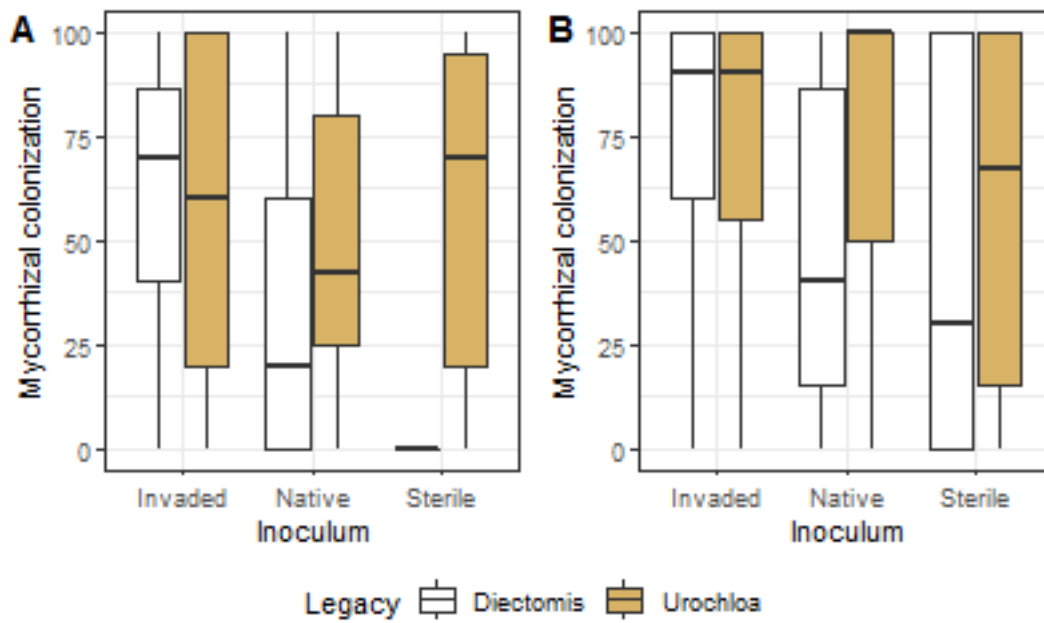


Figure 2.6. Mycorrhizal colonization for the second phase of the experiment. On the left data from *D. fastigiata* is shown and on the right, data from *U. eminii*. White boxes represent *D. fastigiata* legacies and orange boxes represent *U. eminii* legacies.

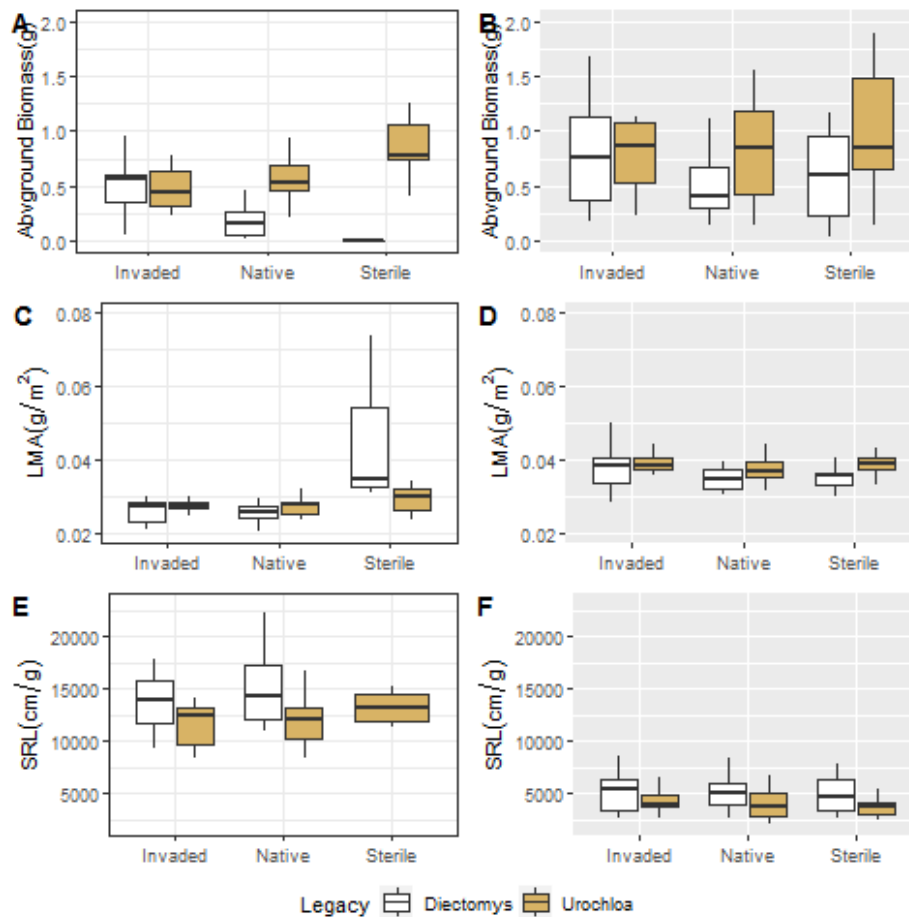


Figure 2.7. Functional traits for *D. Fastigiata* and *U. eminii* during the legacy phase of the experiment. On the left side results are presented for *D. fastigiata* and on the right side for *U. eminii*. Legacies are represented by box color, white corresponding to *D. fastigiata* legacies and orange to *U. eminii*. On the x axis labels we can see received inoculum during the conditioning phase. A and B correspond to aboveground biomass, C and D to leaf mass per area (LMA) and E and F to specific root length. *SRL in graph E does not show for *D. fastigiata* legacies because values were way out of range compared to others, starting well above 100.000 cm/g.

30 4. Discussion

31 Soil legacies and inoculum origin are capable of altering plants responses to
 32 the environment. *Diectomis fastigiata* was benefitted by soil inoculation. Each species
 33 legacy was different, and stimulated different traits. *D. fastigiata* legacies stimulated
 34 finer root production while *U. eminii* legacies stimulated mycorrhizal colonization,
 35 pointing to the possibility of using plant legacies as drivers for desired functional trait
 36 goals in restored ecosystems. *Urochloa eminii* and *D. fastigiata* grown in sterilized soil
 37 with *U. eminii* legacy presented the highest average aboveground biomass values,
 38 indicating some grasses might be benefitted by lower diversity inocula. The origin of

the inoculum affected the net feedback response; *D. fastigiata* was negatively affected by its own legacy; an effect that was overcome by the presence of invaded soil inoculum, with roughly the same aboveground biomass production compared to those grown with *U. eminii* legacies. Overall results indicate that the presence of *U. eminii* with its subsequent removal should not constitute an impediment for the establishment of fast-growing grasses in ecological restoration regarding its microbial legacy effects. Legacies and inocula are possible tools to be used in tropical settings aiding grassland restoration techniques. However, further studies are needed to evaluate the legacy effects of exotic grasses on the establishment and growth of native slow-growing grasses.

4.1. Soil inoculation effects and mycorrhizal responses

In the conditioning phase, we aimed to test if the origin and presence of the inocula affected plants, more specifically, if native soil inoculum would benefit *D. fastigiata*, a species used in ecological restoration projects in Neotropical savannas (Coutinho et al. 2018; Sampaio et al. 2019). *Diectomis fastigiata* was benefitted by the presence of soil inocula regardless of their origin, with soil sterilization hindering its development. This is in line with recent evidence provided by Phillips et al. (2020), where a native Chaparral shrub was indifferent to inoculum origin, although they do not propose mechanisms for this. We believe that the presence of microorganisms positively affects *D. fastigiata*, allowing it to obtain nutrients more effectively, the presence of one mycorrhizal species alone (*Glomus intraradices*) is capable of transferring organic N and stimulate plant growth (White et al. 2015). Soil inocula here likely had thousands of different microbial and fungal strains, which likely helped plant nutrient acquisition and development.

Negative effects from soil sterilization were amplified in the legacy phase, leading to a strong negative feedback, which induced high plant mortality. *Diectomis fastigiata* probably managed to grow more in the conditioning phase because of the nutrients released from the microbial biomass during the sterilization process (McLaren 1969), or nutrients available in the soil. Lacking microbes to cycle and make nutrients available, nutrient concentration availability of the sterilized treatment diminished with time due to plant uptake, leading to nutrient depletion (Bennett & Klironomos 2019) and poor plant development. It is likely that, as other plants, *D. fastigiata* needs to

associate with microbes in order to obtain a satisfactory mineral nutrition from recalcitrant sources (Jacoby et al. 2017).

Urochloa eminii was largely indifferent to inoculum origin, as predicted, yet surprisingly, sterilized-soil self-legacy benefitted *U. eminii* plants the most, even with lower AMF% compared to living inocula treatments. Mycorrhizal colonization in the sterilized treatment by itself indicates that contamination occurred, as it was expected to have no colonization. Contamination by mycorrhizal fungi likely originated in fine dust present in the purchased seed mix, but most likely contamination also occurred for both species from microbes present in the seed surface as well.. Searching the literature we found three mutually synergistic possibilities to explain high biomass production for sterilized soils where *U. eminii* grew: 1) AMF spores introduced with seeds probably had a tight association developed along the years between mycorrhizal strains and *U. eminii* in the seed production site, as specialization occurs as time goes by, with selection of preferred strains, leading to more efficient associations (Rúa et al. 2016); 2) invasive species, usually associate with generalist widespread mycorrhizal fungi (Moora et al. 2011) establishing said associations with ease; and 3) Wagg et al. (2014) found that in mixed species assemblages, after manipulating microbial diversity levels, grasses seemed to be benefitted by low diversity microbial communities. Put together, this can explain, although not mechanistically, why both species produced more biomass with sterilized *U. eminii* legacies, which contained a small fraction of an inoculum. In this experiment we showed that a simpler microbiota is capable of stimulating higher biomass production than a putatively more diverse inoculum, in a monoculture. If proven, this relationship between lower microbe diversity and grass-biomass production could have direct implications for the restoration of heavily degraded areas, such as former mining sites; it would be advisable to initiate restoration of those areas with grasses. Benefits provided by low diversity inoculum for grasses should be investigated possibly affecting the way we understand grass physiology as well.

Urochloa eminii legacies and invaded inocula rendered high levels of root mycorrhizal colonization for both species, in line with evidence that *U. eminii* is a very efficient AMF propagator, effectively changing the soil microbiota; it is even used in laboratories for mycorrhizal spore propagation (Banuelos et al. 2013). Recent evidence also points to *U. eminii* ability to accumulate spores in invaded Cerrado areas (Leite et

al. 2019); hence, any living soil in which *U. eminii* has grown should harbor high amounts of mycorrhizal spores, ultimately affecting future colonizers of this soil patch.

Diectomis fastigiata improved development with *U. eminii*-associated legacies and soil inocula could have been caused by an effect of higher availability of mycorrhizal spores, or even other microorganisms. Mycorrhizal colonization is capable of overcoming negative plant-soil feedbacks, via plant immune system stimulation (Wang et al. 2019; Cameron et al. 2013). Spore diversity can be an important factor positively influencing mycorrhizal colonization (Fitzsimons & Miller 2010) and high spore loads lead to elevated mycorrhizal colonization (Khakpour & Khara 2012). Ultimately, the origin of inoculated soil, can affect net plant response (Ma et al. 2018), as demonstrated here, directly affecting plants ability to recruit available microorganisms. We also acknowledge that although our results point to a strong effect caused by mycorrhizal fungi, we cannot attest for sure observed effects are definitely caused by mycorrhizal fungi and not by other organisms present in the soil. Understanding the biological influences of inocula, and especially of mycorrhiza, in species used for restoration is necessary to better predict outcomes and influence the system in desired ways.

4.2. Legacy effects

Diectomis fastigiata had a broader range of responses regarding treatment combinations, especially with self-legacy. *Diectomis* legacies stimulated the production of lower LMA and higher SRL compared to *U. eminii* legacies, this however, had little effect in either species biomass production, although both traits are considered to be acquisitive. This indicates the responses in terms of biomass production cannot be attributed to variation in these traits alone, indicating, microorganisms probably exert more influence towards biomass production than variation in morphological traits alone. Other plant size traits measured were not good predictors of biomass investment, and therefore are not discussed in detail.

Regarding *D. fastigiata* grown with self-legacy and native inoculum, initial positive effects from soil inoculation in the first phase disappeared, and a self-negative feedback emerged. This effect could have been caused by a build-up of host-specific pathogens (Mills & Bever 1998), or other natural enemies (Kardol et al. 2007), as is expected that native inocula harbor more pathogenic organisms because native soils

usually have higher plant diversity. Pathogens could even be targeting soil mycorrhiza (Bennett & Klironomos 2019) as we observed a considerable smaller mycorrhizal presence in this treatment. Kulmatiski et al. (2008) in a meta-analysis found that there is a trade-off between fast growth rates and enemy defenses for annual species. Pathogen build-up through one or more plant cycles could explain the observed negative feedback for the annual *D. fastigiata*. This is in accordance to initial expectations the annual *D. fastigiata* would be more impaired by its own legacy, although we punctuate that impairment depends on inoculum origin.

Urochloa eminii legacies were no different from *D. fastigiata* legacies in terms of biomass production for *U. eminii*; making it difficult to assume positive feedbacks were happening. We also acknowledge that given that species grew in warm weather during the first phase and cooler weather during the second, this likely affected overall biomass production, for all plants. That is to say, the absence of a noticeable positive feedback might lie in external causes; hence, we consider *U. eminii* to present neutral-to-positive feedbacks, irrespective of soil legacy, with effects being strengthened by low diversity inocula. This is not in accordance with previous hypothesis that the invasive *U. eminii* would benefit itself; it is rather indifferent to inoculum origin.

4.3. Ecological considerations and restoration applications

Soil chemistry indicates species interactions with soils leave some sort of signature in terms of soil characteristics, probably associated to resource-uptake strategies (Waring et al. 2015) and interactions with microbes. There seems to be a complex interplay between inoculation, legacies and species identity, but due to the circumstantial nature of the evidence provided here, generalizations are complicated, and further investigations are needed.

The combination of distinct inocula and legacies can result in different outcomes. These outcomes are directly associated to each species ability to recruit and interact with soil microorganisms. *Diectomis fastigiata*, as an annual species, is more sensitive to negative effects of different inoculum-legacy combinations than the invader *U. eminii*, as initially hypothesized, showing a wider range of variation in trait responses to different treatments. *Urochloa eminii* on the other hand, had little variation in functional traits, presenting overall a neutral-to-positive feedback. In the legacy phase

of the experiment, we found that the species has a trade-off in investments on LMA and SRL with no associated effects in biomass production. This helps demonstrate that part of the reason *U. eminii* is a successful invader lies in its ability to tolerate differences in soil history and changes in its functional traits, presenting a satisfactory performance in a range of conditions, meaning it has a broad ecological niche. Although it is a widespread invasive species, this study indicates the soil changes posed by *U. eminii* do not cause any sort of deficit for *D. fastigiata*, they actually benefit the species. Future studies should test if *U. eminii* presents negative effects for combinations of multiple native species.

The negative self-feedback observed for *D. fastigiata*, indicates it would probably not dominate the system for the next growth cycle. We highly recommend divesting from using *D. fastigiata* in ecological restoration, owing to the uncertainty regarding the species origin (Filgueiras 1988) as well as its self-negative feedback. We urgently need to invest in research on perennial grass species which have more chances of presenting no negative self-legacy (Koziol et al. 2018) and are more likely to be benefitted by inoculation (Middleton and Bever 2010), improving restoration efforts. Our study shows the importance of considering plant-soil feedbacks when planning for restoration of native systems.

The effect of *D. fastigiata* legacies inducing higher SRL indicates there is a window of possibility to use plant legacies in restoration efforts, as suggested by Brinkman et al. (2017) for fen meadows. It can be possible to target desired functional traits of a restored community, planning restoration to encompass species succession or substitutions in order to fully explore the potential of legacy effects and inocula in restoration. In this case for example, *D. fastigiata* stimulated higher SRL, and potentially even more when inoculated with native soil, stimulating water and nutrient uptake (Pérez-Harguindeguy et al. 2003), these are likely to induce higher growth rates for coming species. It would be necessary therefore, to define goals of a desired targeted restored ecosystem in terms of functional traits, species composition and community response to foster ecosystem restoration using soil legacies and inoculation. Important to note, as of yet, there are no evidences if species succession occurs in the Cerrado grasslands because the vast majority of native species recruit via vegetative growth (Pilon et al. 2019; Silveira et al. 2020). Thus, restoration efforts in the Cerrado should not rely on the expectation that succession will occur in this ecosystem. Studies

regarding vegetation dynamics of Cerrado communities are deeply needed and welcomed.

4.4.Future directions

O Our experimental design was limited to the use of two grass species only. Mixed plant species assemblages should be used for both legacy and inoculation experiments, especially focusing on slow-growing species, to assess how multiple interactions between plants and microbes are shaped in complex settings. Future studies need to address the questions if and why some grass species are benefitted by lower diversity microbial communities. Finally, it is important that upcoming studies try to identify specifically which groups of organisms are being affected by the plants studied, so that more precise assertions can be made regarding soil legacies and plant-soil feedbacks. New studies targeting both natural vegetation and restored ecosystems dynamics, encompassing legacy and microbial effects are highly advised.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -Finance Code 001 and in part by FAPESP (Process 2019/07773-1). We would also like to thank professors Sara Adrián and Sandra Carmello for letting us use their lab equipment and IPEN for providing free gamma irradiation services.

References

- Bailly, A., and Weiskopf, L. (2012). The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: current knowledge and future challenges. *Plant signaling & behavior*. 7, 79–85. doi: 10.4161/psb.7.1.18418
- Banuelos, J., Alarcón, A., Larsen, J., Cruz-Sánchez, S., Trejo, D. 2014. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Meloidogyne incognita* in the ornamental plant *Impatiens balsamina*. *Journal of soil science and plant nutrition*, 14(1): 63-74.
- Beneduzi, A., Ambrosini A., Passaglia, L. M. P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4) 1044-1051.

- 230 Bennett, J. A., Klironomos, J. 2019. Mechanisms of plant-soil feedbacks: interactions
231 between biotic and abiotic drivers. *New Phytologist*, 222:91-96.
- 232 Bortolon, L., Gianello, C., Welter, S., Almeida, R. G. O., Giasson, E. 2011.
233 Simultaneous extraction of Phosphorus, Potassium, Calcium and Magnesium from soils
234 and Potassium recommendations for crops in Southern Brazil. *Pedosphere*, 21(3): 365-
235 372.
- 236 Brinkman, E. P., Raaijmakers, C. E., de Boer, W., van der Putten, W. H. 2017.
237 Changing soil legacies to direct restoration of plant communities. *AoB Plants*, 9(5). doi:
238 10.1093.aobpla.plx038.
- 239 Buchan, D., Mosekops, B., Ameloot, N., De Neve, S., Sleutel, S. 2012. Selective
240 sterilization of undisturbed soil cores by gamma irradiation: Effects on free-living
241 nematodes, microbial community and nitrogen dynamics. *Soil Biology & Biochemistry*
242 47:10-13
- 243 Buisson, E., et al. 2018. Resilience and restoration of tropical and subtropical
244 grasslands, savannas, and grassy woodlands. *Biological Reviews*, doi:
245 10.1111/brv.12470
- 246 Cameron, D. D., Neal, A. L., van Wees, S. C. M., & Ton, J. (2013). Mycorrhiza-
247 induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends in Plant Science*, 18(10),
248 539–545. doi:10.1016/j.tplants.2013.06.004.
- 249 Carbajo, V., den Braber, B., van der Putten, W. H., De Deyn, G. B. 2011. Enhancement
250 of late successional plants on ex-arable land by soil inoculations. *Plos One*, 6(7)
251 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021943>
- 252 Chang, W., Cheng, J., Allaire, J. J., Xie, Y., McPherson, J. 2020. shiny: web application
253 framework for R. R package version 1.4.0.2. [https://CRAN.R-](https://CRAN.R-project.org/package=shiny)
254 [project.org/package=shiny](https://CRAN.R-project.org/package=shiny)
- 255 Compant, S., Samad, A., Faist, H., Sessitsch, A. 2019. A review on the plant
256 microbiome: Ecology, function and emerging trends in microbial application. *Journal of*
257 *Advanced Research*, 19: 29-37.

- 258 Corbin, J. D., D'Antonio, C. M. 2012. Gone but not forgotten? Invasive plants' legacies
259 on community and ecosystem properties. *Invasive Plant Science and Management*, 5:
260 117-124.
- 261 Coutinho, A. G., Alves, M., Sampaio, A. B., Schmidt, I. B., & Vieira, D. L. M.
262 2019. Effects of initial functional-group composition on assembly trajectory in savanna
263 restoration. *Applied Vegetation Science*. doi:10.1111/avsc.12420
- 264 Delavaux, C. S., Smith-Ramesh, L. M., Kuebbing, S. E. 2017. Beyond nutrients: a
265 meta-analysis of the diverse effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plants and soil.
266 *Ecology*, 98(8): 2111-2119.
- 267 *Diectomis fastigiata* (Sw.) P.Beauv. Plants of the World Online. Available at:
268 <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:398608-1>.
269 Access: 05/10/2020.
- 270 Filgueira, T. S. 1988. Africanas no Brasil: gramíneas introduzidas da África. *Caderno*
271 *de Geociências* 5:57-63
- 272 Fitzsimons, M. S., Miller, R. M. 2010. The importance of soil microorganisms for
273 maintaining diverse plant communities in tallgrass prairie. *American Journal of Botany*,
274 97(12): 1937-1943.
- 275 Grman, E., Suding, K. N. 2010. Within-year soil legacies contribute to strong priority
276 effects of exotics on native California grassland communities. *Restoration Ecology*,
277 18(5): 664-670.
- 278 Haichar, F. Z., Maro, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J.,
279 Heulin, T., Achouak, W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial
280 community structure. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 68(1): 1-13.
- 281 Hartemink, A. E. 2002. Soil science in tropical and temperate regions – some
282 differences and similarities. *Advances in Agronomy*, 77: 269-292.
- 283 Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the
284 plant holobiont. *Microbiome*, 6(1). doi:10.1186/s40168-018-0445-0

- 285 Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. 2017. The role of
286 soil microorganisms in plant mineral nutrition – current knowledge and future
287 directions. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1617. doi:10.3389/fpls.2017.01617
- 288 Kardol, P., Bezemer, T. M. Van der Putten, W. H. 2006. Temporal variation in plant-
289 soil feedback controls succession. *Ecology Letters* 9(9): 1080-1088.
- 290 Kardol, P., Cornips, N. J., van Kempen, M. M. L., Bakx-Schotman, J. M. T., van der
291 Putten, W. H. 2007. Microbe-mediated plant-soil feedback causes historical
292 contingency effects in plant community assembly. *Ecological Monographs*, 77(2): 147-
293 162.
- 294 Kardol, P., Bezemer, T. M. Van der Putten, W. H. 2009. Soil organism and plant
295 introductions in restoration of species-rich grassland communities. *Restoration Ecology*,
296 17(2): 258-269.
- 297 Kardol, P., Wardle, D. A. 2010. How understanding aboveground-belowground
298 linkages can assist restoration ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(11): 670-
299 679.
- 300 Khakpour, O., Khara, J. 2012. Spore density and root colonization by arbuscular
301 mycorrhizal fungi in some species in the northwest of Iran. *International Research*
302 *Journal of Applied and Basic Sciences*, 3 (5): 977-982.
- 303 Klironomos, J. 2002. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and
304 invasiveness in communities. *Nature*, 417: 67-70.
- 305 Koziol, L. Schultz, P. A., House, G. L., Bauer, J. T., Middleton, E. L., Bever, J. D.
306 2018. The plant microbiome and native plant restoration: the example of native
307 mycorrhizal fungi. *BioScience*, 68 (12): 996-1006.
- 308 Kulmatiski, A., Beard, K. H., Stevens, J. R., Cobbold, S. M. 2008. Plant-soil feedbacks:
309 a meta-analytical review. *Ecology letters*, 11: 980-992.
- 310 Le, S., Josse, J., Husson, F. 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis.
311 *Journal of Statistical Software*, 25(1): 1-18.

- 312 Leite, M. R., Cassiolato, A. M. R., Lannes, L. S. 2019. *Urochloa decumbens* has higher
313 mycorrhizal colonization in degraded than in pristine áreas in the brazilian cerrado.
314 Floresta e Ambiente, 26(4): e20190060
- 315 Lind. E. M., et al. 2013. Life-history constraints in grassland plant species: A growth-
316 defense trade-off is the norm. Ecology letters, 16(4): doi: 10.1111/ele.12078.
- 317 Ma, H., Pineda, A., van der Wurff, A. W. G., Bezemer, T. M. 2018. Carry-over effects
318 of soil inoculation on plant growth and health under sequential exposure to soil-borne
319 diseases. Plant and Soil, 433: 257-270.
- 320 Matoso, S. C. G., Wadt, P. G. S., Souza Júnior, V. S., Pérez, X. L. O. 2019. Synthesis of
321 enriched biochar as a vehicle for phosphorus in tropical soils. Acta Amazonica, 49(4):
322 268-276.
- 323 McLaren, A. D. 1969. Radiation as a technique in soil biology and biochemistry. Soil
324 Biology and Biochemistry, 1: 63-73.
- 325 Mehlich, A. 1953. Determination of P, K, Na, Ca, Mg and NH₄. Soil Testing Division
326 (Mimeo), North Carolina Department of Agriculture, Raleigh, NC.
- 327 Middleton, E. L., Bever, J. D. 2012. Inoculation with a native soil community advances
328 succession in a grassland restoration. Restoration Ecology, 20(2): 218-226.
- 329 Mills, K. E., Bever, J. D. 1998. Maintenance of diversity within plant communities: soil
330 pathogens as agents of negative feedback. Ecology, 79(5): 1595-1601.
- 331 Moora, M. et al. 2011. Alien plants associate with widespread generalist arbuscular
332 mycorrhizal fungal taxa: evidence from a continental-scale study using massively
333 parallel 454 sequencing, Journal of Biogeography, 38(7): 1305-1317.
- 334
- 335 Neuenkamp, L., Prover, S. M., Price, J. N., Standish, R. J. 2018. Benefits of
336 mycorrhizal inoculation to ecological restoration depends of pnat functional type,
337 restoration context and time. Fungal Ecology doi: 10.1106/j.funeco.2018.05.004

- 338 Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J.
 339 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling &*
 340 *Behavior*, 4(8): 701-712.
- 341 Overbeck, G. E., et al. 2013. Restoration ecology in Brazil-time to step out of the forest.
 342 *Natureza & Conservação*, 11(1): 92-95.
- 343 Overbeck, G. E., et al. 2015. Conservation in Brazil needs to include non-forest
 344 ecosystems. *Diversity and distributions*, 21(12): 1455-1460.
- 345 Packer, A. Clay, K. 2000. Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a
 346 temperate tree. *Nature*, 404: 278-281.
- 347 Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry,
 348 P., et al. 2013. New handbook for standardize measurement of plant functional traits
 349 worldwide. *Australian Journal of Botany* 61:167-234
- 350 Peterson, B. G., Carl, P. 2020. PerformanceAnalytics: econometric tools for
 351 performance and risk analysis. R package version 2.0.4. [https://CRAN.R-](https://CRAN.R-project.org/package=PerformanceAnalytics)
 352 [project.org/package=PerformanceAnalytics](https://CRAN.R-project.org/package=PerformanceAnalytics)
- 353 Pilon, N. A. L., Assis, G. B., Souza, F. M., & Durigan, G. (2018). Native remnants can
 354 be sources of plants and topsoil to restore dry and wet cerrado grasslands. *Restoration*
 355 *Ecology*, doi: 10.1111/rec.12534
- 356 Phillips, M. L., Aronson, E. L., Maltz, R. M., Allen, E. B. 2020. Native and invasive
 357 inoculation sources modify fungal community assembly and biomass production of a
 358 chaparral shrub. *Applied Soil Ecology*, 147, doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103370
- 359 Pivello, V. R., Shida, C. N., Meirelles, S. T. (1999). Alien grasses in Brazilian savanas:
 360 a threat to the biodiversity. *Biodiversity and conservation*, 8: 1281-1294.
- 361 Prado, P., Chalom, A., Oliveira, A. 2016. Rsampling: Ports the workflow of
 362 “Resampling stats” Add-in to R. R package version 0.1.1. [https://CRAN. R-](https://CRAN.R-project.org/package=Rsampling)
 363 [project.org/package=Rsampling](https://CRAN.R-project.org/package=Rsampling)
- 364 R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R
 365 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

- 366 Rúa, M. A., Antoninka, A., Antunes, P. M., Chaudhary, V. B., et al. 2016. Home-field
367 advantage? Evidence of local adaptation among plants, soil and arbuscular mycorrhizal
368 fungi through meta-analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 16:122.
- 369 Sampaio, A. B., Vieira, D. L. M., Holl, K. D., Alves, M., Coutinho, A. G., Cordeiro, A.
370 O. O., Ribeiro, J. F., Schmidt, I. B. 2019. Lessons on direct seeding to restore
371 Neotropical savana. *Ecological Engineering*, 138: 148-154.
- 372 Schmidt, I. B., de Urzedo, D. I., Piña-Rodrigues, F. C. M., Vieira, D. L. M., de
373 Rezende, G. M., Sampaio, A. B., Junqueira, R. G. P. 2019. Community-based native
374 seed production for restoration in Brazil - the role of science and policy. *Plant*
375 *Biology*. doi:10.1111/plb.12842
- 376 Silveira, F. A. O., et al. 2020. Myth-busting tropical grassy biome restoration.
377 *Restoration Ecology*. doi:10.1111/rec.13202
- 378 Trevelline, B. K., Fontaine, S. S., Hartup, B. K., Kohl, K. D. 2019. Conservation
379 biology needs a microbial renaissance: a call for the consideration of host-associated
380 microbiota in wildlife management practices. *Proceedings of the Royal Society B*,
381 <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2448>
- 382 van der Putten, W. H., Klironomos, J. N., Wardle, D. A. 2007. Microbial ecology of
383 biological invasions. *The ISME Journal*, 1: 28-37.
- 384 Wagg, C., Bender, F., Widmer, F., van der Heijden, M. G. A. 2014. Soil biodiversity
385 and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings*
386 *of the National Academy of Sciences*, 111(14): 5266-5270.
- 387 Wang, X. Hoffland, E., Mommer, L., Feng, G., Kuyper, T. W. 2019. Maize varieties
388 can strengthen positive plant-soil feedback through beneficial arbuscular mycorrhizal
389 fungal mutualists. *Mycorrhiza*, 29: 251-261.
- 390 Waring, B. G., et al. 2015. Pervasive and strong effects of plants on soil chemistry: a
391 meta-analysis of individual plant ‘Zinke’ effects. *Proceedings of the Royal Society B*,
392 282(1812): doi: 10.1098/rspb.2015.1001

White, J. F., Chen, Q., Torres, M. S., Mattera, R., Irizarry, I., Tadych, M., Bergen, M. 2015. Collaboration between grass seedling and rhizobacteria to scavenge organic nitrogen in soils. *AoB Plants* 7: doi: 10.1093/aobpla/plu093.

Wickham, H. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York, 2016. Woods, T. M. Hartnett, D. C., Ferguson, C. J. 2009. High propagule production and reproductive fitness homeostasis contribute to the invasiveness of *Lespedeza cuneata* (Fabaceae). *Biological invasions*, 11: 1913-1927.

Wubs, E. R. J., van der Putten, W. H., Bosch, M., Bezemer, T. M. 2016. Soil inoculation steers restoration of terrestrial ecosystems. *Nature plants*, 2: 16107.

Wubs, E. R. J., van der Putten, W. H., Mortimer, S. R., Korthals, G. W., Duyts, H., Wagenaar., Bezemer, T. M. 2019. Single introductions of soil biota and plants generate long-term legacies in soil and plant community assembly. *Ecology letters*, 22: 1145-1151.

Supplementary Material

Methodology for mycorrhizal colonization analysis.

Mycorrhizal colonization analysis was performed according to the following procedure: roots were washed with water to remove excess dirt and stored in 15 ml falcon tubes with ethanol 70% (v/v). For analysis, roots were rinsed with water to remove ethanol, and heated in a centrifuge tube in KOH 2.5% (w/v) solution at 100° C for 5 minutes to clear the roots. Roots were then, rinsed again with water and a 2% HCl solution (v/v) was added to the tube for two hours to acidify the roots, HCl was then rinsed and Tripan Blue 0.05% (w/v) mixed with acidified glycerol (50% glycerol + 45% distilled water + 5% HCl 2% (v/v)) was added to the tubes which were then heated for five minutes at 100°C to stain the roots. Roots were then washed with water and stored in acidified glycerol. Mycorrhizal quantification was made according to the slide method (Trouvelot, 1986). Stained roots were divided into 30 one centimeter fragments, to a total of 30 cm per pot. Fragments were observed in a light microscope and mycorrhizal colonization was estimated based on the presence of hyphae and other mycorrhizal structures in the segment, each fragment had its own percentage estimate of mycorrhizal colonization.

423 **Methodologies used for soil measurements**

424 The following methods were used for soil measurements: pH was measured in water by
425 1:2.5 ratio; Phosphorus was measured by Mehlich-1 extraction method (Mehlich 1953),
426 H-Al: was measured using Calcium acetate extractor 0.5 mol/L at pH 7.0 (Matoso et al.
427 2019); SB – sum of exchangeable bases ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^{+}$): Mg^{2+} and Ca^{2+} were
428 measured using KCl extraction (Bortolon et al. 2011) and K^{+} was measured using the
429 Mehlich-1 extraction method (Mehlich 1953); T – cation exchange capacity at pH 7.0
430 ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^{+} + \text{Al}^{3+}$): Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} were measured as above and Al^{3+} was
431 measured using the KCl extraction (Bortolon et al. 2011) ; v – base saturation index:
432 measured using the formula ($100 * \text{SB} / \text{T}$).

433 Table 2.S1. Bootstrap comparison of functional traits during the conditioning phase of the experiment. Comparisons are always based on the first
 434 inoculum (second column) compared to the second inoculum (third column), values correspond to p values obtained in bootstrap simulations
 435 (10.000 repeats). Abvg biomass: aboveground biomass, LMA; leaf mass per area, SRL: specific root length, AMF%: percentage of arbuscular
 436 mycorrhizal colonization. *Urochloa* has more comparisons compared to *Diectomis* because differences were found both for lesser and greater
 437 comparisons (last column).

Species	Inoculum_1	Inoculum_2	Abvg biomass	LMA	SRL	Height	Clones	Leaves	AMF%	Difference
<i>Diectomis</i>	Sterile	Native	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-	lesser
<i>Diectomis</i>	Sterile	Invaded	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-	lesser
<i>Diectomis</i>	Invaded	Native	0.76	0.975	0.811	0.324	0.928	0.796	0.132	lesser
<i>Urochloa</i>	Sterile	Native	0.367	0.9999	0.96	0.206	0.9	0.578	0.0001	lesser
<i>Urochloa</i>	Sterile	Native	0.633	0.0001	0.04	0.794	0.1	0.422	0.9999	greater
<i>Urochloa</i>	Sterile	Invaded	0.361	0.989	0.586	0.213	0.737	0.608	0.0001	lesser
<i>Urochloa</i>	Sterile	Invaded	0.639	0.011	0.414	0.787	0.263	0.392	0.9999	greater
<i>Urochloa</i>	Invaded	Native	0.485	0.983	0.953	0.464	0.815	0.665	0.137	lesser

Urochloa Invaded Native 0.515 **0.017** 0.047 0.536 0.185 0.335 0.863 greater

438 Table 2.S2. Bootstrap comparison of *Diectomis fastigiata* functional traits during the legacy phase of the experiment. Comparisons were made so
 439 that the first legacy and inoculum are compared to the second. Significant p values are in bold. Abvg_biomass: aboveground biomass, LMA; leaf
 440 mass per area, SRL: specific root length, AMF%: percentage of arbuscular mycorrhizal colonization.

Species	Legacy_1	Inoculum _1	Legacy_2	Inoculum _2	Abvg_biomass	LMA	SRL	Height	Clones	Leaves	AMF%	Difference
<i>Diectomis</i>	<i>Diectomis</i>	Native	<i>Diectomis</i>	Invaded	0.0001	0.537	0.459	0.01	0.04	0.008	0.0001	Lesser
<i>Diectomis</i>	<i>Diectomis</i>	Native	<i>Urochloa</i>	Sterile	0.0001	0.037	0.871	0.002	0.001	0.0001	0.0001	Lesser
<i>Diectomis</i>	<i>Diectomis</i>	Native	<i>Urochloa</i>	Native	0.0001	0.29	0.954	0.034	0.003	0.002	0.0001	Lesser
<i>Diectomis</i>	<i>Diectomis</i>	Native	<i>Urochloa</i>	Native	0.9999	0.71	0.046	0.966	0.997	0.998	0.9999	Greater
<i>Diectomis</i>	<i>Diectomis</i>	Native	<i>Urochloa</i>	Invaded	0.004	0.134	0.98	0.01	0.05	0.02	0.0001	Lesser
<i>Diectomis</i>	<i>Diectomis</i>	Native	<i>Urochloa</i>	Invaded	0.996	0.866	0.02	0.99	0.95	0.98	0.9999	Greater
<i>Diectomis</i>	<i>Diectomis</i>	Invaded	<i>Urochloa</i>	Sterile	0.003	0.018	0.903	0.257	0.036	0.001	0.786	Lesser
<i>Diectomis</i>	<i>Diectomis</i>	Invaded	<i>Urochloa</i>	Native	0.436	0.77	0.028	0.068	0.67	0.866	0.009	Greater
<i>Diectomis</i>	<i>Diectomis</i>	Invaded	<i>Urochloa</i>	Invaded	0.108	0.872	0.014	0.13	0.368	0.768	0.164	Greater
<i>Diectomis</i>	<i>Urochloa</i>	Sterile	<i>Urochloa</i>	Invaded	0.0001	0.041	0.165	0.021	0.011	0.015	0.454	Greater
<i>Diectomis</i>	<i>Urochloa</i>	Sterile	<i>Urochloa</i>	Native	0.001	0.037	0.146	0.012	0.057	0.008	0.907	Greater

<i>Diectomis</i>	<i>Urochloa</i>	Native	Urochloa	Invaded	0.897	0.451	0.71	0.351	0.836	0.574	0.902	Lesser
------------------	-----------------	--------	----------	---------	-------	-------	------	-------	-------	-------	-------	--------

441 Table 2.S3. Bootstrap comparison of *Urochloa eminii* functional traits during the second phase of the experiment. Comparisons were made so
442 that the first legacy and inoculum are compared to the second. Abvg_biomass: aboveground biomass, LMA; leaf mass per area, SRL: specific
443 root length, AMF%: percentage of arbuscular mycorrhizal colonization.

Species	Legacy_1	Inocule_1	Legacy_2	Inocule_2	Abvg_biomass	LMA	SRL	Height	Clones	Leaves	AMF%	Difference
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Sterile	<i>Diectomis</i>	Native	0.557	0.389	0.63	0.646	0.327	0.429	0.403	Greater
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Sterile	<i>Diectomis</i>	Invaded	0.128	0.108	0.227	0.257	0.42	0.385	0.0001	Lesser
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Sterile	<i>Urochloa</i>	Sterile	0.997	0.998	0.012	0.976	0.861	0.902	0.979	Greater
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Sterile	<i>Urochloa</i>	Sterile	0.003	0.002	0.988	0.024	0.139	0.098	0.021	Lesser
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Sterile	<i>Urochloa</i>	Native	0.043	0.063	0.888	0.084	0.434	0.28	0.0001	Lesser
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Sterile	<i>Urochloa</i>	Invaded	0.021	0.011	0.814	0.077	0.122	0.007	0.0001	Lesser
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Native	<i>Diectomis</i>	Invaded	0.218	0.104	0.349	0.435	0.219	0.333	0.0001	Lesser
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Native	<i>Urochloa</i>	Sterile	0.989	0.997	0.004	0.928	0.93	0.895	0.977	Greater
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Native	<i>Urochloa</i>	Sterile	0.011	0.003	0.996	0.072	0.07	0.105	0.023	Lesser
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Native	<i>Urochloa</i>	Native	0.098	0.06	0.94	0.181	0.243	0.252	0.0001	Lesser
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Native	<i>Urochloa</i>	Invaded	0.065	0.015	0.913	0.176	0.059	0.076	0.0001	Lesser
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Invaded	<i>Urochloa</i>	Sterile	0.98	0.82	0.001	0.945	0.806	0.832	0.0001	Greater
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Invaded	<i>Urochloa</i>	Sterile	0.02	0.18	0.999	0.055	0.194	0.168	0.9999	Lesser
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Invaded	<i>Urochloa</i>	Native	0.79	0.458	0.024	0.826	0.43	0.61	0.323	Greater
<i>Urochloa</i>	<i>Diectomis</i>	Invaded	<i>Urochloa</i>	Invaded	0.857	0.718	0.046	0.833	0.845	0.871	0.35	Greater

<i>Urochloa</i>	<i>Urochloa</i>	Sterile	Urochloa	Native	0.129	0.096	0.862	0.25	0.199	0.28	0.0001	Lesser
<i>Urochloa</i>	<i>Urochloa</i>	Sterile	Urochloa	Invaded	0.816	0.623	0.04	0.77	0.471	0.421	0.0001	Lesser
<i>Urochloa</i>	<i>Urochloa</i>	Native	Urochloa	Invaded	0.6	0.806	0.684	0.471	0.83	0.782	0.425	Greater

Table 2.S4. Soil characteristics from just after the first phase of the experiment.

Species	Inoculum	pH H₂O	P	H.AI	T	SB	v	Mg²⁺
<i>Diectomis</i>	Invaded	5.98	1.3	0.8	1.68	0.88	52.4	0.11
<i>Diectomis</i>	Invaded	5.64	1.2	1.5	1.97	0.47	23.9	0.05
<i>Diectomis</i>	Invaded	5.53	1.1	1.1	1.4	0.3	21.4	0.03
<i>Diectomis</i>	Native	5.97	1.4	1	1.92	0.92	47.9	0.11
<i>Diectomis</i>	Native	5.9	1.3	1.3	1.95	0.65	33.3	0.06
<i>Diectomis</i>	Native	6.17	1.1	0.7	1.64	0.94	57.3	0.11
<i>Diectomis</i>	Sterile	5.33	1.3	1.3	1.55	0.25	16.1	0.04
<i>Diectomis</i>	Sterile	5.45	1.6	1.5	1.78	0.28	15.7	0.04
<i>Diectomis</i>	Sterile	5.32	1.5	1.6	1.77	0.17	9.6	0.02
<i>Urochloa</i>	Invaded	5.87	1.2	1.1	1.94	0.84	43.3	0.08
<i>Urochloa</i>	Invaded	5.7	1.1	1.3	2.07	0.77	37.2	0.07
<i>Urochloa</i>	Invaded	5.67	1.3	0.8	1.37	0.57	41.6	0.05
<i>Urochloa</i>	Native	6.64	1.3	0.2	1.58	1.38	87.3	0.13
<i>Urochloa</i>	Native	5.85	1.3	0.7	1.41	0.71	50.4	0.07
<i>Urochloa</i>	Native	5.58	1.2	1.1	1.63	0.53	32.5	0.05
<i>Urochloa</i>	Sterile	5.31	1.3	1.5	1.61	0.11	6.8	0.01
<i>Urochloa</i>	Sterile	4.94	1.3	1.6	1.79	0.19	10.6	0.01
<i>Urochloa</i>	Sterile	5.63	1.3	1	1.67	0.67	40.1	0.05

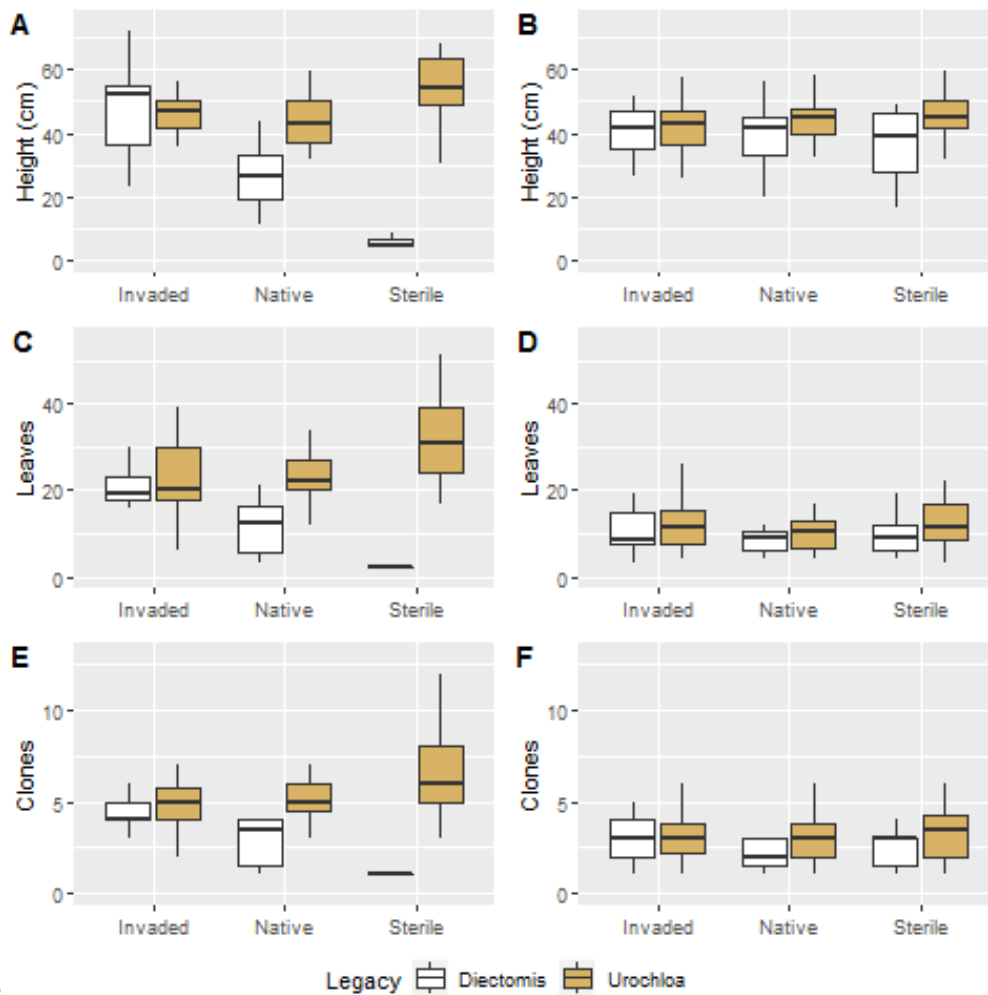
pH.H₂O = pH measured in water, P = phosphorus content, H.AI = potential acidity, T = cation exchange capacity, SB = sum of bases, v = base saturation, t = effective cation exchange capacity, Mg²⁺ = magnesium content.

Table 2.S5. Soil characteristics from just after the second phase of the experiment. Samples are compound samples of three pots per treatment.

Species	Inoculum	Legacy	pH H₂O	P	H⁺ AI	T	SB	v	Mg²⁺
<i>Diectomis</i>	Invaded	<i>Diectomis</i>	6.45	1.2	0.6	1.9	1.3	68.4	0.16
<i>Diectomis</i>	Invaded	<i>Urochloa</i>	6.34	1.1	0.8	1.6	0.8	50	0.12

<i>Diectomis</i>	Native	<i>Diectomis</i>	6.32	1.2	1	2.03	1.03	50.7	0.14
<i>Diectomis</i>	Native	<i>Urochloa</i>	6.6	1.2	0.8	1.83	1.03	56.3	0.13
<i>Diectomis</i>	Sterile	<i>Diectomis</i>	6.46	1.8	0.6	1.67	1.07	64.1	0.16
<i>Diectomis</i>	Sterile	<i>Urochloa</i>	6.47	1.1	0.8	1.88	1.08	57.4	0.13
<i>Urochloa</i>	Invaded	<i>Diectomis</i>	6.48	1.1	1	2.06	1.06	51.5	0.13
<i>Urochloa</i>	Invaded	<i>Urochloa</i>	6.56	1.5	1	1.93	0.93	48.2	0.1
<i>Urochloa</i>	Native	<i>Diectomis</i>	6.51	1.4	1	2.13	1.13	53.1	0.13
<i>Urochloa</i>	Native	<i>Urochloa</i>	6.46	1.1	1.1	1.97	0.87	44.2	0.1
<i>Urochloa</i>	Sterile	<i>Diectomis</i>	6.47	1.6	0.8	1.88	1.08	57.4	0.16
<i>Urochloa</i>	Sterile	<i>Urochloa</i>	6.59	1.2	1	1.9	0.9	47.4	0.1

pH.H₂O = pH measured in water, P = phosphorus content, H.AI = potential acidity, T = cation exchange capacity, SB = sum of bases, v = base saturation, t = effective cation exchange capacity, Mg²⁺ = magnesium content.



3

Figure 2.S1. Growth related-traits of *D. fastigiata* (left side) and *U. eminii* (right side). A and B represent final plant height, C and D represent final number of leaves and E and F represent number of clones per plant. Box colors represent treatment legacy, orange indicating *U. eminii* legacies and white *D. fastigiata*. Soils inoculated in the first phase are represented in the x axis.

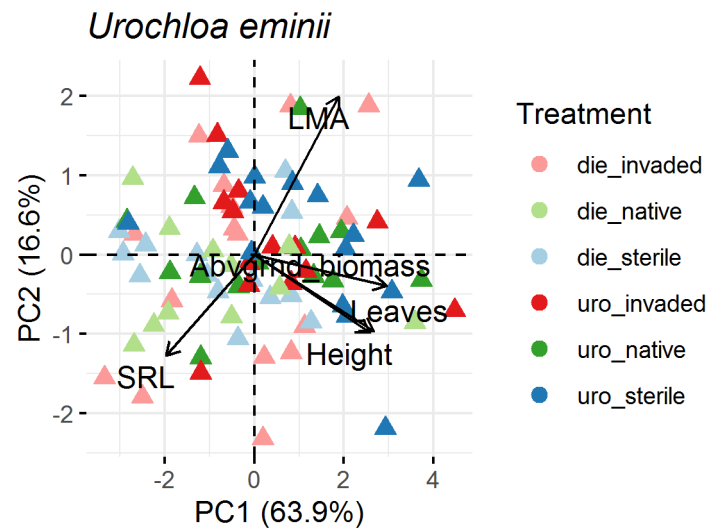


Figure 2.S2. A PCA representing *Urochloa eminii* grown during the second phase of the experiment. Colors indicate previous legacy and soil inoculation; lighter colors with the prefix ‘die_’ indicate *D. fastigiata* legacies whereas darker colors with the prefix ‘uro_’ indicates *U. eminii* legacies.

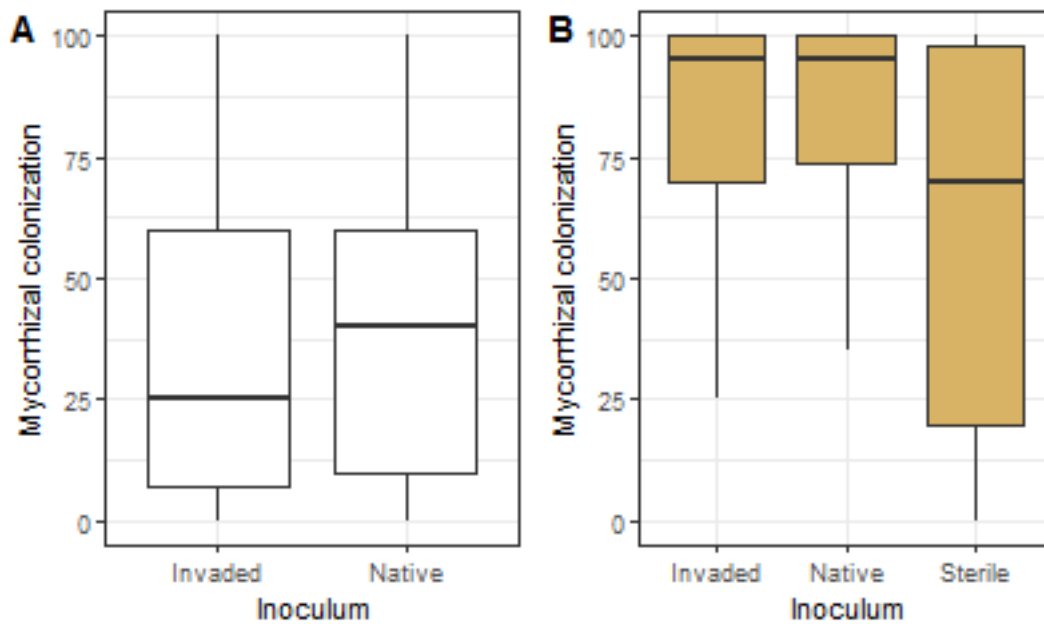


Figure 2.S3. Root segment mycorrhizal colonization for the first phase of the experiment. In the right plot in white are represented *D. fastigiata* samples and in the left plot are represented *U. eminii* samples.

Capítulo 3 – Discussão Geral

1. Escopo geral: Sobre fazer ciência

Esta pesquisa se insere num contexto geral em que tentamos compreender como se dão as relações entre plantas e solos. Reconhecemos por solo todos os seus componentes, físico – água, ar e minerais – químico – íons e moléculas – e biológico – todos os seres vivos presentes e moléculas oriundas dos mesmos. O solo é, portanto, um sistema complexo e a ecologia, que é a ciência da vida que tenta desvendar e compreender as interações entre sistemas complexos, juntos, formam a ecologia dos solos, uma ciência emergente e que possui até o momento mais questões que respostas (Eisenhauer et al., 2017).

Uma premissa simples: as plantas são a base de toda a cadeia alimentar, e necessitam do solo para sobreviver. De que vale essa afirmação de maneira tão simplificada? Para o âmbito escolar, ou do dia-a-dia, esta afirmação basta. Porém para âmbitos científico-acadêmicos, claramente não é o suficiente. Um cientista busca compreender de que maneira a planta se nutre do solo: se absorvem nutrientes solubilizados, se decompõem diretamente restos de seres vivos, se são capazes, sem a ajuda de outros seres de obter uma nutrição capaz de suprir suas demandas. Vemos portanto, que a partir de uma simples afirmação somos capazes de gerar perguntas que nos auxiliarão a desvendar o funcionamento do sistema solo. E curiosamente, ao tentarmos responder as perguntas propostas, percebemos muitas vezes, que necessitamos descobrir outros fatores que antes não faziam parte do plano para obter uma resposta satisfatória. Ou como acontece muitas outras vezes, as respostas de uma pergunta nos levam a muitas outras perguntas, quase que como um caminho sem fim. Isso é fazer ciência.

Este trabalho partiu de perguntas um tanto quanto simplificadas academicamente falando, queria-se saber, o que acontece quando: inoculamos solos com diferentes origens biológicas em duas espécies diferentes? O que acontece à carga biológica do solo quando crescemos outras espécies onde antes havia crescido outra espécie? Quais efeitos podemos esperar da interação entre a carga biológica da espécie e o inóculo de solo? São perguntas que podem ser respondidas de diversas maneiras, e certamente não há uma maneira mais correta de fazê-lo. Neste trabalho optamos por

utilizar alguns atributos funcionais para medir tais características e tentar responder as perguntas. Nem sempre conseguimos respondê-las de maneira satisfatória. Porém, preenchemos alguma parte das respostas e esperamos que trabalhos futuros irão completando as lacunas. É assim que a ciência se desenvolve.

Epistemologias à parte, este trabalho trouxe alguns conhecimentos que acredito valer a pena serem registrados, tanto por motivos de aprendizado, quanto de divulgação, e que não estão diretamente relacionados com as perguntas realizadas inicialmente.

Biólogos e ecólogos, em geral, necessitam dar uma maior atenção à taxonomia. A taxonomia é a ciência biológica encarregada de classificar os seres vivos. Existem diversas correntes de pensamento e classificação na taxonomia, mas um consenso entre elas, ao menos para os organismos eucariontes é a nomenclatura binomial. Todas as espécies conhecidas possuirão um nome científico, composto do nome do gênero ao qual pertence mais o epíteto específico, que denomina qual é a espécie de fato. Assim, quando nos referimos à *Urochloa*, amplamente nos referimos à todas as espécies que compõem tal gênero. *Urochloa decumbens*, um nome binomial, possui o epíteto *decumbens* que especifica a espécie sobre a qual nos referimos. Atualmente existem diversas bases de dados sobre a nomenclatura de espécies, e consultando tais bases para referenciar as espécies estudadas neste trabalho, descobrimos correções para o nome de ambas as espécies deste trabalho, *Urochloa decumbens* passou a ser *Urochloa eminii* e *Andropogon fastigiatus* passou a ser *Diectomis fastigiata*. Importante ressaltar a necessidade da utilização de bases de dados que não sejam nacionais apenas, digo isto, pois neste trabalho identificamos nestas bases de dados internacionais, que a espécie utilizada na restauração ecológica do cerrado, conhecida por *Andropogon fastigiatus*, é uma espécie que ocorre em três continentes, e da qual não se tem certeza sobre a sua origem, sendo, portanto, uma espécie criptogênica (Carlton, 1996). Felizmente, ao que tudo indica neste trabalho e no excelente trabalho de restauração que vem sendo desempenhado no cerrado (Coutinho et al., 2019), esta espécie apresenta um auto feedback negativo, desaparecendo sozinha ao longo dos seus ciclos de vida. Porém, é necessário pensar: e se a espécie for originária de outro continente? Quais as implicações de se utilizar uma espécie não nativa em projetos de restauração ecológica? Para que possamos realizar nosso trabalho de maneira efetiva, necessitamos dos trabalhos de taxonomistas e biogeógrafos,

buscando utilizar o nome correto das espécies, ainda que estes não sejam comumente aplicados, buscando nas bases de dados o nome, a origem e a distribuição de todas as espécies utilizadas em nossos trabalhos. Só assim, damos reconhecimento ao trabalho dos outros, e por consequência ao nosso próprio. Além de este cuidado ser extremamente necessário, não necessitamos de mais riscos de invasão biológica, quanto mais auxiliada por nós cientistas.

Outro fator importante descoberto, ainda mais em um país como o Brasil, que goza de diversas instituições públicas de pesquisa, foi a possibilidade de esterilizar o solo gratuitamente com radiação gama. Um serviço oferecido para pesquisas públicas de maneira gratuita pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). É importante fazer a ressalva deste ponto, pois vivemos em um país em que investimentos e recursos voltados para a ciência são escassos, logo, todo e qualquer meio de economizar o dinheiro que temos para investir em pesquisas é válido. Sobretudo se estes meios irão fomentar a utilização do maquinário público. Me parece essencial que seja desenvolvida uma lista a nível estadual e federal dos recursos do maquinário público que podemos utilizar em pesquisa a fim de otimizar o gasto e uso de recursos, assim como melhorar a nossa pesquisa científica, e fomentar a utilização de equipamentos e pessoal disponível para auxílio, estimulando que serviços públicos não caiam em desuso correndo o risco de serem afetados por corte de verbas.

A respeito do fazer ciência, percebi que pesquisas em casa de vegetação, embora aparentem ser mais simples, são apenas aparências. É mais complicado do que parece realizar um experimento em estufas. É necessário controlar para todos os fatores, idealizar exatamente como o procedimento irá ocorrer, o número de vasos utilizados, a quantidade de solo, quais serão os procedimentos realizados em cada vaso, controlar para contaminações, dentre muitos outros fatores. Trabalhos de campo são essenciais para compreendermos o funcionamento dos sistemas como um todo, porém trabalhos em casa de vegetação são a maneira mais eficaz que possuímos de isolar fatores e testar efeitos de variáveis de maneira isolada, sem fatores de confusão. Me parece que o ideal é unir ambos os tipos de experimento, claro, que sempre a depender das perguntas realizadas.

Outra questão importante a se considerar, diz respeito à origem do solo, partindo do princípio de que todo solo que já foi colonizado por alguma planta, tem

algum tipo de legado contido nele. É de grande importância sempre levar em consideração a origem do solo para experimentos de casa de vegetação, uma vez que queremos minimizar efeitos que não podemos controlar em nossos experimentos. O ideal seria então esterilizar todo solo quando não se puder garantir que ele possua a mesma procedência por inteiro; outra opção é realizar uma homogeneização bastante completa no solo. As decisões feitas a respeito do solo que será usado terão implicação direta sobre os resultados do trabalho (Beals et al., 2020), como mostramos neste trabalho, e devem, portanto, ser consideradas ao planejar o desenho experimental.

O experimento foi realizado em duas fases, cada uma consistindo em 14 semanas, o que implica na duração total do experimento de mais de um semestre. Como foi realizado em casa de vegetação, os organismos embora sujeitos às mesmas condições, estavam à mercê das condições climáticas. O experimento foi iniciado no começo do ano, verão, e terminou durante o inverno. Isso implica em diferentes médias de temperatura e luminosidade afetando as plantas ao longo das duas fases do experimento. É possível, por exemplo, que a retroalimentação negativa observada para *D. fastigiata* com legado própria tenha sido exacerbada devido à variação na temperatura (van der Putten et al., 2013). Por tal motivo, foi decidido que não seria correto comparar as mesmas espécies entre as duas fases, pois não haveria segurança de que qualquer efeito observado teria ocorrido devido aos tratamentos a que as plantas foram submetidas. Portanto, é de grande importância ao planejar experimentos que se estendem por mais de uma estação, levar em consideração os efeitos de variações ambientais para a análise dos resultados, pois estes efeitos podem atuar diretamente sobre as variáveis que serão analisados, podendo introduzir sérios vieses em nossos trabalhos.

2. A respeito da ecologia microbiana de gramíneas

Falando mais especificamente sobre as questões introduzidas nesta dissertação, em relação à questão dos holobiontes, encontramos que *D. fastigiata* é capaz de se desenvolver sem a inoculação de micro-organismos. Esse desenvolvimento, contudo, é defasado se comparado a plantas que tiveram o solo inoculado. Isto indica que plantas, ao menos da espécie *Diectomis fastigiata*, podem se beneficiar bastante pela presença de micro-organismos no solo. O tratamento esterilizado de *U. eminii* nos surpreendeu pois indicou que houve contaminação por fungos micorrízicos no solo.

Mais surpreendente foi descobrir que existe a possibilidade de que gramíneas podem ser beneficiadas por solos com pouca diversidade de micro-organismos (Wagg et al., 2014). Este efeito só havia sido verificado em experimentos utilizando de desenhos experimentais com múltiplas espécies, aqui verificamos que o efeito pode ocorrer sob uma única espécie. É de grande importância que mais estudos sejam feitos a fim de verificar a universalidade deste efeito, que para *U. eminii* parece ser verdadeiro mas talvez não tanto para *D. fastigiata*. Se comprovado o efeito de beneficiamento através de menor diversidade microbiana, a utilização de gramíneas na restauração de áreas em que o solo foi altamente degradado, como após mineração, deveria ser recomendada.

De acordo com Koziol e Bever (2015), o grupo sucessional ao qual uma planta campestre pertence, é um bom indício de se ela se beneficiará ou não de inóculos nativos contendo esporos de fungos micorrízicos. O trabalho dos autores verificou que espécies pioneiras em ambientes campestres são menos dependentes de fungos micorrízicos, e naturalmente tem o crescimento rápido se comparado às espécies mais tardias na sucessão ecológica, que por sua vez, são mais conservativas no que diz respeito à utilização de recursos e investimentos em defesas (Lind et al., 2013). As espécies conservativas costumam ser beneficiadas pela inoculação com esporos de fungos nativos. *D. fastigiata* é uma espécie anual, portanto, pode-se considerar que seja uma espécie de sucessão inicial em ambientes campestres e perturbados, é de se esperar, portanto, que inóculos nativos tenham um impacto negativo para o desenvolvimento da espécie. Neste trabalho, isto só foi observado após a espécie deixar um legado no solo. Este efeito associado entre legado e inóculo foi diferente em relação ao tipo de inóculo presente, indicando que as interações tendem a ser espécie-específicas (Hassani et al., 2018). O inóculo exótico, por exemplo, foi capaz de estimular *D. fastigiata* com legado próprio, a tal ponto que não era distinguível de tratamentos com legado de *U. eminii*, que apresentavam efeitos mais positivos em relação à produção de biomassa para ambas as espécies, evidenciando a complexidade e a interação dos fatores presentes no solo. O inóculo nativo por sua vez, desencadeava em *D. fastigiata* com legado próprio um efeito negativo na produção de biomassa, que não foi observado para *U. eminii*. Existem fortes indícios neste trabalho de que a espécie anual com solo nativo e legado próprio está mais sujeita a efeitos negativos do solo, que podem estar sendo causados por patógenos. Experimentos futuros devem focar na utilização de espécies mais conservativas, presentes em estágios finais da sucessão ecológica, a fim de testar se ocorre

beneficiamento das espécies através da inoculação com solo nativo, bem como, levar em consideração a utilização de inóculos de outras origens, para efeitos de compreensão sobre este sistema complexo que são os solos.

A maior parte dos estudos em biodiversidade foi realizada em ambientes temperados (Di Marco et al., 2017), o mesmo é válido para a biologia dos solos (Hartemink, 2002). Os trópicos, entretanto, abrigam a maior parte da biodiversidade no planeta (Willig et al., 2003), é provável então, que aqui nos trópicos exista uma gama maior de interações possíveis entre os seres vivos. Necessitamos saber quão generalizáveis e aplicáveis são os resultados obtidos em ambientes temperados para os ambientes tropicais, podendo então aprender com experimentos já realizados e possivelmente aplicar técnicas já desenvolvidas em outras locais, aqui. Este trabalho usou técnicas que vem sendo testadas na Holanda (Wubs et al., 2016) e dentro do contexto em que foi realizado, ou seja em casa de vegetação, com apenas duas espécies em monocultura, obteve resultados satisfatórios. Mostramos que a espécie invasora tende a dar feedbacks neutro-positivos (Klironomos, 2002), e que o inóculo nativo tende a ter mais efeitos negativos para a espécie anual (Kulmatiski et al., 2008). Experimentos em locais temperados já haviam demonstrado a ocorrência destes efeitos, agora, temos de descobrir o quanto os padrões, mecanismos e processos são generalizáveis para a biologia dos solos tropicais.

Este trabalho mostra que é possível utilizarmos tanto os efeitos da inoculação dos solos quanto os efeitos do legado para melhorarmos as técnicas de restauração das quais dispomos. Os efeitos do legado de *D. fastigiata* e *U. eminii*, que estimulam a produção de maiores comprimentos específicos da raiz e colonização micorrízicas, respectivamente, mostram que é possível utilizarmos algum tipo de sucessão na restauração, incorporando o efeito do legado. Para que esta sucessão fosse bem aproveitada, seria necessário definir valores de referência de atributos funcionais para ecossistemas restaurados, dessa forma a utilização de espécies que ocasionem um legado que venha a estimular esses atributos é de grande importância, e viabilidade dado que sejam feitas pesquisas para prospecção de tais espécies. A inoculação, por ser capaz de afetar a interação entre plantas e solo, também deve ser analisada como uma possibilidade real para incrementar os esforços de restauração. Se, como citado anteriormente, as espécies não anuais são beneficiadas por inóculos nativos, é imperativo que os utilizemos, e portanto, mais pesquisas são necessárias.

Outra discussão importante que surge a partir deste trabalho diz respeito ao nosso viés em relação a seres ou ambientes nativos. De que estes são intrinsecamente bons ou benéficos. Neste estudo, vimos que o inóculo de solo nativo é na verdade ruim para a espécie utilizada na restauração *D. fastigiata*, o que pode ter ocorrido devido à concentração de patógenos (Mills e Bever, 1998). O inóculo invasor por sua vez, foi benéfico para esta espécie. O que nos faz refletir, que não necessariamente teremos de usar apenas espécies nativas para utilizarmos em prol do beneficiamento de funções e serviços. Se formos restaurar o meio ambiente, claramente, devemos sempre preferir pela utilização de espécies nativas, mas se o objetivo é o beneficiamento de um sistema agrícola com fins de aumento na produção, utilizar inóculos (ou mesmo espécies) de origem exótica podem ser os melhores meios para aumentar a produção. Sempre com cautela e evocando o princípio da precaução (Kriebel et al., 2001), pois não precisamos de mais espécies invasoras para manejar. Ainda mais atualmente, com as invasões por micro-organismos, das quais ainda sabemos muito pouco (Dickie et al., 2017). Os plantios de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) são um bom exemplo do beneficiamento por espécies exóticas. Eucaliptos são algumas das árvores com maiores taxas de crescimento no planeta, atualmente, os plantios de eucalipto são responsáveis por mais de 1% do Produto Interno Bruto do Brasil, ocupando aproximadamente 0.66% do território nacional (IBÁ, 2019), portanto com estudo e planejamento, é possível beneficiarmos-nos de espécies de origem exótica, enfatizando que devemos ter bastante cuidado a introdução de microbiota associada.

Este trabalho também identificou ao menos um novo morfotipo de fungo associado às raízes da espécie *D. fastigiata* (Figura 3.S1.). Foram consultados especialistas em fungos ao redor do mundo, que garantiram não conhecer este tipo de fungo, que inicialmente acreditamos tratar-se de fungos do tipo Fine Dark Endophyte (FDE) (Orchard et al., 2016). Embora não tenhamos nos atido a analisar a origem e funções desse fungo, a aparição de algo novo em um experimento com duas espécies em casa de vegetação fortalece a ideia de que temos bastante por descobrir no que diz respeito a novas espécies, interações entre plantas e micro-organismos, e ecologia do solo de maneira geral. Ainda a respeito das funções dos fungos, na primeira etapa do experimento junto com a quantificação de colonização por fungos micorrízicos, foi quantificada a colonização por Dark Septate Fungi (Tabela 3.S2), apresentando maior colonização em *D. fastigiata* com inóculo de solo nativo. As funções desempenhadas

por estes fungos ainda estão sendo estudadas (Li et al., 2017), porém uma meta-análise quantificou que a maior parte dos efeitos tende a ser positiva (Newsham, 2011). É importante compreender se tais fungos tem maior papel em ambientes nativos em relação aos invadidos, pois é necessário entender como as espécies locais se desenvolvem para realizar ações de manejo mais eficazes. Temos muita biodiversidade por conhecer.

3. Considerações finais

Este trabalho mostrou a complexidade e a importância das interações entre plantas e solo, mais especificamente micro-organismos presentes no solo. Mostramos que plantas dependem até certo ponto da presença de micro-organismos para se desenvolver, que a origem dos mesmos afeta o desempenho da planta, principalmente neste caso, se associada a diferentes históricos de colonização do solo (efeito do legado). Este trabalho traz novas perguntas: quem são os organismos que afetam o desenvolvimento das plantas? Como a biodiversidade de micro-organismos afeta o desempenho de gramíneas? Existe uma relação entre o status sucessional de uma espécie e suas interações com micro-organismos? Quão generalizáveis a nível global são as interações entre planta e solo?

Com tantas perguntas por responder, conseguimos ainda assim demonstrar que a inoculação de solo pode vir a se tornar uma técnica eficaz para melhorarmos os resultados obtidos na restauração de ambientes campestres. Muita pesquisa ainda precisa ser feita, estamos arranhando a superfície, mas em breve, chegaremos a maior profundidade.

Referências

- Beals, K. K. et al. 2020. Predicting plant-soil feedback in the field: meta-analysis reveals that competition and environmental stress differentially influence PSF. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 8(191): doi: <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00191>
- Carlton, J. T. 1996. Biological invasions and cryptogenic species. *Ecology*, 77(6): 1653-1655.
- Coutinho, A. G., Alves, M., Sampaio, A. B., Schmidt, I. B., & Vieira, D. L. M. (2018). Effects of initial functional-group composition on assembly trajectory in savanna restoration. *Applied Vegetation Science*. doi:10.1111/avsc.12420
- Dickie, I. A., Bufford, J. L., Cobb, R. C., Desprez-Lostau, M., Grelet, G., Hulme, P. E., Klironomos, J., Makiola, A., Nuñez, M. A., Pringle, A., Thrall, P. H., Tourtellot, S. G., Waller, L., Williams, N. M. 2017. The emerging science of linked plant-fungal invasions. *New Phytologist*, 215(4).
- Di Marco, M. et al. 2017. Changing trends and persisting biases in three decades of conservation science. *Global Ecology and Conservation*, 10: 32-42.
- Eisenhauer, N., et al. 2017. Priorities for research in soil ecology. *Pedobiologia*, 63: 1-7.
- Hartemink, A. E. 2002. Soil Science in tropical and temperate regions – some differences and similarities. *Advances in agronomy*, 77: 269-292.
- Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, 6(1). doi:10.1186/s40168-018-0445-0
- IBÁ. 2019. Relatório 2019 - Indústria Brasileira de Árvores. Brasil, 2019.
- Klironomos, J. 2002. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature*, 417: 67-70.
- Kozioł, L., Bever J. D. 2015. Mycorrhizal response trades off with plant growth rate and increases with plant successional status, *Ecology*, 96: 1768-1744.
- Kriebel, D. et al. 2001. The precautionary principle in environmental science. *Environmental Health Perspectives*, 109(9): 871-876.

- Kulmatiski, A., Beard, K. H., Stevens, J. R., Cobbold, S. M. 2008. Plant-soil feedbacks: a meta-analytical review. *Ecology letters*, 11: 980-992.
- Li, X., He, X., Hou, L., Ren, Y., W, S., Su, F. 2017. Dark septate endophytes isolated from a xerophyte plant promote the growth of *Ammopiptanthus mongolicus* under drought condition. *Scientific Reports*, 8: doi: 10.1038/s41598-018-26183-0
- Lind. E. M., et al. 2013. Life-history constraints in grassland plant species: A growth-defense trade-off is the norm. *Ecology letters*, 16(4): doi: 10.1111/ele.12078.
- Mills, K. E., Bever, J. D. 1998. Maintenance of diversity within plant communities: soil pathogens as agents of negative feedback. *Ecology*, 79(5): 1595-1601.
- Newsham, K. K. 2011. A meta-analysis of plant responses to dark-septate root endophytes. *New Phytologist*, 190: 183-193.
- Orchard, S., 2016. Fine endophytes (*Glomus tenue*) are related to Mucoromycotina, not Glomeromycota. *New Phytologist*, 213: 481-486.
- van der Putten, W. H. et al. 2013. Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology*, 101(2): 265-276.
- Wagg, C., Bender, F., Widmer, F., van der Heijden, M. G. A. 2014. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14): 5266-5270.
- Willig, M. R., Kaufman, D. M., Stevens, R. D. 2003. Latitudinal gradients of biodiversity: pattern, process, scale and synthesis. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 34: 273-309.
- Wubs, E. R. J., van der Putten, W. H., Bosch, M., Bezemer, T. M. 2016. Soil inoculation steers restoration of terrestrial ecosystems. *Nature plants*, 2: 16107.

Material Suplementar

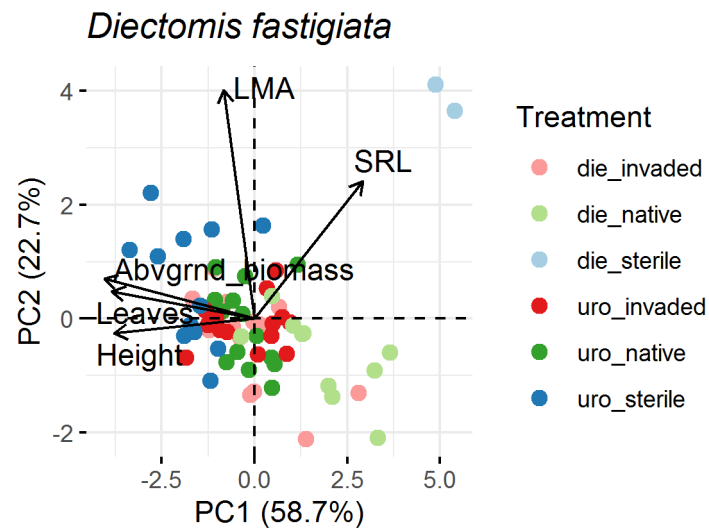


Figura 3.S1. PCA representando os atributos de *Diectomis fastigiata* durante a segunda fase do experimento. Cores indicam o legado prévio, cores claras com o prefix “die_” indicam legado de *D. fastigiata*, enquanto cores mais escuras com o prefixo “uro_” indicam legados de *U. eminii*.

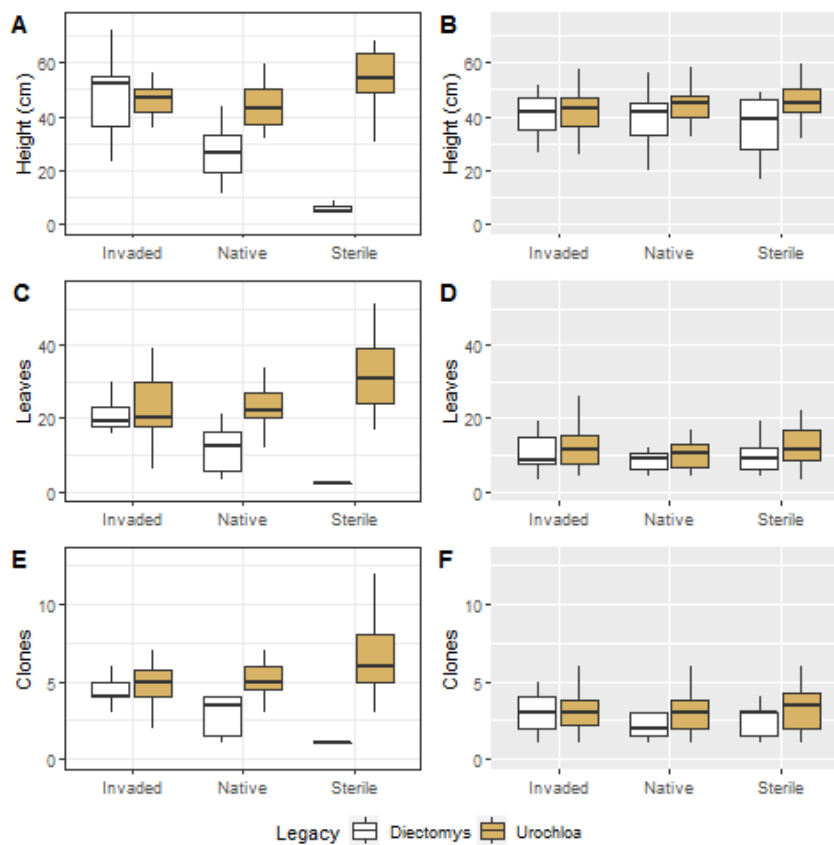


Figura 3.S2. Atributos relacionados ao crescimento de *D. fastigiata* (esquerda) e *U. eminii* (direita) após a segunda fase de crescimento. A cor das caixas representa o legado do tratamento, laranja indicam legado de *U. eminii* e branco legados de *D. fastigiata*. Os inóculos, que foram adicionados na primeira etapa do experimento, estão representados no eixo x. A e B representam altura final das plantas, C e D, representam o número de folhas e E e F representam o número de clones por planta.

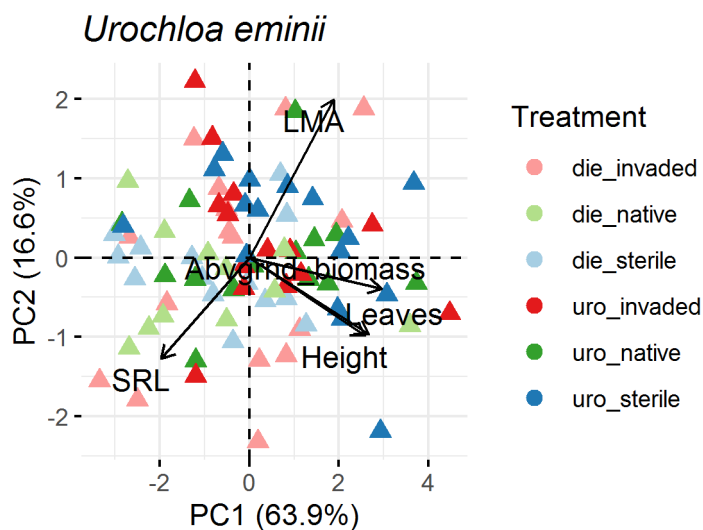


Figura 3.S3. PCA representando os atributos de *Urochloa eminii* após a segunda fase do experimento. As cores indicam o legado e inóculo prévios; cores mais claras com o prefixo “die_” indicam legados de *D. fastigiata*, ao passo que cores mais escuras com o prefixo “uro_” indicam legados de *U. eminii*.

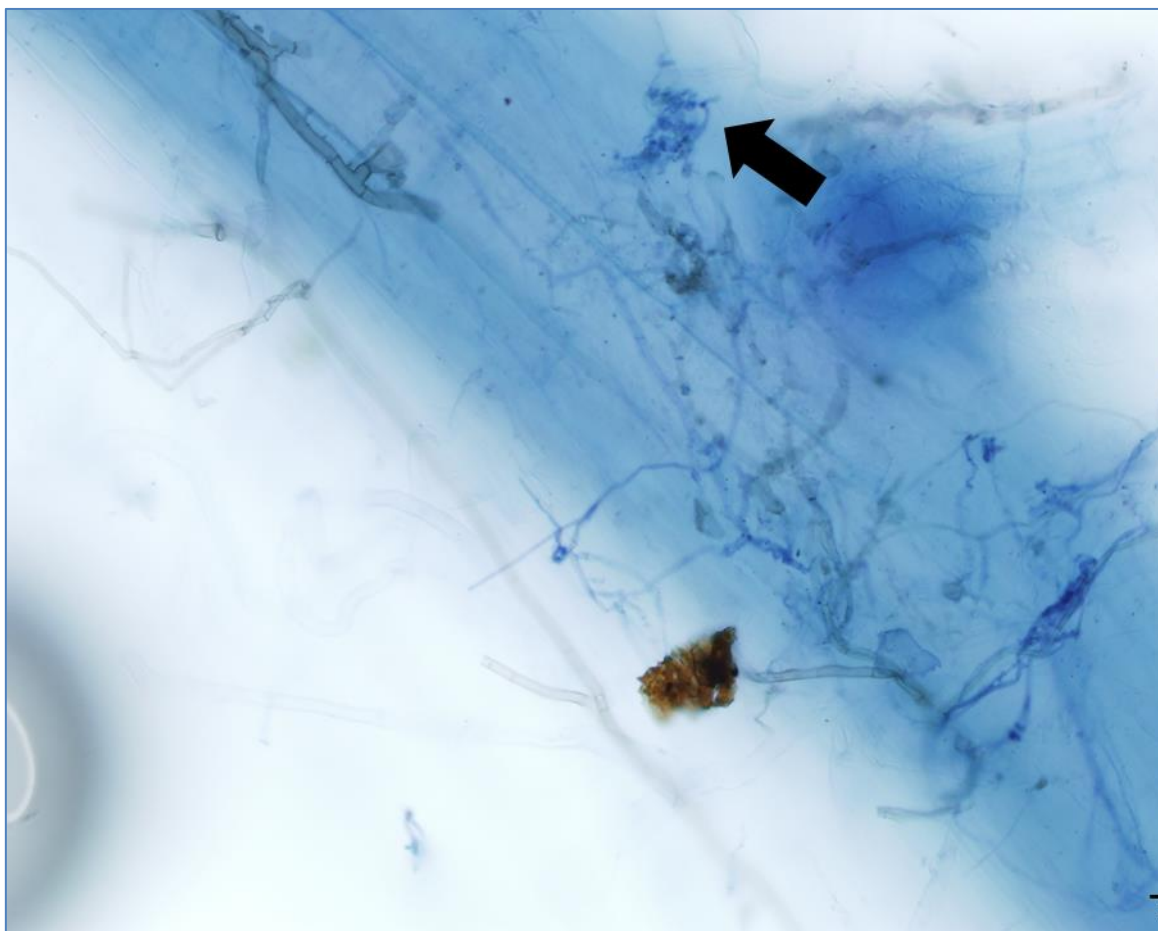


Figura 3.S4. Novo morfotipo de fungo endofítico. Hifas com estruturas similares a arbúsculos estão indicadas pela seta.

Tabela 3.S1. Relação de indivíduos floridos e sobrevivência para *Diectomis fastigiata* em ambas as fases do experiment.

Legado	Etapa de condicionamento do solo			<i>Diectomis fastigiata</i>			<i>Urochloa eminii</i>		
Inóculo	I	N	S	I	N	S	I	N	S
Indivíduos floridos	31	32	21	12	5	1	14	10	10
Sobreviventes	32	32	32	13	10	3	14	15	13
Proporção floridos/sobreviventes	97%	100%	66%	92%	50%	33%	100%	67%	77%

I representa o inóculo de solo invadido, **N** representa o inóculo de solo nativo e **S** representa o solo esterilizado.

Tabela 3.S2. Comparação por *bootstrap* da colonização por fungos DSE dos tratamentos após a primeira etapa do experimento. As comparações são sempre comparando o primeiro inóculo (segunda coluna) em relação ao segundo (terceira coluna). Os valores correspondem a p-valores obtidos nas simulações por *bootstrap* (10.000 repetições).

Species	Inocule_1	Inocule_2	DSE	Difference
Diectomis	Sterile	Native	-	lesser
Diectomis	Sterile	Invaded	-	lesser
Diectomis	Invaded	Native	0.0001	lesser
Urochloa	Sterile	Native	0.052	lesser
Urochloa	Sterile	Native	0.948	greater
Urochloa	Sterile	Invaded	0.513	lesser
Urochloa	Sterile	Invaded	0.487	greater
Urochloa	Invaded	Native	0.0001	lesser
Urochloa	Invaded	Native	0.9999	greater

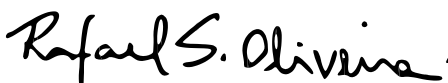
Anexo 1 - Declaração de Bioética e Biossegurança

DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada “***Efeitos do legado e da inoculação de solos de origens distintas em uma espécie invasora e outra usada na restauração de áreas campestres de Cerrado***”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Ecologia do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.



Assinatura: _____
Nome do(a) aluno(a): Gabriel Wolfsdorf



Assinatura: _____
Nome do(a) orientador(a): Rafael Silva Oliveira

Data: 18/12/2020

Anexo 2 – Declaração de Direitos Autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Efeitos do legado e da inoculação de solos de origens distintas em uma espécie invasora e outra usada na restauração de áreas campestres de Cerrado**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

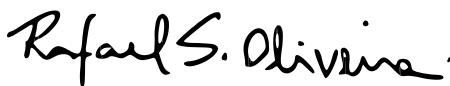
Campinas, 18/12/2020



Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Gabriel Wolfsdorf**

RG n.º 36.947.129-5



Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Rafael Silva Oliveira**

RG n.º 147.203-9