



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Efeito da adição de nutrientes em longo prazo nas interações acima e
abaixo do solo de espécies lenhosas do Cerrado

Alexandra Martins Costa

Orientadora: Prof. Dra. Mercedes Maria da Cunha Bustamante

Brasília, DF
Julho de 2019



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Efeito da adição de nutrientes em longo prazo nas interações acima e
abaixo do solo de espécies lenhosas do Cerrado

Alexandra Martins Costa

Orientadora: Prof. Dra. Mercedes Maria da Cunha Bustamante

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ecologia da
Universidade de Brasília, como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ecologia**

Brasília, DF
Julho de 2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que colaboraram, de alguma forma, para a elaboração e nascimento deste trabalho.

Obrigada Mercedes, por ter me recebido em seu laboratório e permitir que eu realizasse parte do meu sonho em me tornar uma ecóloga e poder contribuir para a construção de um mundo melhor. Obrigada por toda a dedicação, paciência e voto de confiança. Você é incrível!

Agradeço a banca, Alessandra Kozovits, Pedro Togni e Gabriela Nardoto, pelas contribuições e tempo dedicado ao meu crescimento profissional.

Obrigada CAPES, FAP-DF, PELD CNPq e projeto ArboControl pela ajuda financeira preciosa.

Obrigada professora Laila Espindola, por ter me recebido e adotado em seu laboratório (farmacognosia – UnB), onde me senti acolhida desde o primeiro dia. Tudo que aprendi e desenvolvi com vocês levarei para a vida. Obrigada Daniel e Renata, meus coautores queridos S2, agradeço demais a dedicação e neurônios gastos na elaboração deste trabalho e publicação do meu primeiro artigo; esse combo deu bom (Morais, 2019)!!! Valeu por todo conhecimento compartilhado, por me fazerem entender química e dá apoio para o próximo passo (Espanha, me aguarde!)

Gratidão a todos que conheci nessa jornada, sem vocês tudo seria mais difícil! Obrigada equipe do lab Ecossistemas, Thiago e Lucas pelas ajudas em campo e análises (sem vocês não teria rolado), Letícia e Nubia pela ajuda na estatística e gráficos, Rafa por ter ouvido todas as minhas incertezas e ansiedade, Regina por todo o apoio e ajudas burocráticas, Jéssica pela compreensão, Waira que mal entrou e já considero pacas, André pela ajuda com as figuras, Pamela por todas as dicas práticas e conselhos, Leandro Maracahipes pela análise de imagens, Francisco (by Santa Maria) e Elisa que foram embora tão cedo. Muito obrigada equipe de estagiários queridos, Isabela, Camille e Gustavo, vocês foram demais! Gratidão lab!

Amigos farmacêuticos, obrigada pelo acolhimento. Por todas as tardes musicais de Laís e Sophia, o cuidado da Maristela, o carinho da Raquel, as risadas da Lorena, Heidi e Natália por serem incríveis e ajudar super! Heloá, Camilinha, Francisco, Lecir, João, Maíra, Roberta, Paula e Luiz. Agradeço também a Maíra de Ribeirão Preto pelas análises feitas por lá.

Minha turma de mestrado, sofremos juntos e vencemos! Paulla e Mariana, obrigada pela experiência incrível de viajar com vocês. Carolzinha, pessoa mais bondosa dessa vida, valeu por partilhar um pouco de você comigo e pela ótima experiência de orientar uns alunos.

Aos meus amigos da graduação que continuam a me acompanhar. Especialmente Portela e Adriana pela ajuda em campo, Augusto, Iza e Jéssica por me acalmarem e acreditarem em mim. Kamilla (meu anjinho protetor) e Priscilla, obrigada pela amizade. Luciana Galvão, minha inspiração, obrigada por me recomendar à Mercedes, jamais esquecerei sua ajuda e preocupação comigo. Todos vocês são presentes que a Universidade Católica me deu!!

Obrigada Carlos, meu terapeuta, sua ajuda nesse caminho do autoconhecimento foi fundamental para essa conquista, agradeço a você e a todos do CAEP - UnB pelo ótimo trabalho desenvolvido. Hadla, que também me ajudou a esclarecer muita coisa, gratidão, você é luz! Ao Yoga, namastê.

Samantha e mãe, vocês aguentaram uma barra, lidar com a ausência não foi legal. Porém, essa ausência era apenas física, meu coração estava sempre com vocês. Obrigada por entenderem como minha profissão é importante para mim. Valeu Kuka, Digo, Creuza e família pela torcida.

Esse trabalho foi feito por meio de acertos e erros, insegurança e vontade de crescer. Não foi fácil, apanhei feio para estatística na reta final e quis largar tudo no meu primeiro semestre; uma pessoa não me deixou desistir, esteve ao meu lado para me lembrar o quanto eu sonhei em estar aqui. Leo, namorado, essa conquista é nossa!! Obrigada por absolutamente tudo, por me fazer enxergar as coisas como são quando tudo era medo, por entender minhas mudanças e está ali para apoiar quando parecia que não daria mais. Pela relação pipa que desenvolvemos, onde queremos ver o outro feliz e realizado e lutaremos por isso. Não sei como retribuir tanto amor, obrigada por ser quem é. Te amo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	7
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO 1 – EFEITO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES NA QUÍMICA FOLIAR E HERBIVORIA	14
1.1 INTRODUÇÃO.....	14
1.2 OBJETIVOS.....	16
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
1.3.1 ÁREA DE ESTUDO	16
1.3.2 ADIÇÃO DE NUTRIENTES.....	17
1.3.3 ESPÉCIES SELECIONADAS	17
1.3.4 HERBIVORIA E ANÁLISE DE NUTRIENTE FOLIAR.....	18
1.3.5 ANÁLISE METABOLÔMICA	18
1.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
1.4 RESULTADOS	20
1.4.1 ANÁLISE NUTRIENTE FOLIAR	20
1.4.2 METABOLÔMICA	23
1.4.3 HERBIVORIA E ÁREA FOLIAR ESPECÍFICA	30
1.5 DISCUSSÃO.....	31
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES NA ABUNDÂNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E INTERAÇÕES ACIMA E ABAIXO DO SOLO	35
2.1 INTRODUÇÃO.....	35
2.2 OBJETIVOS.....	36
2.2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.3.1 ÁREA DE ESTUDO	37
2.3.2 ADIÇÃO DE NUTRIENTES.....	37
2.3.3 SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS	38
2.3.4 COLETAS E ANÁLISE DE SOLO.....	38

2.3.5 EXTRAÇÃO E CONTAGEM DE ESPOROS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES	39
2.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
2.4 RESULTADOS	40
2.4.1 PARÂMETROS QUÍMICOS DO SOLO	40
2.4.2 ABUNDÂNCIA DE ESPOROS DE FMA	40
2.4.3 INTERAÇÕES ACIMA E ABAIXO DO SOLO	41
2.5 DISCUSSÃO.....	43
3. MATERIAL SUPLEMENTAR	47
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Abundância relativa dos 50 íons mais importantes para a diferenciação dos grupos de *Blepharocalyx salicifolius* sob diferentes tratamentos de fertilização, com agrupamento baseado na distância Euclidiana. As colorações vermelho e azul representam, respectivamente, maior e menor abundância relativa dos íons processados. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio e fósforo (NP) e fósforo (P). 27
- Figura 2.** Abundância relativa dos 10 íons mais importantes para a diferenciação dos grupos de *Roupala montana* sob diferentes tratamentos de fertilização, com agrupamento baseado na distância Euclidiana. As colorações vermelho e azul representam, respectivamente, maior e menor abundância relativa dos íons processados. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio e fósforo (NP) e fósforo (P). 28
- Figura 3.** Abundância relativa de 25 íons de *Styrax ferrugineus* sob diferentes tratamentos de fertilização, com agrupamento baseado na distância Euclidiana. As colorações vermelho e azul representam, respectivamente, maior e menor abundância relativa dos íons processados. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio e fósforo (NP) e fósforo (P). 29
- Figura 4.** Abundância relativa dos seis íons processados de *Caryocar brasiliense* sob diferentes tratamentos de fertilização, com agrupamento baseado na distância Euclidiana. As colorações vermelho e azul representam, respectivamente, maior e menor abundância relativa dos íons processados. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio e fósforo (NP) e fósforo (P). 29
- Figura 5.** Herbivoria foliar (%) de *Blepharocalyx salicifolius*, *Caryocar brasiliense*, *Roupala montana* e *Styrax ferrugineus*. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P). Letras diferentes representam diferenças estatísticas, $p < 0,05$. ANOVA um fator. 30
- Figura 6.** Área foliar específica (AFE), cm^3/g , de *Blepharocalyx salicifolius*, *Caryocar brasiliense*, *Roupala montana* e *Styrax ferrugineus*. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P). 31
- Figura 7.** Diferença entre o número total de esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de *Blepharocalyx salicifolius*, *Caryocar brasiliense*, *Roupala montana* e *Styrax ferrugineus* nos tratamentos calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P) e o número total de esporos de fungos micorrízicos arbusculares no controle (C). Figura gerada a partir de 5.000 permutações e intervalo de confiança de 95%, barras verticais indicam esse intervalo. 41
- Figura 8.** Análise de componentes principais (PCA) para esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera e os 10 íons mais importantes para a diferenciação dos tratamentos de *Blepharocalyx salicifolius*. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P). Eixos com explicação de 78,12% do total da variação. Íon 7 e 10 foram removidos da figura pois, estavam muito correlacionados com os íons 1 e 2, respectivamente. 42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentração de nutrientes foliares de *Blepharocalyx salicifolius*, *Caryocar brasiliense*, *Roupala montana* e *Styrax ferrugineus*. Para os tratamentos controle, calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P). Valores da média \pm desvio padrão ($n=10$). Efeitos significativos encontrados em relação ao controle são indicados com $*p < 0,05$ (teste-t pareado). 22
- Tabela 2.** Íons detectados de *Blepharocalyx salicifolius* com diferenças significativas entre o controle e ao menos um tratamento. São apresentados os valores de massa carga (m/z), tempo de retenção (TR), perfil de fragmentação (MS/MS), fórmula molecular, composto identificado e diferenciação dos grupos.

Tratamentos controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P), a ordem dos tratamentos na última coluna se refere a abundância relativa (> - <). 23

Tabela 3. Valores das variáveis do solo para controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P). Valores da média \pm desvio padrão (n=4). Efeitos significativos encontrados em relação ao controle são indicados com * $p < 0,05$ (teste-t pareado). 40

Tabela 4. 10 íons mais importantes em folhas de *Blepharocalyx salicifolius* para a diferenciação dos tratamentos, do mais relevante ao menos. São apresentados os valores de massa carga (m/z), tempo de retenção (TR), perfil de fragmentação (MS/MS), fórmula molecular, composto identificado e diferenciação dos grupos. Tratamentos controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P), a ordem dos tratamentos na última coluna se refere a abundância relativa (> - <). 43

Tabela 5S1. Altura e circunferência (a altura do solo) dos indivíduos amostrados, em cada parcela e seus respectivos tratamentos. Controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P). 47

Tabela 6S2. Distribuição dos indivíduos amostrados por parcela e tratamento. Controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P). 52

RESUMO

Como organismos sésseis, as plantas não podem escapar à pressão causada por fatores bióticos e abióticos. Adicionalmente, as plantas estão sujeitas a interações em duas interfaces bem distintas, acima e abaixo do solo. Tais interações, muitas vezes, são mediadas por compostos secundários, responsáveis pela associação de plantas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e proteção contra herbívoros ou fatores abióticos que podem atuar como estressores ambientais. Tanto a colonização por FMA quanto a produção de metabólitos secundários são influenciadas pela disponibilidade de nutrientes no solo, o que também pode afetar interações multitróficas acima e abaixo do solo. Estudos anteriores relataram que a eutrofização em áreas de Cerrado pode alterar o funcionamento, estrutura e composição de suas comunidades. No entanto, as consequências da adição de nutrientes sobre suas interações ecológicas ainda são pouco exploradas. O objetivo desta dissertação foi avaliar se a adição de nutrientes em longo prazo, em uma área de cerrado típico, altera as interações ecológicas entre plantas, fungos micorrízicos e herbívoros folívoros. O estudo foi conduzido em parcelas experimentais de cerrado típico submetidas aos seguintes tratamentos: calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P) e comparadas com parcelas controle (sem fertilização). Avaliou-se a resposta de quatro espécies lenhosas do Cerrado: *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, *Caryocar brasiliense* Cambess, *Roupala montana* Aubl. e *Styrax ferrugineus* Nees & Mart., em termos de bioquímica foliar (análise metabolômica), quantificação das taxas de herbivoria e abundância de esporos de fungos micorrízicos no solo rizosférico. A análise metabolômica indicou uma clara diferenciação entre os indivíduos de *B. salicifolius* nas parcelas controle e nos demais tratamentos, sendo o tratamento Ca o que mais se diferenciou em relação ao controle. O perfil metabolômico de indivíduos de *R. montana* crescendo nas parcelas do tratamento Ca também diferiu em relação aos indivíduos nas parcelas controle. Nas demais espécies, não houve uma diferenciação clara entre os tratamentos. De forma similar à resposta metabolômica, observou-se em *B. salicifolius* um aumento da herbivoria nos indivíduos do tratamento Ca enquanto para as demais espécies e tratamentos não houve diferenças significativas. A abundância de esporos de FMA aumentou nas parcelas Ca para *B. salicifolius*, *C. brasiliense* e *R. montana*. Já adição de P resultou na diminuição da abundância de esporos sob *R. montana* e *S. ferrugineus*. Apesar da indicação de estudos prévios sobre a limitação de N e P em ecossistemas de cerrado, a calagem induziu não somente alterações no pH do solo mas também na disponibilidade de macro e micronutrientes resultando em alterações mais marcantes no perfil de metabólitos foliares, que podem estar associados às interações ecológicas, como aumento dos esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de três das quatro espécies estudadas e maior taxa de herbivoria em *B. salicifolius*.

Palavras-chave: Metabolômica, Cerrado, lenhosas adição de nutrientes, herbivoria, fungos micorrízicos arbusculares, interações acima e abaixo do solo.

ABSTRACT

As sessile organisms, plants cannot escape the pressure caused by biotic and abiotic factors. Additionally, plants are subject to interactions at two very distinct interfaces, above and below ground. Such interactions are often mediated by secondary compounds, responsible for the association of the plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and protection against herbivores or abiotic factors that are environmental stressors. Both mycorrhizal colonization and secondary metabolite production are influenced by the availability of nutrients in the soil, which can also affect above- and belowground multitrophic interactions. Previous studies have reported that eutrophication in Cerrado areas can alter the functioning, structure and composition of ecological communities. However, the consequences of adding nutrients to their ecological interactions are still little explored. The objective of this dissertation was to evaluate whether the long-term addition of nutrients in a typical cerrado area alters the ecological interactions between plants, mycorrhizal fungi and herbivores. The study was conducted on experimental plots of typical cerrado submitted to the following treatments: liming (Ca), nitrogen (N), nitrogen + phosphorus (NP) and phosphorus (P) and compared with control plots (without fertilization). The response of four woody Cerrado species was evaluated: *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, *Caryocar brasiliense* Cambess, *Roupala montana* Aubl. and *Styrax ferrugineus* Nees & Mart. in terms of foliar biochemistry (metabolomic analysis), quantification of herbivory rates and abundance of arbuscular mycorrhizal spores in rhizospheric soil. The metabolomic analysis indicated a clear differentiation between the individuals of *B. salicifolius* in the control plots and those growing in the other treatment plots, being differences more accentuated in comparison with the treatment Ca. The metabolic profile of individuals of *R. montana* growing in the Ca plots also differed from the control plots. Regarding the other species, there was no clear separation between the treatments. Similar to the metabolic response, in *B. salicifolius* an increase in herbivory was observed in the Ca treatment subjects, while for the other species and treatments there were no significant differences. The abundance of AMF spores increased in Ca plots in the rhizosphere of *B. salicifolius*, *C. brasiliense* and *R. montana*. The addition of P resulted in a decrease in the abundance of AMF spores under *R. montana* and *S. ferrugineus*. Despite the indication of previous studies on the limitation of N and P in cerrado ecosystems, liming induced not only changes in soil pH but also in the availability of macro and micronutrients resulting in more marked changes in the profile of foliar metabolites, which may be associated with ecological interactions, such as an increase in arbuscular mycorrhizal spores in three of the four species studied and a higher rate of herbivory in *B. salicifolius*.

Keywords: Metabolomics, Cerrado, wood, nutrient addition, herbivory, arbuscular mycorrhizal fungi, above and belowground interactions.

INTRODUÇÃO GERAL

Os compostos secundários produzidos pelas desempenham importantes funções relacionadas a comunicação e proteção dos indivíduos, especialmente no que diz respeito a interações interespecíficas (Verma & Shukla, 2015). Auxiliando, por exemplo, na atração de polinizadores (Stevenson *et al.*, 2017), atuando na proteção contra herbívoros e patógenos (Wink, 1988; Richards *et al.*, 2015), sinalização planta-planta e intermediando a associação com fungos e bactérias do solo (Bonfante & Anca, 2009). Ao longo da história evolutiva das plantas, diferentes estratégias de defesas foram selecionadas em resposta aos danos sofridos em suas folhas (Moles *et al.*, 2013). O ataque por herbívoros, por exemplo, é uma pressão seletiva tão forte que pode ser uma das causas da grande diversidade de plantas nos trópicos (Coley & Barone, 1996; Coley & Kursar, 2014), estando associada a mudanças evolutivas e ecológicas em espécies vegetais (Agrawal *et al.*, 2012; Vilela *et al.*, 2014).

As interações entre plantas e outros organismos não se limitam apenas a sua parte aérea. Na rizosfera, há importantes interações entre as raízes e os microrganismos (Berendsen *et al.*, 2012). Bactérias, fungos e arqueias estão presentes no solo e são fundamentais na ciclagem de nutrientes, atuando principalmente nos ciclos do nitrogênio (N) e fósforo (P), tornando esses elementos disponíveis no sistema através da decomposição (Khan *et al.*, 2009; Prosser & Nicol, 2012). Em solos limitados em nutrientes ou com grande quantidade de elementos potencialmente tóxicos, as plantas podem se beneficiar muito da relação com microrganismos, já que bactérias e fungos endofíticos auxiliam na captura de nutrientes, promovem o crescimento e ganho de biomassa vegetal (Compant *et al.*, 2010). A simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) ocorre em 80% das espécies de plantas, aumentando a capacidade de absorção de nutrientes, especialmente P, e água, reduzindo o estresse hídrico e nutricional (Van der Heijden *et al.*, 2015). Outro benefício dessa interação abaixo do solo é a habilidade do fungo de promover a produção de compostos secundários em seu hospedeiro, como moléculas antioxidantes e polifenóis que atuam na proteção a estressores ambientais (Sbrana *et al.*, 2014).

As interações multitróficas ganharam interesse pela sua abordagem mais holística, com diferentes escalas de interações e condições mais reais do que de fato ocorre nos sistemas naturais (Meiners, 2015). Interações multitróficas acima e abaixo do solo podem promover mudanças químicas nas plantas como o estímulo e acúmulo de moléculas sinalizadoras (Gange *et al.*, 2003; Kula *et al.*, 2005; Hubbard *et al.*, 2019). Diferentes ferramentas são utilizadas para

investigar essa relação, incluindo a metabolômica. Essa abordagem tem se mostrado uma potencial ferramenta para analisar características e reconhecer padrões, uma vez que envolve o estudo de produtos do metabolismo celular afetados por circunstâncias genéticas e ambientais, sendo possível a rápida detecção à estressores antropogênicos, que em alguns casos não são expressos no genoma ou fenótipo das espécies (Fiehn, 2002; Peñuelas & Sardans, 2009). A ecometabolômica é usada para investigar a resposta das espécies diante de mudanças ambientais, sejam bióticas ou abióticas (Peñuelas & Sardans, 2009; Sardans *et al.*, 2011). O uso de abordagens metabolômicas na ecologia química tornou-se cada vez mais difundida (Poulin & Pohnert, 2019), expandindo de um contexto ligado a plantas cultivadas (como soja e milho) e adentrando nas interações entre plantas e outros organismos, e mudanças ambientais (Alvarez *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2014; Gargallo-Garriga *et al.*, 2016).

Tanto a colonização por fungos micorrízicos arbusculares quanto a produção de metabólitos secundários são influenciadas pela disponibilidade de nutrientes no solo, o que também pode afetar interações multitróficas. Solos com altos níveis de P, por exemplo, não favorecem a simbiose entre FMA e plantas (Williams *et al.*, 2017). A colonização por FMA e diferentes concentrações de metabólitos secundários podem modificar a química foliar tornando a planta menos suscetível a herbivoria (Hartley & Gange, 2009).

O Cerrado brasileiro é considerado um hotspot mundial para a conservação da biodiversidade devido sua riqueza de espécies, alto grau de endemismo e rápida perda de habitats (Myers *et al.*, 2000). Caracterizado por um mosaico de formações campestres, savânicas e florestais, é encontrado predominantemente sobre solos ácidos, distróficos, limitados em nutrientes e com elevada concentração de elementos tóxicos (Reatto *et al.*, 2008). Mesmo sob condições de solo, aparentemente, não favoráveis, há uma elevada riqueza de plantas neste bioma, sendo considerado a savana mais biodiversa do mundo (Do Brasil, 2016; Sawyer *et al.*, 2016).

Tendo em vista a importância das condições do solo para evolução e desenvolvimento das espécies, alguns estudos de adição de nutrientes ao solo foram feitos para avaliar como o sistema é alterado em função de mudança nas condições edáficas (Marschner *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2015). No Cerrado, em particular, um experimento de adição de nutrientes em um cerrado típico na Reserva Ecológica do IBGE (DF) foi iniciado em 1998 com aplicação dos tratamentos até 2006 (Kozovits *et al.*, 2007). Estudos conduzidos nessa área e abordando diferentes níveis de organização ecológica (de indivíduos a ecossistemas) mostraram que a eutrofização de

sistemas savânicos no Cerrado altera processos ecológicos como a decomposição e ciclagem de nutrientes (Kozovits *et al.*, 2007; Jacobson *et al.*, 2011), a composição e diversidade florística (Bustamante *et al.*, 2012), as relações hídricas de plantas lenhosas (Bucci *et al.*, 2006) e estimula a invasão biológica por gramíneas exóticas (Bustamante *et al.*, 2012). Embora um estudo na área tenha avaliado as interações entre plantas e insetos galhadores (Cuevas-Reyes *et al.*, 2011), estudos sobre o impacto das mudanças na disponibilidade de nutrientes em interações ecológicas no Cerrado ainda são escassos.

Neste contexto, o objetivo desta dissertação é avaliar se a adição de nutrientes em longo prazo, em uma área de cerrado típico, altera as interações ecológicas acima e abaixo do solo avaliando quatro espécies lenhosas de cerrado, fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera dessas espécies e a herbivoria foliar. No primeiro capítulo serão abordadas as interações acima do solo, avaliando como a adição de nutrientes modifica o perfil de metabólitos nas folhas e a taxa de herbivoria. O segundo capítulo avalia a abundância de esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera das quatro espécies selecionadas.

CAPÍTULO 1 – EFEITO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES NA QUÍMICA FOLIAR E HERBIVORIA

1.1 INTRODUÇÃO

As folhas são importantes órgãos responsáveis pelas trocas gasosas e produção de carboidratos, utilizados no crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais (Terashima *et al.*, 2011). Ao longo da história evolutiva das plantas, diferentes estratégias de defesas foram selecionadas em resposta aos danos sofridos nas folhas (Mello & Silva-Filho, 2002; Moles *et al.*, 2013). As formas de defesas desenvolvidas podem ser divididas em dois tipos básicos: 1) estruturas físicas, que tem como objetivo evitar o consumo de folhas por herbívoros e a perda de água e 2) defesas químicas que protegem tecidos vegetais contra o excesso de luz UV, predadores e patógenos. Tais defesas podem ser também, constitutivas (aquelas que as plantas já possuem naturalmente) ou induzidas, defesas que são produzidas apenas quando há um estímulo externo (por exemplo, herbivoria) (Barônio, 2012; Pavarini *et al.*, 2012).

Enquanto as defesas físicas são baseadas principalmente em carbono e estão relacionadas à anatomia da planta, as defesas químicas vêm de seu metabolismo secundário (Taiz *et al.*, 2017). Tais metabólitos podem ser divididos em três classes principais: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (Kabera *et al.*, 2014). Os terpenos, são formados basicamente de cadeias de isopreno, sendo menos dispendiosos de serem produzidos. Muitos terpenos são voláteis, o que confere a estes a função de comunicação da planta com outros organismos (Seybold *et al.*, 2006), como plantas próximas ou atraindo o predador de seus predadores (McCormick *et al.*, 2012). Já os compostos fenólicos, são caracterizados pela presença de um anel aromático hidroxilado, que pode lhes conferir propriedades bactericidas, antissépticas e antioxidantes (Rosa *et al.*, 2016; Yakhlef *et al.*, 2018). Os alcaloides são caracterizados pela presença do átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico, são mais dispendiosos de serem produzidos e conhecidos por sua ação neurotóxica em herbívoros (Narberhaus *et al.*, 2005; Wink, 2018).

A herbivoria, geralmente, causa perda de área fotossinteticamente ativa e é um dos principais danos sofridos pelas espécies vegetais (Mello, 2007), estima-se que a taxa de herbivoria global é superior a 20% da produtividade primária líquida anual do planeta (Agrawal, 2011), sendo mais comum em folhas jovens em crescimento. O ataque por herbívoros pode gerar respostas nas espécies vegetais ligadas a fenologia, ciclo de vida, produção e concentração

de compostos secundários, podendo estar associada a mudanças ecológicas e evolutivas, assim como uma alta diversidade de plantas nos trópicos (Kursar *et al.*, 2009; Agrawal *et al.*, 2012; Coley & Kursar, 2014; Vilela *et al.*, 2014).

O Cerrado apresenta uma alta diversidade de herbívoros, em especial insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Hymenoptera (Pinheiro *et al.*, 2002; Zanuncio *et al.*, 2003), o que poderia favorecer o surgimento de defesas químicas. Porém os solos deste bioma são, em maior parte, limitados por nutrientes (Haridasan, 2000) o que desfavorece a produção de defesas químicas, especialmente de compostos mais complexos como alcaloides.

Os filtros ambientais que moldaram o Cerrado exercem uma forte pressão seletiva nas plantas, fazendo com que diferentes compostos sejam produzidos para evitar danos por fatores bióticos (por exemplo, herbivoria) ou abióticos (por exemplo, excesso de radiação UV). Fenny (1976) propôs que as plantas podem desenvolver síndromes de defesas ligadas à previsibilidade e aparência. Espécies aparentes são maiores, mais abundantes e/ou mais persistentes no sistema; por essa razão, são encontradas com maior facilidade por seus predadores, enquanto espécies não aparentes são mais difíceis de serem encontradas, apresentando geralmente um ciclo de vida menor, são menos abundantes e menores. Ligada à previsibilidade de encontrar uma espécie, está a produção de defesas químicas, em especial taninos e alcaloides. Taninos são considerados defesas quantitativas (dosagem dependente), presente em grande quantidade em folhas maduras e eficazes contra uma ampla variedade de insetos. Já os alcaloides, são barreiras qualitativas, sendo eficazes em uma baixa concentração, contudo, não muito eficazes contra insetos especialistas. Tal relação foi encontrada para plantas que compartilham um mesmo grupo de herbívoros, entretanto, no Cerrado há muitas espécies raras de herbívoros que se alimentam apenas de espécies do mesmo gênero ou família (Diniz & Morais, 1997). No Cerrado a herbivoria agiria como um filtro ambiental, estimulando a produção de defesas químicas, enquanto a produção de metabólitos pode ser limitada pela disponibilidade de nutrientes no solo.

Para auxiliar os estudos da produção e identificação de metabólitos secundários, surge a metabolômica que, em paralelo a genômica e a proteômica, tem como objetivo fazer o mapeamento dos metabólitos produzidos por diversos organismos (Oliver *et al.*, 1998). Essa técnica é utilizada em diferentes abordagens, desde a quimiotaxonomia (Dos Santos *et al.*, 2017), até abordagens ecológicas, como a interação entre organismos e resistência de plantas a fatores ambientais (Macel *et al.*, 2010; Sardans *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018). No Cerrado já

temos a aplicação da metabolômica para monitorar o comportamento de *Tithonia diversifolia*, uma espécie invasora, sob diferentes condições ambientais (Sampaio *et al.*, 2016), e outros estudos que abordam a identificação de moléculas para fins farmacêuticos e taxonômicos (Ernst *et al.*, 2014; Martucci *et al.*, 2018).

O Cerrado é conhecido por seus solos ácidos, pobres em nutrientes e com concentrações elevadas de elementos tóxicos no solo. A questão central do presente estudo é compreender se o perfil metabólico de folhas de espécies nativas é alterado pela adição de nutrientes ao solo e pela variação do pH do solo e se haverá diferenças nas taxas de herbivoria foliar em um cerrado típico. Assim, hipotetizamos que i) o perfil metabolômico das folhas será alterado em função dos tratamentos de fertilização, onde a adição de nutrientes irá estimular a produção de metabólitos secundários e ii) mudanças na concentração de nutrientes foliares e metabólitos irá aumentar a taxa de herbivoria.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste capítulo é compreender como a adição de nutrientes e mudança de pH do solo em longo prazo, em um cerrado *sensu stricto*, altera a produção de metabólitos secundários em folhas de quatro espécies lenhosas do Cerrado e há diferenças nas taxas de herbivoria foliar em função dos tratamentos.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil dos metabólitos em folhas de espécies lenhosas em função dos tratamentos de adição de nutrientes e de calagem.
- Quantificar a perda de área foliar (herbivoria) nas espécies avaliadas.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado em uma área de cerrado *stricto sensu*, localizada na Reserva Ecológica do Roncador do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (RECOR/IBGE), no Brasil central (15° 56' S; 47° 53' N). Esta reserva se encontra na Área de Proteção Ambiental (APA) Gama e Cabeça de Veado, que possui mais de 10.000 hectares de proteção ambiental contínua. A RECOR contém 1.350 hectares com diferentes formações vegetais do Bioma Cerrado. O clima da região é caracterizado como Aw, segundo a classificação de Köppen,

apresentando sazonalidade marcada em dois períodos, estação seca (abril a setembro) e chuvosa (outubro a março). A precipitação média anual é em torno de 1.450 mm, enquanto a temperatura média é de 22 °C, a umidade relativa do ar varia entre as estações, podendo chegar a 80% nos meses de chuva e abaixo dos 20% no auge da estação seca (Cavararo, 2004).

O cerrado *stricto sensu* é caracterizado pela presença contínua de gramíneas, junto com estrato arbóreo e arbustivo, com cobertura lenhosa variando de 10% a 60% (Eiten, 1994). A área possui solo do tipo Latossolo Vermelho sendo bem drenado, profundo, com pH ácido, elevada quantidade de óxidos de ferro e alumínio, porém limitado em nutrientes como P (EMBRAPA, 2006).

1.3.2 ADIÇÃO DE NUTRIENTES

A adição de nutrientes foi iniciada no ano de 1998 (Kozovits *et al.*, 2007), com aplicações bianuais até 2006, sendo retomada em novembro de 2017 e aplicação posterior em março de 2018. A aplicação de fertilizantes se deu da seguinte forma: Tratamento nitrogênio (N): adição de 100 kg/ha anuais de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄); tratamento fósforo (P): adição 100 kg/ha anuais de superfosfato simples 20% - Ca (H₂PO₄)₂ + CaSO₄.2H₂O; tratamento nitrogênio e fósforo (NP): adição de sulfato de amônio e superfosfato simples 20%; tratamento calagem (Ca): adição de 4 t/ha ao ano, na forma de 60% de calcário dolomítico (CaO+MgO) + 40% de gesso agrícola (CaSO₄.2H₂O) e controle (C) onde não houve adição de nutrientes. A aplicação dos fertilizantes foi feita a lanço sobre a camada de serapilheira e sem revolvimento do solo. Uma análise de nutrientes do solo foi realizada antes da retomada da fertilização, onde foi possível notar que ainda há efeito residual da última calagem feita no ano de 2006. Por isso, a adição de cálcio foi feita apenas no início da estação chuvosa.

Cada um dos cinco tratamentos está representado em quatro parcelas de 15 x 15 m distribuídas de forma aleatória e com distância mínima entre elas de 10 metros (Kozovits *et al.*, 2007).

1.3.3 ESPÉCIES SELECIONADAS

A partir dos dados do levantamento florístico do estrato arbustivo-arbóreo feito em outubro de 2017 (dados não publicados), as espécies selecionadas estão entre as mais abundantes na área e foram selecionadas seguindo três critérios: (1) número mínimo de 10 indivíduos por tratamento (considerando as quatro parcelas por tratamento), (2) produção de folhas em quantidade suficiente para análise de nutriente foliar, metabolômica e herbivoria e (3) fenologia (sempreverdes e brevidecíduas). Quatro espécies apresentavam todos os requisitos

e foram selecionadas, são elas: brevidecíduas: *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae) e *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae), sempreverdes: *Roupala montana* Aubl. (Proteaceae) e *Styrax ferrugineus* Nees & Mart. (Styracaceae). Para cada espécie, quando possível, indivíduos com circunferência do caule (a altura do solo), e altura semelhantes foram selecionados (Tabela 5S1).

1.3.4 HERBIVORIA E ANÁLISE DE NUTRIENTE FOLIAR

As coletas de folhas ocorreram em fevereiro de 2018, no final da estação chuvosa. Para cada tratamento foram coletados 10 indivíduos de cada espécie. Os 10 indivíduos de cada espécie foram escolhidos entre as quatro parcelas de cada tratamento pois nem todas as parcelas continham todas as espécies (Tabela 6S2). A quantidade de folhas coletadas por espécie variou em função da quantidade de folhas na copa dos indivíduos, sendo: *B. salicifolius* (20 folhas), *S. ferrugineus* (15 folhas), *C. brasiliense* (10 folhas) e *R. montana* (10 folhas). A coleta buscou ser representativa da distribuição de folhas na copa. Foram coletadas folhas maduras e completamente expandidas em ramos mais altos e ramos inferiores. As folhas foram armazenadas em caixa térmica para mantê-las frescas até posterior análise.

Em laboratório, as folhas foram digitalizadas (Epson Perfection V700 photo, 200 dpi). As imagens geradas foram processadas no programa estatístico R e analisadas utilizando o pacote Ibmage, onde foi calculada a área total das folhas e sua área perdida por herbivoria. A área foliar específica (AFE) foi determinada destas mesmas folhas, após secagem na estufa a 40 °C até atingir peso constante.

Após a secagem das folhas, estas foram pulverizadas e parte do material foi utilizado para análise de nutrientes foliares. Para as análises foram realizadas digestões nitroperclórica, seguida de determinação por colorimetria pelo método do ácido ascórbico para fósforo (P), determinação por fotometria de chama para potássio (K), determinação por espectrofotometria de absorção atômica para cálcio (Ca), magnésio (Mg), manganês (Mn) e alumínio (Al), determinação por turbidimetria para o enxofre (S) e determinação de nitrogênio (N) através do método de Kjeldahl. As análises foram realizadas no laboratório de Análise de solo, tecido vegetal e fertilizante da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

1.3.5 ANÁLISE METABOLÔMICA

Para cada indivíduo, 50 mg de folhas pulverizadas foram extraídos com 1,5 mL de metanol:água (1:1 v/v) em banho ultrassônico a 40 °C por cinco minutos. Os tubos foram

centrifugados por 10 minutos a 5.000 rpm e o sobrenadante foi filtrado através de membrana de 0,22 µm. As soluções resultantes foram analisadas em HPLC-MS/MS (Shimadzu LC-6AD acoplado a ESI-qTOF, Bruker). A coluna utilizada foi Supelco Ascentis Express C18 (15 cm x 4,6 mm, 2,7 µm de tamanho de partícula) e água ultra pura (Millipore, MA, EUA) e metanol (J. T. Baker), com ácido fórmico 0,1% (J. T. Baker) como fases móveis. A temperatura foi de 40 °C. O método de eluição analítica começou com 5% de fase orgânica e aumentou para 100% até 30 minutos. Mais 20 minutos foram usados para lavar e estabilizar a coluna. O fluxo aplicado foi de 0,6 ml/min e o volume de injeção de 20 µl. Os parâmetros da fonte de ionização foram tensão capilar 3500V, nebulizador 5,5 bar, gás seco 10 l/min e temperatura da fonte 230°C.

Os dados obtidos da análise de HPLC-MS/MS foram convertidos para mzXML usando o software MsConvert. Após a conversão, os espectros foram processados no software MZmine utilizando os módulos de detecção de massa (RT 2,5-35 min, centróide), construtor de cromatograma (MS nível 1; altura mínima $1,0 \times 10^5$; tempo mínimo 0,5 min; m/z tolerância 50 ppm), deconvolução dos espectros (Algoritmo Savitzky-Golay), agrupador de picos isotópicos (m/z tolerância 50 ppm; RT tolerância 0,1), alisamento, alinhamento de dados (Join aligner; m/z tolerância 50 ppm; RT tolerância 0,5 min) e gap-filing (intensidade tolerância 20%; m/z tolerância 50 ppm; RT tolerância 0,5 min). Deve-se salientar que, embora a aquisição tenha sido feita no modo MS/MS, onde os íons foram selecionados para fragmentação quando atingiram 10^4 de intensidade, a mineração desses dados considerou apenas os espectros de MS¹, no entanto a fragmentação foi importante para confirmar a estrutura e classe química dos íons. Os dados foram exportados e carregados na plataforma MetaboAnalyst®. A verificação de integridade dos dados foi padrão, a filtragem dos dados foi realizada pelo valor da intensidade média e a normalização foi realizada pela escala de mediana e Pareto.

1.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testar a normalidade dos dados foi feito um teste de Shapiro-Wilk, seguido de um teste t pareado para avaliar diferenças entre a concentração de nutrientes foliares nos tratamentos, em relação ao controle.

Para avaliar se os tratamentos afetaram a porcentagem de herbivoria foliar e a AFE, foi feita uma ANOVA de um fator, seguido do um pós teste de Tukey HSD. Foi testada a correlação entre herbivoria e a concentração de nutrientes foliares e, para aquelas que obtiveram correlação significativa, foi realizada uma análise de regressão.

MetaboAnalyst (Xia & Wishart, 2016) foi usado para processar os dados obtidos na análise metabolômica, onde uma ANOVA de um fator foi feita entre os cinco tratamentos e os íons detectados, seguido do pós teste de Fisher's LSD. A partir dos dados gerados na ANOVA, foi feito um diagrama (*heatmap*) com a abundância relativa dos 50 íons mais importantes para a diferenciação dos tratamentos de *B. salicifolius*, para *R. montana* a representação foi feita com 10 íons, *S. ferrugineus* com 25 íons e *C. brasiliense* com seis íons. O *heatmap* foi gerado utilizando a distância Euclidiana e o método de Ward, também no MetaboAnalyst.

Todos os testes foram realizados no programa estatístico R (<http://www.r-project.org/>), considerando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

1.4 RESULTADOS

1.4.1 ANÁLISE NUTRIENTE FOLIAR

As concentrações foliares de N, Ca, Mg e S apresentaram o mesmo padrão de resposta para todas as espécies. A concentração de N foliar não diferiu significativamente, quando comparados os indivíduos nas parcelas controle com os tratamentos enquanto a concentração foliar de S aumentou em todos tratamentos. Houve um aumento da concentração de Ca foliar nos tratamentos Ca, NP e P, e aumento da concentração de Mg foliar em resposta ao tratamento Ca (Tabela 1).

Para as espécies brevidecíduas a concentração de P foliar aumentou nos tratamentos P e NP em *B. salicifolius*, enquanto para *C. brasiliense* aumentou em todos os tratamentos, quando comparado ao controle. Assim, resultou em uma razão N:P foliar significativamente menor nos tratamentos onde houve aumento da concentração de P nas folhas. A concentração de K foliar apresentou pouca variação, sendo alterado apenas no tratamento NP em *B. salicifolius*. A concentração de Mn foliar diminuiu no tratamento Ca em *B. salicifolius* e aumentou no tratamento P e NP. De forma similar, em *C. brasiliense* a concentração de Mn foliar diminuiu no tratamento Ca e aumentou nos demais tratamentos. A concentração de Al foliar diminuiu em todos os tratamentos em *B. salicifolius*, enquanto em *C. brasiliense* não houve alteração da concentração de Al foliar em associação aos tratamentos.

Com relação às espécies sempreverdes, a concentração de P foliar aumentou nos tratamentos P e NP em *S. ferrugineus* mas não em *R. montana*. A razão N:P diminuiu significativamente no tratamento P e NP em *S. ferrugineus* e no tratamento Ca e P em *R.*

montana. A concentração de K foliar em *R. montana* não alterou-se em função dos tratamentos enquanto em *S. ferrugineus* houve um aumento da concentração de K no tratamento Ca. A concentração de Mn foliar diminuiu no tratamento Ca em *S. ferrugineus* mas não em *R. montana*. A concentração de Al foliar diminuiu no tratamento Ca para ambas as espécies sempreverdes.

Tabela 1. Concentração de nutrientes foliares de *Blepharocalyx salicifolius*, *Caryocar brasiliense*, *Roupala montana* e *Styrax ferrugineus*. Para os tratamentos controle, calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P). Valores da média \pm desvio padrão (n=10). Efeitos significativos encontrados em relação ao controle são indicados com *p < 0,05 (teste-t pareado).

Espécies e tratamentos	N (dag/Kg)	P (dag/Kg)	K (dag/Kg)	Ca (dag/Kg)	Mg (dag/Kg)	S (dag/Kg)	Mn (mg/kg)	Al (mg/kg)	N:P
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>									
Controle	1,38 \pm 0,14	0,05 \pm 0	0,34 \pm 0,06	0,63 \pm 0,1	0,2 \pm 0,03	0,07 \pm 0,01	69,64 \pm 25,47	115,35 \pm 34,85	26,59 \pm 2,74
Ca	1,29 \pm 0,13	0,06 \pm 0,01	0,28 \pm 0,06	1,02 \pm 0,11 *	0,47 \pm 0,08 *	0,16 \pm 0,04 *	14,56 \pm 9,13 *	70,35 \pm 15,3 *	22,54 \pm 3
N	1,51 \pm 0,35	0,05 \pm 0	0,28 \pm 0,04	0,56 \pm 0,1	0,2 \pm 0,02	0,15 \pm 0,04 *	77,85 \pm 21,6	82,91 \pm 20,24 *	28,58 \pm 5,96
NP	1,53 \pm 0,21	0,09 \pm 0,01 *	0,26 \pm 0,04 *	1,08 \pm 0,18 *	0,18 \pm 0,03	0,19 \pm 0,06 *	184,1 \pm 79,64 *	75,08 \pm 17,47 *	17,94 \pm 3,61 *
P	1,35 \pm 0,17	0,12 \pm 0,04 *	0,29 \pm 0,04	1,28 \pm 0,2 *	0,19 \pm 0,02	0,17 \pm 0,03 *	137,15 \pm 47,55 *	78,26 \pm 16,26 *	12,78 \pm 4,2 *
<i>Caryocar brasiliense</i>									
Controle	1,61 \pm 0,3	0,04 \pm 0	0,39 \pm 0,05	0,41 \pm 0,1	0,19 \pm 0,05	0,10 \pm 0,01	63,07 \pm 20,74	139,87 \pm 46,66	36,69 \pm 6,87
Ca	1,46 \pm 0,17	0,06 \pm 0,01 *	0,33 \pm 0,09	0,69 \pm 0,12 *	0,37 \pm 0,07 *	0,26 \pm 0,07 *	17,37 \pm 5,31 *	155,83 \pm 88,64	23,41 \pm 1,57 *
N	1,64 \pm 0,2	0,07 \pm 0,01 *	0,37 \pm 0,05	0,48 \pm 0,13	0,19 \pm 0,06	0,22 \pm 0,07 *	97,28 \pm 35,87 *	190,77 \pm 70,24	23,68 \pm 2,79 *
NP	1,48 \pm 0,18	0,06 \pm 0,01 *	0,36 \pm 0,05	0,98 \pm 0,36 *	0,13 \pm 0,02	0,41 \pm 0,09 *	217,01 \pm 113,49 *	176,5 \pm 40,62	23,93 \pm 3,5 *
P	1,45 \pm 0,21	0,05 \pm 0,01 *	0,40 \pm 0,13	1,05 \pm 0,20 *	0,13 \pm 0,03	0,37 \pm 0,06 *	191,78 \pm 48,58 *	153,42 \pm 49,04	27,23 \pm 4,03 *
<i>Roupala montana</i>									
Controle	1,05 \pm 0,13	0,05 \pm 0,01	0,26 \pm 0,08	0,23 \pm 0,08	0,17 \pm 0,03	0,06 \pm 0,01	129,14 \pm 65,97	201,14 \pm 60,1	23,41 \pm 2,89
Ca	0,87 \pm 0,1	0,05 \pm 0,01	0,23 \pm 0,07	0,49 \pm 0,15 *	0,39 \pm 0,11 *	0,26 \pm 0,07 *	89,82 \pm 29,81	79,27 \pm 17,62 *	18,91 \pm 2,68 *
N	0,97 \pm 0,1	0,05 \pm 0,01	0,26 \pm 0,09	0,26 \pm 0,08	0,17 \pm 0,03	0,19 \pm 0,09 *	144,07 \pm 62,84	221,39 \pm 48,52	20,35 \pm 1
NP	0,94 \pm 0,11	0,05 \pm 0,00	0,26 \pm 0,1	0,64 \pm 0,27 *	0,16 \pm 0,05	0,25 \pm 0,09 *	252,11 \pm 119,99	265,76 \pm 67,96	20,21 \pm 2,18
P	0,93 \pm 0,15	0,05 \pm 0,01	0,25 \pm 0,07	0,56 \pm 0,22 *	0,16 \pm 0,02	0,22 \pm 0,06 *	212,77 \pm 120,85	191,26 \pm 36,23	18,89 \pm 2,16 *
<i>Styrax ferrugineus</i>									
Controle	1,33 \pm 0,09	0,06 \pm 0,01	0,32 \pm 0,05	0,42 \pm 0,09	0,20 \pm 0,05	0,09 \pm 0,01	69,36 \pm 24,89	134,98 \pm 50,28	22,63 \pm 1,95
Ca	1,22 \pm 0,09	0,06 \pm 0,00	0,23 \pm 0,02 *	0,66 \pm 0,11 *	0,41 \pm 0,08 *	0,22 \pm 0,04 *	9,74 \pm 5,06 *	56,17 \pm 19,42 *	21,34 \pm 2,11
N	1,33 \pm 0,11	0,06 \pm 0,00	0,31 \pm 0,03	0,35 \pm 0,06	0,17 \pm 0,03	0,25 \pm 0,04 *	74,7 \pm 18,21	123,32 \pm 38,34	24,02 \pm 1,26
NP	1,39 \pm 0,13	0,08 \pm 0,02 *	0,29 \pm 0,05	0,72 \pm 0,19 *	0,15 \pm 0,02	0,25 \pm 0,03 *	86,47 \pm 19,06	108,49 \pm 32,13	17,11 \pm 2,9 *
P	1,31 \pm 0,10	0,07 \pm 0,01 *	0,30 \pm 0,03	0,87 \pm 0,16 *	0,14 \pm 0,02 *	0,23 \pm 0,04 *	103,83 \pm 30,55	111,54 \pm 30,95	17,91 \pm 1,92 *

1.4.2 METABOLÔMICA

Na análise metabolômica de *B. salicifolius* a mineração de dados no mzmine resultou em 617 íons, destes, 77 apresentaram diferenças significativas em sua abundância relativa entre o controle e pelo menos um dos tratamentos. Através da massa carga (m/z) e perfil de fragmentação foi possível estabelecer a classe química de 45 compostos, sendo 24 destes terpenos, 7 flavonoides e 3 alcaloides (Tabela 2). Apenas três alcaloides foram detectados, entretanto, todos mostram um aumento de sua abundância nas amostras das parcelas NP.

Tabela 2. Íons detectados de *Blepharocalyx salicifolius* com diferenças significativas entre o controle e ao menos um tratamento. São apresentados os valores de massa carga (m/z), tempo de retenção (TR), perfil de fragmentação (MS/MS), fórmula molecular, composto identificado e diferenciação dos grupos. Tratamentos controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P), a ordem dos tratamentos na última coluna se refere a abundância relativa (> - <).

m/z	TR (min)	MS/MS	Fórmula molecular	Identificação	Diferenciação dos grupos
971,1001	2,74	--	$C_{41}H_{30}O_{28} + H^+$ (0,2 ppm)	Tanino hidrolisável	N - C
215,0166	3,27	--	$C_6H_8O_7 + Na^+$ (0,8 ppm)	Ácido cítrico	Ca - C
171,0283	4,1	--	$C_7H_6O_5 + H^+$ (6,1 ppm)	Ácido gálico	NP - C
953,0911	4,8	--	$C_{41}H_{28}O_{27} + H^+$ (1,6 ppm)	Tanino hidrolisável	P - C
579,1484	7,3	427,0937 409,0841 301,0661 289,0659 271,0534 247,0561 191,0278 163,0305 151,0272	$C_{30}H_{26}O_{12} + H^+$ (3,2 ppm)	Derivado de procianidina	NP - C P - C
291,0860	8,5	207,0592 179,0602 165,0477 147,0355	$C_{13}H_{16}O_6 + Na^+$ (5,0 ppm)	Derivado de epicatequina	NP - C P - C
360,1436	8,8	343,1099 325,1029 220,0941 208,0909 191,0640 163,0663 147,0358	$C_{19}H_{20}NO_6 + H^+$ (3,2 ppm)	Alcaloide desconhecido	NP - C
799,0994	9,5	447,0515 335,0344 303,0089 291,0462 277,0299 273,0333 259,0198	$C_{35}H_{26}O_{22} + H^+$ (0,0 ppm)	Desconhecido	N - C NP - C P - C
467,0830	10,1	449,0602 297,0553 237,0320 153,0100	$C_{20}H_{18}O_{13} + H^+$ (1,2 ppm)	Flavonoide glicosilado	N - C NP - C P - C
769,0876	10,4	599,0657 447,0539 277,0360 153,0177	$C_{34}H_{24}O_{21} + H^+$ (1,6 ppm)	Flavonoide glicosilado	N - C NP - C P - C
619,0923	11,5	449,0607 237,0383 153,0096	$C_{27}H_{22}O_{17} + H^+$ (2,0 ppm)	Flavonoide glicosilado	N - C NP - C P - C

<i>m/z</i>	TR (min)	MS/MS	Fórmula molecular	Identificação	Diferenciação dos grupos
252,1588	13,6	235,1238 223,1234 165,0807	C ₁₄ H ₂₁ NO ₃ + H ⁺ (4,6 ppm)	Alcaloide desconhecido	NP - C
287,0547	16,8	--	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ + H ⁺ (3,0 ppm)	Flavonoide	C - Ca C - NP
525,2334	17,2	315,0716 297,0589 211,1710 193,1595 175,1482 153,0180	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₁ + H ⁺ (0,3 ppm)	Flavonoide glicosilado	Ca - C N - C
211,1667	17,4	155,0352	C ₁₁ H ₂₄ O ₂ + Na ⁺ (3,3 ppm)	Terpeno	P - C
395,1997	17,4	--	C ₂₆ H ₂₈ O ₂ + Na ⁺ (2,6 ppm)	Desconhecido	Ca - C N - C P - C
467,0832	17,9	297,0564 153,0179	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₃ + H ⁺ (1,4 ppm)	Flavonoide glicosilado	N - C
717,1339	18,6	347,1093 329,0964 311,0904 287,0828 263,0869 245,0784 233,0759 221,1452	Desconhecido	Desconhecido	N - C
455,3137	19,6	437,2940 391,2962 219,1656 201,1566 187,1409 173,1241	C ₂₉ H ₄₂ O ₄ + H ⁺ (5,3 ppm)	Terpeno	NP - C
453,2993	20,6	435,2927 219,1632	C ₂₉ H ₄₀ O ₄ + H ⁺ (2,6 ppm)	Terpeno	NP - C
358,1642	22,3	340,1481 322,1355 312,1472	C ₂₀ H ₂₄ NO ₃ + H ⁺ (3,5 ppm)	Alcaloide desconhecido	NP - C
689,3852	22,6	527,3272 185,0350	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁ + Na ⁺ (3,6 ppm)	Triterpeno glicosilado	Ca - C
275,1321	22,7	--	Desconhecido	Desconhecido	Ca - C
673,3900	23,6	511,3381 467,3516 185,0440	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀ + Na ⁺ (4,1 ppm)	Triterpeno glicosilado	Ca - C N - C P - C
259,1661	24,0	--	C ₁₅ H ₂₄ O ₂ + Na ⁺ (5,0 ppm)	Sesquiterpeno	Ca - C N - C
397,0532	24,4	--	C ₁₈ H ₁₄ O ₉ + Na ⁺ (0,9 ppm)	Desconhecido	NP - C
375,0710	24,4	360,0406 345,0210 317,0235	C ₁₈ H ₁₄ O ₉ + H ⁺ (1,6 ppm)	Desconhecido	NP - C
427,0639	24,5	--	C ₁₉ H ₁₆ O ₁₀ + Na ⁺ (0,5 ppm)	Desconhecido	Ca - C NP - C P - C
259,1662	24,9	--	C ₁₅ H ₂₄ O ₂ + Na ⁺ (4,6 ppm)	Sesquiterpeno	Ca - C N - C
523,2860	25,1	--	Desconhecido	Desconhecido	Ca - C N - C
525,3179	25,2	481,3129	C ₃₀ H ₄₆ O ₆ + Na ⁺ (2,5 ppm)	Triterpeno	Ca - C N - C NP - C
273,1124	25,4	255,0946 227,1024 169,0411	C ₁₆ H ₁₆ O ₄ + H ⁺ (1,0 ppm)	Chalcona	C - Ca C - N
509,2602	25,9	--	C ₂₃ H ₄₀ O ₁₂ + H ⁺ (0,8 ppm)	Desconhecido	P - C
527,3321	25,9	483,3300	C ₃₀ H ₄₈ O ₆ + Na ⁺ (5,2 ppm)	Triterpeno	Ca - C N - C NP - C
531,2385	26,0	--	C ₃₀ H ₃₆ O ₇ + Na ⁺ (5,0 ppm)	Triterpeno	P - C
491,2466	26,1	--	Desconhecido	Desconhecido	C - Ca C - N P - C

<i>m/z</i>	TR (min)	MS/MS	Fórmula molecular	Identificação	Diferenciação dos grupos
451,3209	26,6	433,2989 405,3070 387,2947 259,1646 201,1545 159,1080	C ₃₀ H ₄₂ O ₃ + H ⁺ (0,7 ppm)	Triterpeno	NP - C
509,2499	27,5	491,2328 273,1059 237,1426	Desconhecido	Desconhecido	P - C
495,3405	27,8	259,1624	C ₃₀ H ₄₈ O ₄ + Na ⁺ (9,1 ppm)	Triterpeno	Ca - C
323,1219	28,5	277,0899	C ₁₈ H ₂₀ O ₄ + Na ⁺ (12,4 ppm)	Chalcona	N - C NP - C P - C
515,2034	29,3	--	C ₂₉ H ₃₂ O ₇ + Na ⁺ (2,3 ppm)	Desconhecido	Ca - C N - C
203,1784	29,4	161,1297	C ₁₅ H ₂₂ + H ⁺ (7,7 ppm)	Monoterpeno	Ca - C N - C
523,2624	29,6	449,2016 341,1716 285,1111 273,1120 267,1048 153,0549	C ₂₀ H ₄₂ O ₁₅ + H ⁺ (4,2 ppm)	Diterpeno	C - Ca C - N
425,2182	29,6	365,1913 309,1220 281,1335 207,0570	C ₂₀ H ₃₄ O ₈ + Na ⁺ (7,2 ppm)	Diterpeno	Ca - C N - C NP - C
423,3092	29,8	365,1824 281,1369	C ₂₃ H ₄₄ NaO ₅ 1,4 ppm	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C
531,2328	30,31	349,1402 295,0911	C ₃₀ H ₃₆ O ₇ + Na ⁺ (5,8 ppm)	Triterpeno	Ca - C N - C
273,1802	30,35	--	--	Desconhecido	Ca - C N - C
529,2200	30,65	485,2236 349,1417 293,0785	C ₃₀ H ₃₄ O ₇ + Na ⁺ (0,4 ppm)	Triterpeno	Ca - C
423,3091	30,71	--	C ₂₅ H ₄₂ O ₅ + H ⁺ (4,6 ppm)	Sesterterpeno	Ca - C N - C NP - C
383,3146	30,76	295,2283 277,2155	Desconhecido	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C
439,287	30,84	--	--	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C
381,2322	31,05	321,1978 299,2138	Desconhecido	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C
515,2034	31,1	499,3501 381,2353 359,1965 279,0623	C ₂₉ H ₃₂ O ₇ + Na ⁺ (2,3 ppm)	Desconhecido	Ca - C N - C
297,2382	31,21	--	C ₁₆ H ₃₄ O ₃ + Na ⁺ (7,9 ppm)	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C
341,2658	31,25	--	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ + Na ⁺ (2,8 ppm)	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C P - C
385,292	31,25	--	C ₂₀ H ₄₂ O+ Na ⁺ (2,5 ppm)	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C
479,3136	31,54	--	C ₂₉ H ₄₄ O ₄ + Na ⁺ (0,2 ppm)	Triterpeno	Ca - C
429,2287	31,55	271,1506	C ₂₅ H ₃₂ O ₆ + H ⁺ (2,3 ppm)	Derivado de floroglucinol	Ca - C N - C
437,3219	31,76	237,1445	C ₂₄ H ₄₆ O ₅ + Na ⁺ (5,4 ppm)	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C
471,3398	31,84	--	Desconhecido	Desconhecido	C - Ca C - N C - P
405,297	31,86	--	C ₂₃ H ₄₂ O ₄ + Na ⁺ (2,6 ppm)	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C
503,3348	31,94	485,3223 467,3047 443,3133 303,2282 251,1635 235,1688 205,1523 198,1033	C ₃₀ H ₄₆ O ₆ + H ⁺ (4,9 ppm)	Triterpeno	C - Ca C - N C - NP C - P

<i>m/z</i>	TR (min)	MS/MS	Fórmula molecular	Identificação	Diferenciação dos grupos
409,3281	31,98	--	C ₂₃ H ₄₆ O ₄ + H ⁺ (3,1 ppm)	Desconhecido	Ca - C N - C
395,2562	32,43	259,1308	C ₂₄ H ₃₆ O ₃ + Na ⁺ (0,0 ppm)	Derivado de floroglucinol	Ca - C
313,2176	32,69	--	C ₂₁ H ₂₈ O ₂ + H ⁺ (2,7 ppm)	Desconhecido	P - C
455,3383	32,78	251,1656 203,1799	C ₂₁ H ₃₈ O ₉ + H ⁺ (1,5 ppm)	Desconhecido	C - Ca C - N C - P
447,2404	32,9	429,2237 211,0972 155,0345	C ₂₅ H ₃₄ O ₇ + H ⁺ (4,8 ppm)	Derivado de floroglucinol	C - Ca C - N C - NP C - P
315,2259	33,15	--	Desconhecido	Desconhecido	Ca - C NP - C
429,2344	33,17		C ₁₈ H ₃₆ O ₁₁ + H ⁺ (1,9 ppm)	Desconhecido	C - Ca C - N C - NP C - P
413,2661	33,32	301,1400	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ + Na ⁺ (1,6 ppm)	Terpeno	Ca - C N - C NP - C
393,2954	33,43	281,1721 167,0304 149,0235	C ₂₂ H ₄₂ O ₄ + Na ⁺ (6,8 ppm)	Terpeno	Ca - C N - C NP - C
517,2173	33,57	--	Desconhecido	Desconhecido	N - C
391,3145	34,02	277,0921 149,0231	C ₂₃ H ₄₄ O ₃ + Na ⁺ (11 ppm)	Derivado de ciclohexenol	Ca - C N - C NP - C
360,3231	34,06	--	Desconhecido	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C
441,3291	34,13	261,1502 237,1499 219,1740 205,1955 163,1124	Desconhecido	Desconhecido	C - P Ca - C
461,2545	34,81	--	C ₂₆ H ₃₆ O ₇ + H ⁺ (1,3 ppm)	Terpeno	Ca - C N - C

Ao considerar os 50 íons mais importantes para a separação dos tratamentos, o *heatmap* de *B. salicifolius* mostra uma clara diferença no perfil de metabólitos da espécie por tratamento de adição de nutrientes (Figura 1). Os indivíduos do controle formam um agrupamento isolado, geralmente apresentando menor abundância relativa dos compostos e não se misturam com indivíduos de outros tratamentos. O tratamento Ca é o único que não apresenta nenhum indivíduo próximo ao controle. Enquanto alguns indivíduos dos tratamentos N e NP estão próximos do controle, outros estão distantes, se agrupando com Ca. As amostras do tratamento com P, junto com alguns indivíduos do tratamento NP, diferem do restante por estimular um conjunto de compostos distinto dos outros tratamentos.

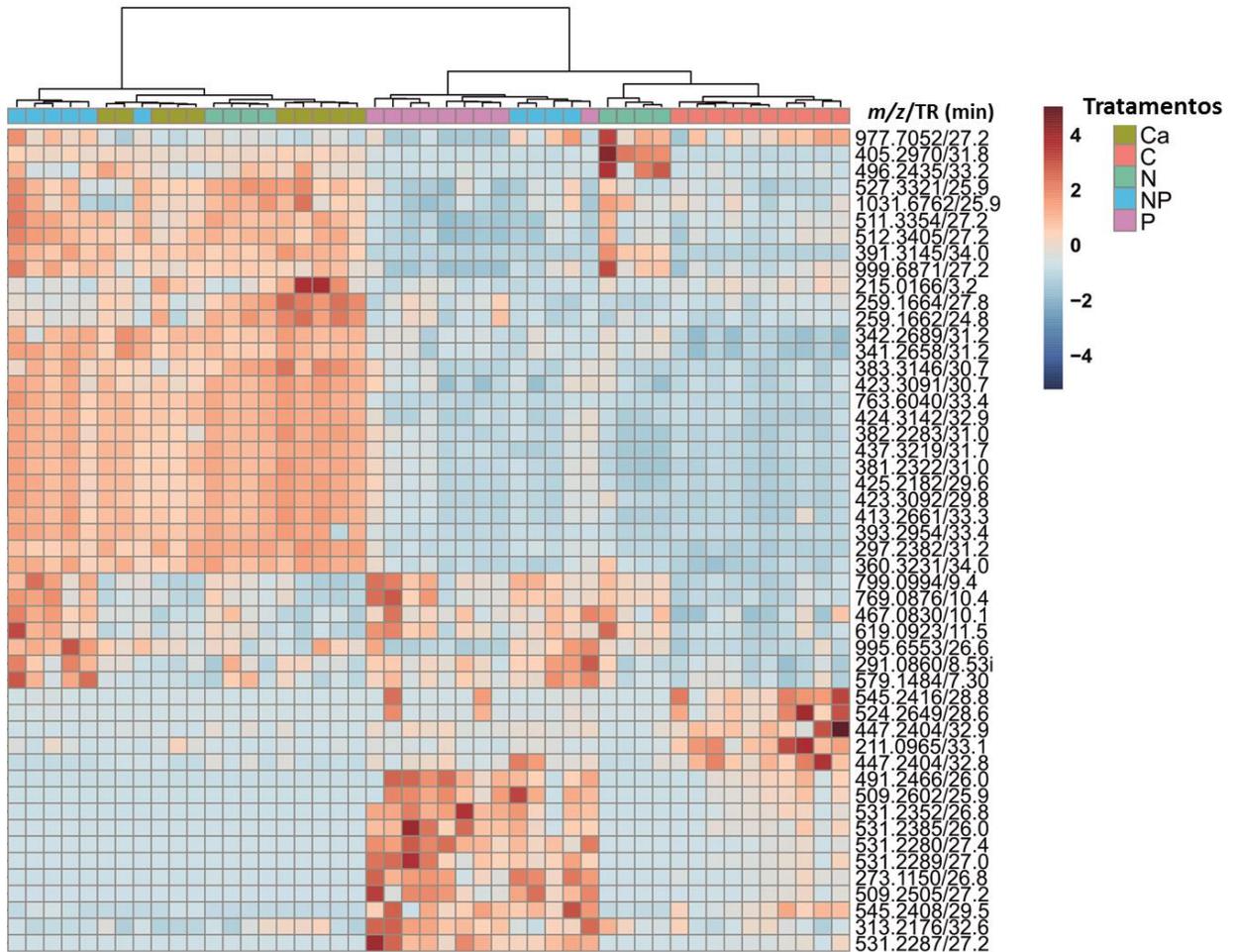


Figura 1. Abundância relativa dos 50 íons mais importantes para a diferenciação dos grupos de *Blepharocalyx salicifolius* sob diferentes tratamentos de fertilização, com agrupamento baseado na distância Euclidiana. As colorações vermelho e azul representam, respectivamente, maior e menor abundância relativa dos íons processados. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio e fósforo (NP) e fósforo (P).

Para *R. montana*, a mineração dos dados no *mzmine* resultou em 206 íons, dos quais apenas quatro apresentaram diferenças significativas em sua abundância relativa entre o controle e ao menos um dos tratamentos. Destes quatro íons, três estão mais abundantes nas parcelas Ca, o que reflete em um agrupamento destes indivíduos no *heatmap* (Figura 2). Os demais tratamentos não apresentam um padrão claro de agrupamento, contudo os indivíduos controle, em sua maioria, estão próximos a indivíduos do tratamento P.

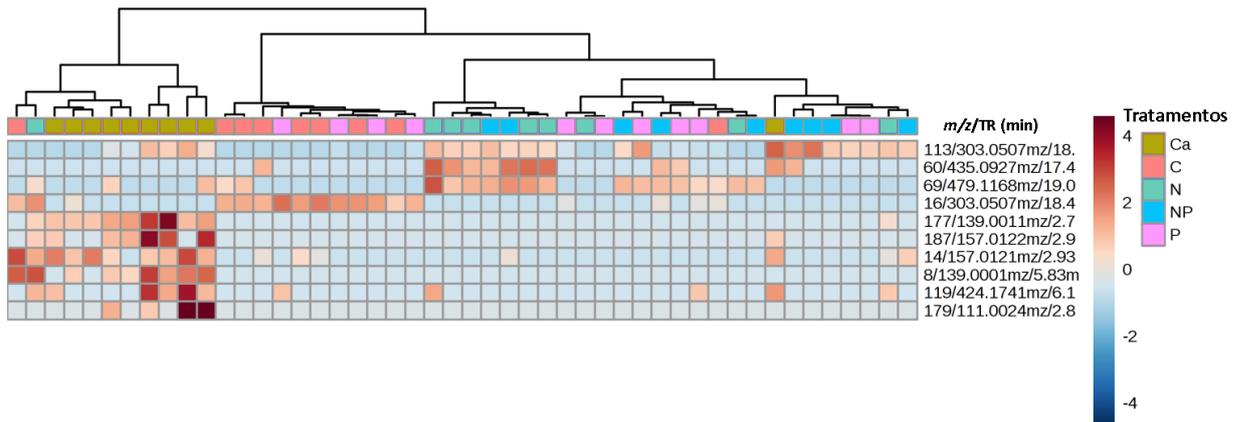


Figura 2. Abundância relativa dos 10 íons mais importantes para a diferenciação dos grupos de *Roupala montana* sob diferentes tratamentos de fertilização, com agrupamento baseado na distância Euclidiana. As colorações vermelho e azul representam, respectivamente, maior e menor abundância relativa dos íons processados. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio e fósforo (NP) e fósforo (P).

A mineração dos dados de *S. ferrugineus* resultou em 193 íons, porém, nenhum apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Assim, o *heatmap* gerado a partir de 25 íons não apresenta um perfil claro de separação dos tratamentos (Figura 3). Embora para *C. brasiliense* muitos íons tenham sido detectados, a maior parte deles estava em uma ou poucas amostras e após a filtragem dos dados apenas seis íons foram utilizados na metabolômica e construção do *heatmap* (Figura 4). Nenhum deles apresentou diferenças significativas entre tratamentos, o que também resultou em um agrupamento sem separação evidente dos tratamentos de fertilização.

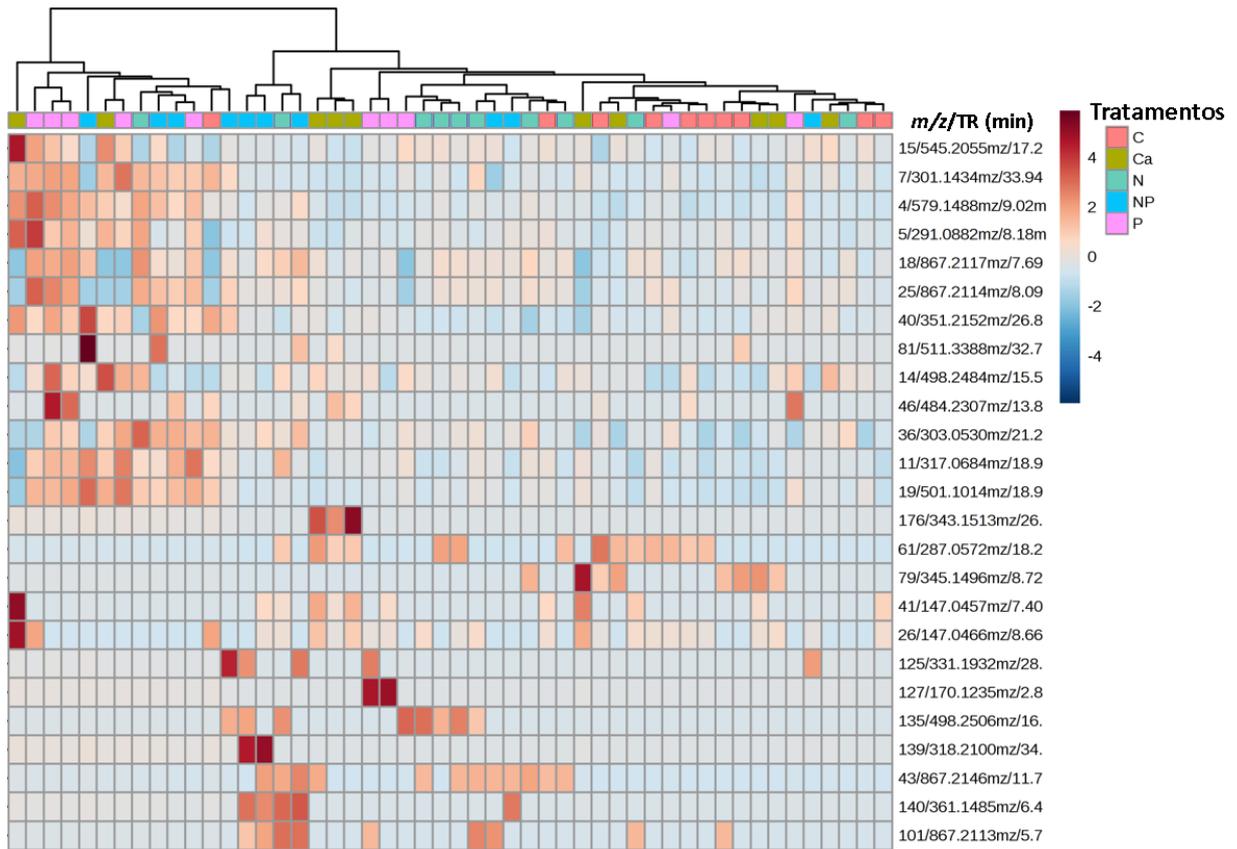


Figura 3. Abundância relativa de 25 íons de *Styrex ferrugineus* sob diferentes tratamentos de fertilização, com agrupamento baseado na distância Euclidiana. As colorações vermelho e azul representam, respectivamente, maior e menor abundância relativa dos íons processados. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio e fósforo (NP) e fósforo (P).

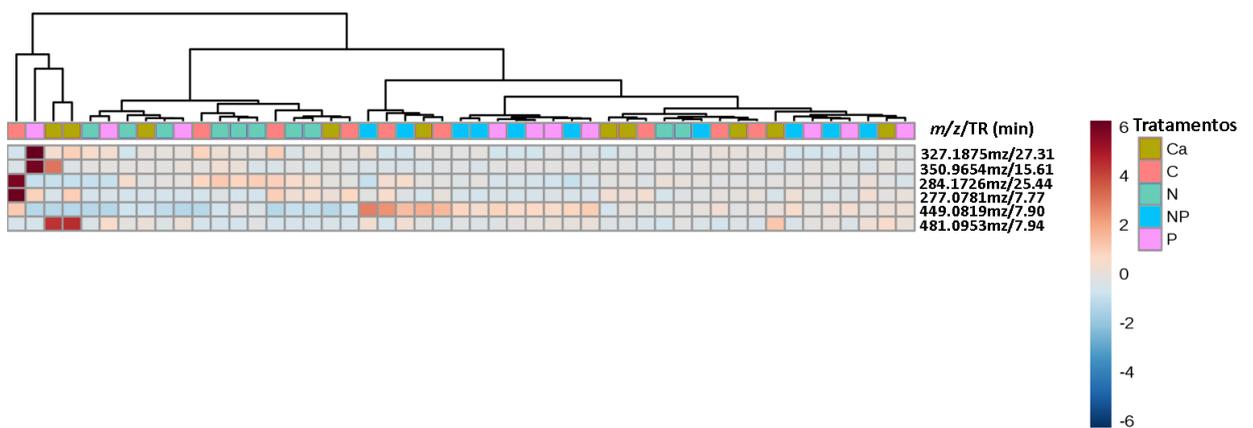


Figura 4. Abundância relativa dos seis íons processados de *Caryocar brasiliense* sob diferentes tratamentos de fertilização, com agrupamento baseado na distância Euclidiana. As colorações vermelho e azul representam, respectivamente, maior e menor abundância relativa dos íons processados. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio e fósforo (NP) e fósforo (P).

1.4.3 HERBIVORIA E ÁREA FOLIAR ESPECÍFICA

A perda de área foliar por herbivoria, para todas as espécies, foi menor que 4% em média (Figura 5). Apenas *B. salicifolius* obteve diferença na taxa de herbivoria entre tratamentos, onde Ca teve maior perda de área foliar em comparação ao controle. Ainda para *B. salicifolius*, apenas a concentração foliar de Mg mostrou correlação significativa e positiva com as taxas de herbivoria ($R = 0,42$) explicando aproximadamente 21% da área perdida ($R^2 = 0,21$ e $p = 0,000$).

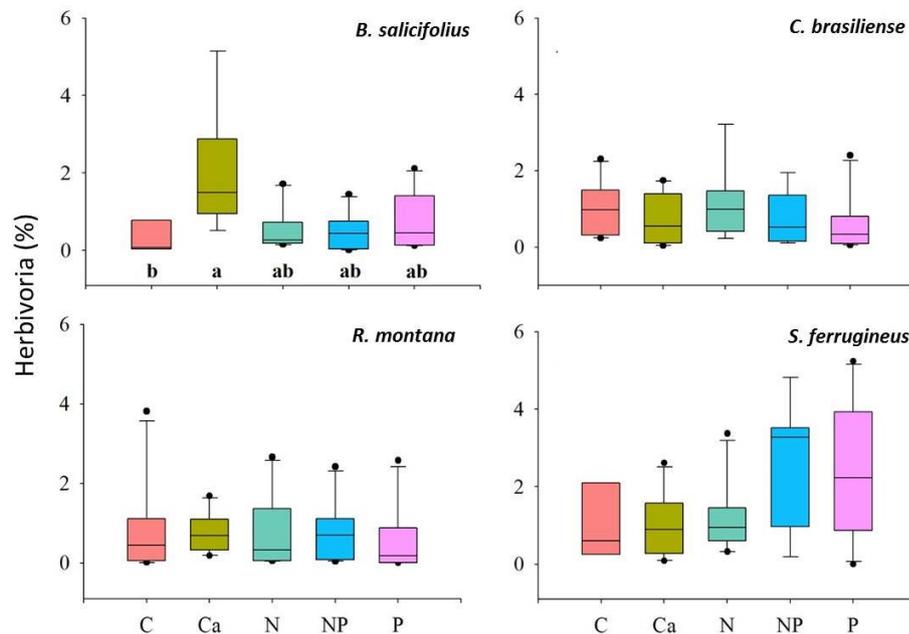


Figura 5. Herbivoria foliar (%) de *Blepharocalyx salicifolius*, *Caryocar brasiliense*, *Roupala montana* e *Styrax ferrugineus*. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P). Letras diferentes representam diferenças estatísticas, $p < 0,05$. ANOVA um fator.

A área foliar específica média de *B. salicifolius* foi de $47,5 \text{ cm}^2/\text{g}$ sendo a maior entre todas as espécies, *C. brasiliense* tem uma AFE média de $44,8 \text{ cm}^2/\text{g}$, *R. montana* possui a menor AFE com $30,44 \text{ cm}^2/\text{g}$ e *S. ferrugineus* $40,2 \text{ cm}^2/\text{g}$. Para nenhuma das espécies houve diferença significativa entre a AFE do controle e dos tratamentos (Figura 6).

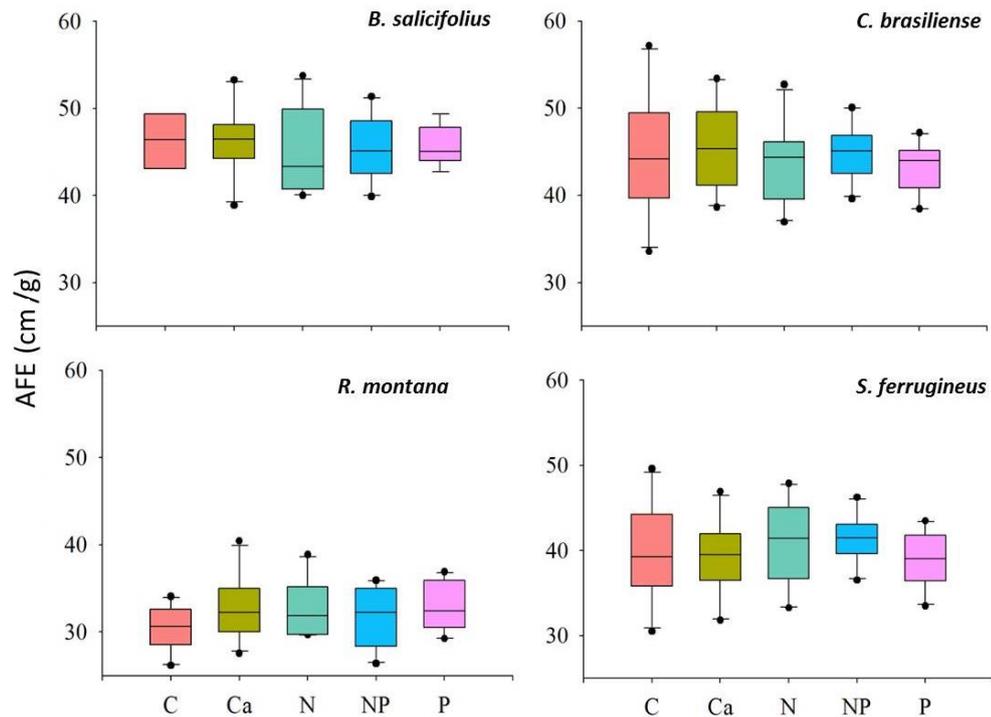


Figura 6. Área foliar específica (AFE), cm^2/g , de *Blepharocalyx salicifolius*, *Caryocar brasiliense*, *Roupala montana* e *Styrax ferrugineus*. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P).

1.5 DISCUSSÃO

A primeira hipótese deste trabalho prediz que a produção de metabólitos nas folhas será alterada em resposta aos tratamentos de fertilização. Essa hipótese foi parcialmente corroborada, *S. ferrugineus* e *C. brasiliense* não obtiveram mudanças no perfil metabolômico porém, para as outras duas espécies avaliadas a análise metabolômica mostra que, de fato, a química foliar foi influenciada pela adição de fertilizantes com clara separação dos compostos de acordo com os tratamentos, onde *B. salicifolius* mostrou separação para todos os tratamentos e *R. montana* respondeu à calagem.

Apesar de não haver um padrão claro de mudanças no metabolismo, a análise metabolômica mostra que a química foliar de *B. salicifolius* foi influenciada pela suplementação de nutrientes e, em relação à classe dos metabólitos, os flavonoides e um número considerável de terpenoides diferem do grupo controle.

Gargallo-Garriga *et al.* (2017) correlacionaram a fertilização a longo prazo (com potássio e fósforo) de *Tetragastris panamensis* com diferentes perfis metabólicos e encontraram um metabolismo regulado para cima de glicosídeos e fenólicos e uma síntese de aminoácidos reprimida. Um estudo envolvendo a suplementação de K e Ca também encontrou diferenças

nos níveis de metabólitos secundários, principalmente de fenólicos (Ahmad *et al.*, 2016). Os autores argumentam que o Ca desempenha um papel na regulação positiva da biossíntese de polifenóis (Xu *et al.*, 2014). De fato, além de ser um importante nutriente para o crescimento e desenvolvimento das plantas, estudos demonstram que alguns genes responsáveis pela classe de metabólitos secundários específicos podem ser regulados positivamente pelo Ca (Shin *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018).

Os flavonoides desempenham uma variedade de atividades biológicas nas plantas como proteção contra diferentes estresses bióticos e abióticos. Eles atuam como filtros UV, funcionam como moléculas de sinalização, compostos alelopáticos, agentes antioxidantes e compostos defensivos antimicrobianos. Os flavonoides têm papel contra a resistência à seca e podem desempenhar um papel funcional na aclimação ao calor (Samanta *et al.*, 2011). O aumento da abundância de alcaloides nas amostras das parcelas NP pode estar associada a maior disponibilidade de nutrientes para sua síntese. A produção de alcaloides, assim como outros metabólitos, sofre uma série de reações que demandam energia e fósforo para a geração de ATP (Kabera *et al.*, 2014). Esse grupo de metabólitos é sintetizado a partir de aminoácidos (Galili *et al.*, 2016) e pode se tornar mais abundante em solos com suplementação de N (Yang *et al.*, 2018). A adição conjunta de N e P é importante para manter o equilíbrio estequiométrico desses elementos no organismo e a suplementação de apenas um deles gera uma limitação do outro.

A maior parte dos compostos identificados foram terpenoides. A família Myrtaceae é rica em terpenos (Grattapaglia *et al.*, 2012; Padovan *et al.*, 2014) e uma série desses compostos já foi relatada para *B. salicifolius* (Costa *et al.*, 2014; Furtado *et al.*, 2018; Godinho *et al.*, 2014). Esses compostos desempenham diferentes funções nas espécies vegetais, porém os terpenos já reportados para essa família são usados como defensivos contra herbívoros e patógenos (Padovan *et al.*, 2014). Baseado na hipótese do balanço carbono / nitrogênio (Bryant *et al.*, 1983) os recursos excedentes da demanda de nutrientes para o crescimento foram alocados para a proteção, resultando em maior abundância de terpenos nos tratamentos de adição de nutrientes. Embora uma maior herbivoria tenha sido observada no tratamento Ca, Padovan *et al.* (2012) estudando um gênero dessa mesma família, indicam que a resistência à herbivoria é determinada pela concentração de um ou poucos compostos.

É interessante observar que apesar da mudança na composição química de algumas espécies, a AFE não diferiu entre indivíduos de parcelas fertilizadas e controle. A Área foliar específica (AFE) é uma característica chave com grande importância ecológica, pois se

correlaciona com o crescimento total da planta, e também se refere ao ganho de carbono em relação à perda de água, dentro do dossel da planta (Liu *et al.*, 2017). Espécies com menores valores de AFE estão relacionadas a um maior investimento em defesas estruturais, como folhas mais duras (Weiher *et al.*, 1999), *R. montana* apresenta a menor AFE dentre as quatro espécies e mesmo com mudanças no perfil metabólico sua AFE não alterou conforme os tratamentos. Liu *et al.* (2017), estudando diferentes espécies de plantas em uma pastagem temperada, reportaram que o clima é mais responsável pela variação da AFE do que variáveis do solo.

A concentração de macronutrientes nas folhas foi afetada pelos tratamentos de fertilização, em particular, P, Ca, Mg e S. A concentração de N foliar, entretanto, não se diferenciou entre os tratamentos e o controle em nenhuma das espécies. Concentração de Mn foliar diminui nas parcelas Ca, exceto em *R. montana*, e aumenta substancialmente nos tratamentos P e NP, para *B. salicifolius* e *C. brasiliense*. Apesar das mudanças no perfil metabólico e nutrientes foliares em resposta aos tratamentos, a taxa de herbivoria não variou significativamente entre tratamentos, com exceção do Ca para *B. salicifolius*. Assim, a hipótese de que mudanças na concentração de nutrientes foliares e compostos secundários nas folhas iriam modificar a taxa de herbivoria foliar foi corroborada apenas para uma espécie.

A baixa perda de área foliar encontrada era esperada pois, o pico de herbivoria no Cerrado ocorre no início da expansão foliar, quando as folhas estão mais nutritivas e menos tóxicas (Pinheiro *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2011). Segundo alguns autores, a herbivoria no cerrado típico é naturalmente baixa, variando de 5% a 6% (Marquis *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2010), valores similares aos que foram encontrados nesse trabalho. Mudanças na composição elementar das folhas dos indivíduos crescendo nas parcelas Ca podem estar associadas a mudanças na herbivoria, particularmente pelo aumento da concentração de Mg, diminuição de Mn e Al, assim como maior AFE.

De acordo com Ribeiro *et al.* (2017), Mn, Al e Fe são, sozinhos ou combinados, tóxicos para herbívoros do Cerrado, que tendem a procurar folhas com menor concentração desses elementos para se alimentarem. *Blepharocalyx salicifolius* possui folhas com maior AFE, sendo mais suscetível à herbivoria do que as outras espécies analisadas (Weiher *et al.*, 1999; Coley *et al.*, 2006), junto a isso, folhas das parcelas Ca tiveram cinco vezes menos Mn, quase duas vezes menos Al e o dobro de Mg comparado com os demais tratamentos. Mg é um elemento essencial para artrópodes (Joern *et al.*, 2012) e parte da estrutura da clorofila. Folhas que tem mais Mg são mais fotossinteticamente ativas (Moreira *et al.*, 2015), produzindo mais açúcares e se

tornando mais atrativas para herbívoros. Por outro lado, a fotossíntese é a principal origem de espécies reativas de oxigênio que é significativamente exacerbada durante condições de estresse ambiental (Hajiboland, 2014; Bautista *et al.*, 2016). A produção de flavonoides com características antioxidantes é necessária então para proteger as células das espécies reativas de oxigênio geradas.

As espécies avaliadas podem ser classificadas como aparentes (Fenny, 1976), devido sua maior abundância na área de estudo e crescimento lento. Segundo a síndrome de defesa proposta por Fenny (1976), é esperado um maior investimento em defesas químicas como taninos pois, como são espécies hospedeiras de vários herbívoros distintos, o investimento em defesas quantitativas (que reduziriam a digestibilidade) é importante para uma proteção mais ampla. Entretanto, não foi possível identificar uma maior produção desses compostos através da análise metabolômica e apesar da produção de metabólitos ter sido impactada de diferentes formas entre as espécies, todas tiveram respostas semelhantes ligadas a herbivoria, onde os tratamentos não diferem do controle.

Estratégias de defesas podem ter sido selecionadas em resposta à herbivoria, e mesmo em espécies não estejam filogeneticamente próximas (famílias distintas) diferentes traços evolutivos para proteção contra herbívoros podem convergir (Ehrlich & Raven, 1964; Janz, 2011). As defesas constitutivas podem estar atuando como primeira linha de defesa, em especial nas espécies sempreverdes, que apresentam menor AFE e maior quantidade de tricomas nas folhas (por exemplo, *S. ferrugineus*), o que as tornam menos palatáveis. Assim, a maior disponibilidade de nutrientes no solo tem um impacto maior no perfil metabólico das espécies, podendo estimular a produção de fenólicos e terpenos, e não é tão significativo na interação com insetos herbívoros mastigadores (com exceção de *B. salicifolius* no tratamento Ca).

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES NA ABUNDÂNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E INTERAÇÕES ACIMA E ABAIXO DO SOLO

2.1 INTRODUÇÃO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA), são fungos endofíticos biotróficos obrigatórios, que fazem associação com mais de 80% das plantas vasculares e enquanto estas fornecem aos fungos açúcares produzidos durante a fotossíntese, os fungos micorrízicos arbusculares disponibilizam maiores suprimentos de nutrientes (principalmente P) e água para as plantas, auxiliando no combate ao estresse nutricional e hídrico (Bucher, 2007; Bonfante & Anca, 2009). Outro benefício dessa associação é a maior resistência ao ataque de parasitas e patógenos em plantas colonizadas, também conferindo maior tolerância a metais tóxicos no solo, como o alumínio (Gange *et al.*, 2003; Kula *et al.*, 2005; Aguilera *et al.*, 2015).

Existe uma gama de estudos que abordam as relações multitróficas entre plantas e seus hospedeiros (Shikano, 2017; Dyer & Forister, 2019). As interações entre plantas, herbívoros e microrganismos tem sido alvo de investigações ecológicas, que buscam compreender como estas irão interagir com organismos em ambientes tão distintos (Hartley & Gange, 2009; Pineda *et al.*, 2010). FMAs se mostram muito importantes na interação planta - herbívoros, deixando-a mais resistente aos danos causados por estes, não só na parte aérea mas também na rizosfera, podendo estimular a produção de metabólitos secundários tanto acima quanto abaixo do solo (Rashid & Chung, 2017).

A associação entre fungos micorrízicos arbusculares e plantas se inicia no solo através de sinalização química, onde a planta libera compostos fenólicos para atração de espécies de fungos micorrízicos e outros microrganismos simbiotes. Por outro lado, a associação com FMA também estimula a produção de uma série de metabólitos, dentre eles o blumenol, que é produzido nas raízes e folhas de seus hospedeiros e conhecido como indicativo de micorrização (Wang *et al.*, 2018).

Os FMAs são bastante estudados na área da agronomia, sendo utilizados como bioindicadores de solos agricultáveis e usados na recuperação e manejo de áreas degradadas (Mergulhão *et al.*, 2014; Oehl *et al.*, 2017). No Cerrado são usados como forma de melhorar a produção das culturas do milho e da soja (Miranda & Miranda, 2002; Oliveira *et al.*, 2009; Cordeiro *et al.*, 2015), porém estudos em áreas naturais são menos (Calaça, 2018).

O Cerrado brasileiro vem sofrendo grande perda de suas áreas naturais e a supressão da vegetação nativa e conversão em paisagens antropizadas já ultrapassam os 48% da área original do Bioma (MMA, 2011). Parte significativa dessa conversão se deve à agricultura. Em função dos solos predominantemente ácidos e com baixa capacidade de troca catiônica, práticas de manejo como a calagem, para diminuir a acidez, e fertilização são comuns. A entrada de nutrientes em áreas naturais e mudanças nos parâmetros do solo são fatores que podem influenciar o funcionamento dos sistemas naturais.

O pH do solo tem influência na disponibilidade de P e cátions básicos e quanto mais baixo o pH, menor a disponibilidade destes para a vegetação (Fageria & Baligar, 2008). A disponibilidade de nutrientes no solo altera a eficiência do uso de nutrientes pelas plantas (Güsewell & Gessner, 2009). Em condições de solos mais ácidos, há produção de matéria orgânica rica em lignina e pobre em P, tornando a decomposição mais lenta e dominada por fungos. Portanto, a acidez do solo regula duas funções importantes do ecossistema, a produção primária e a decomposição, e uma vez alterada, haverá um impacto no estabelecimento de relações acima e abaixo do solo (Fujii *et al.*, 2018).

Assim, hipotetizamos que i) a adição de nutrientes e mudança do pH do solo alteram a abundância de esporos de FMA na rizosfera de espécies lenhosas de um cerrado *sensu stricto*, onde o aumento no pH está associado ao aumento da abundância de esporos de FMA e menor disponibilidade de P diminui a abundância de esporos de FMA e ii) interações acima e abaixo do solo irão responder na mesma direção, onde o tratamento com maior abundância de esporos de FMA no solo rizosférico de espécies lenhosas será aquele com maior abundância relativa de metabólitos foliares.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste capítulo é avaliar se a adição de nutrientes ao solo e a calagem em longo prazo, em um cerrado *sensu stricto*, altera a abundância de esporos micorrízicos arbusculares no solo rizosférico e como essas relações abaixo e acima do solo (herbivoria e perfil metabólico foliar) são alteradas em função da adição de fertilizantes, para quatro espécies arbóreas do Cerrado.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a abundância de esporos de FMA no solo rizosférico de quatro espécies em função dos tratamentos de adição de nutrientes e calagem.
- Avaliar a influência dos tratamentos de adição de nutrientes nas respostas acima (herbivoria e perfil metabólico) e abaixo do solo (abundância de esporos micorrízicos arbusculares no solo rizosférico).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado em uma área de cerrado *stricto sensu*, localizada na Reserva Ecológica do Roncador do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (RECOR/IBGE), no Brasil central (15° 56' S; 47° 53' N). Esta reserva se encontra na Área de Proteção Ambiental (APA) Gama e Cabeça de Veado, que possui mais de 10.000 hectares de proteção ambiental contínua. A RECOR contém 1.350 hectares com diferentes formações vegetais do Bioma Cerrado. O clima da região é caracterizado como Aw, segundo a classificação de Köppen, apresentando sazonalidade marcada em dois períodos, estação seca (abril a setembro) e chuvosa (outubro a março). A precipitação média anual é em torno de 1.450 mm, enquanto a temperatura média é de 22 °C, a umidade relativa do ar varia entre as estações, podendo chegar a 80% nos meses de chuva e abaixo dos 20% no auge da estação seca (Cavararo, 2004).

O cerrado *stricto sensu* é caracterizado pela presença contínua de gramíneas, junto com estrato arbóreo e arbustivo, com cobertura lenhosa variando de 10% a 60% (Eiten, 1994). A área possui solo do tipo Latossolo Vermelho sendo bem drenado, profundo, com pH ácido, elevada quantidade de óxidos de ferro e alumínio, porém limitado em nutrientes como P (EMBRAPA, 2006).

2.3.2 ADIÇÃO DE NUTRIENTES

A adição de nutrientes foi iniciada no ano de 1998 (Kozovits *et al.*, 2007), com aplicações bianuais até 2006, sendo retomada em novembro de 2017 e aplicação posterior em março de 2018. A aplicação de fertilizantes se deu da seguinte forma: Tratamento nitrogênio (N): adição de 100 kg/ha anuais de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄); tratamento fósforo (P): adição 100 kg/ha anuais de superfosfato simples 20% - Ca (H₂PO₄)₂ + CaSO₄.2H₂O; tratamento nitrogênio e fósforo (NP): adição de sulfato de amônio e superfosfato simples 20%; tratamento calagem (Ca): adição de 4 t/ha ao ano, na forma de 60% de calcário dolomítico (CaO+MgO) +

40% de gesso agrícola ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e controle (C) onde não houve adição de nutrientes. A aplicação dos fertilizantes foi feita a lanço sobre a camada de serapilheira e sem revolvimento do solo. Uma análise de nutrientes do solo foi realizada antes da retomada da fertilização, onde foi possível notar que ainda há efeito residual da última calagem feita no ano de 2006. Por isso, a adição de cálcio foi feita apenas no início da estação chuvosa.

Cada um dos cinco tratamentos está representado em quatro parcelas de 15 x 15 m distribuídas de forma aleatória e com distância mínima entre elas de 10 metros (Kozovits *et al.*, 2007).

2.3.3 SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS

Considerando espécies selecionadas no capítulo 1 - *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae), *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae), *Roupala montana* Aubl. (Proteaceae) e *Styrax ferrugineus* Nees & Mart. (Styracaceae) - 25 indivíduos de cada espécie (cinco indivíduos por tratamento) foram selecionados para amostragem de solo rizosférico.

2.3.4 COLETAS E ANÁLISE DE SOLO

Amostras de solo rizosférico para a extração das fungos micorrízicos arbusculares foram coletadas em março de 2018 (final de estação chuvosa) sob 25 indivíduos de cada espécie. A coleta de solo foi realizada em quatro pontos em linhas de interseção (cruz) sob a zona de influência da copa do indivíduo. Após a coleta, o solo foi posto para secar em temperatura ambiente.

Cinco amostras de solo (0-10 cm de profundidade) por parcela e fora da área de influência das copas das árvores foram coletadas para as análises de nutrientes do solo. As amostras foram compostas por cada parcela, totalizando quatro amostras compostas por tratamento. As análises incluíram determinação do pH em água, P disponível em Mehlich-1, Ca^{2+} por solução extratora em KCl e analisado por método volumétrico de absorção atômica, porcentagem de saturação por alumínio, capacidade de troca catiônica efetiva (CTC) e concentração de K pelo método de Mehlich-1 e determinação por espectrofotometria de chama (EMBRAPA, 2017). Métodos realizados no laboratório de análise de solo, tecido vegetal e fertilizante da Universidade Federal de Viçosa (UFV). N total foi determinado por espectrômetro de massas com razão isotópica Thermo Quest-Finnigan Delta Plus (Finnigan-MAT; CA) interfaceado com um Analisador Elementar (Carla Erba modelo 1110; Milão, Itália) no Laboratório de Ecologia Isotópica, CENA-USP, Brasil.

2.3.5 EXTRAÇÃO E CONTAGEM DE ESPOROS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Foram utilizados 50 g de amostra composta do solo seco, de cada indivíduo, para extração de esporos de FMA através do método de peneiração úmida, descrito por Gerdemann e Nicolson (1963). A amostra de solo foi diluída em 1 L de água e agitada em uma bateadeira por 40 segundos, seguido de 30 segundos de descanso da mistura solo-água, para que as partículas mais pesadas se depositassem no fundo. Após o tempo de descanso a mistura foi vertida sobre peneiras com diferentes tamanhos de malha, 0,05 mm, 250 μ m e 53 μ m, sendo as duas últimas as responsáveis por reter os esporos de FMA. Esse processo se repete de 6 a 7 vezes, para cada amostra, afim de garantir a extração quase por completa dos esporos micorrízicos arbusculares no solo. Após esse processo, o que ficou retido nas peneiras de 250 μ m e 53 μ m foram transferidos para tubos falcon. Após a extração, temos a purificação das amostras para a retirada de impurezas e permanência apenas dos esporos de FMA. O início do processo de purificação se dá com a centrifugação das amostras a 3.000 rpm durante 3 minutos, seguido da adição de solução de sacarose a 60% e posterior centrifugação, 2.000 rpm durante 2 minutos (Jenkins, 1964). Após extração e purificação, os esporos de FMA foram enxaguados para retirada da sacarose, e os tubos falcon com as amostras foram armazenados no congelador, com 7,5 mL de água. Posteriormente foram descongelados para contagem em placa canaletada.

2.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testar a normalidade dos dados foi feito um teste de Shapiro-Wilk, seguido de um teste t pareado para avaliar diferenças entre as variáveis do solo nos tratamentos em relação ao controle. Para a análise da contagem de esporos de FMA, foram realizadas 5.000 permutações e, em seguida, o intervalo de confiança de 95% foi comparado a cada tratamento em relação ao controle. Para avaliar se existe variação do número de esporos de FMA entre as espécies foi realizada uma ANOVA dois fatores.

Para testar como os esporos de FMA e os 10 íons mais relevantes nas amostras de folhas de *B. salicifolius* se relacionam com os tratamentos, foi feita uma análise de componentes principais (PCA). Em seguida, foi testada uma PERMANOVA com distância Euclidiana para confirmar a divisão dos grupos. Todos os testes foram realizados no programa estatístico R (<http://www.rproject.org/>), considerando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 PARÂMETROS QUÍMICOS DO SOLO

A comparação das variáveis do solo entre parcelas fertilizadas e controle mostrou maiores diferenças para parcelas Ca e NP (Tabela 3). A concentração de P disponível diminuiu mais de 2,5 vezes no tratamento calagem em comparação ao controle, enquanto nos tratamentos P e NP a disponibilidade de P aumentou em 4 vezes. O pH e a CTC aumentaram nas parcelas do tratamento Ca, enquanto a saturação por alumínio foi reduzida a zero. A concentração de K trocável diminuiu 2,8 vezes, enquanto a concentração de Mg trocável aumentou 25 vezes no tratamento Ca. Já a concentração de Ca trocável no solo aumentou em quase 2 vezes nos tratamentos NP e P, enquanto no tratamento Ca houve um aumento de 24 vezes em relação ao controle. Os tratamentos de adição de N, P e NP resultaram em um pH mais baixo em comparação ao tratamento controle. A concentração de N total no solo não diferiu entre os tratamentos.

Tabela 3. Valores das variáveis do solo para controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P). Valores da média \pm desvio padrão (n=4). Efeitos significativos encontrados em relação ao controle são indicados com * $p < 0,05$ (teste-t pareado).

Tratamento	pH em água	P disponível (mg/dm ³)	N (%)	CTC (cmolc/dm ³)	Saturação por Al	K (mg/dm ³)	Mg (cmolc/dm ³)	Ca (cmolc/dm ³)
C	4,72 \pm 0,13	1,70 \pm 0,31	0,19 \pm 0,02	1,31 \pm 0,18	72 \pm 5,25	28,75 \pm 5,36	0,11 \pm 0,03	0,19 \pm 0,04
Ca	6,43 \pm 0,05 *	0,65 \pm 0,29 *	0,18 \pm 0,02	7,44 \pm 0,2,0 *	0 \pm 0 *	10,75 \pm 1,64 *	2,73 \pm 0,13 *	4,69 \pm 0,18 *
N	4,09 \pm 0,06 *	1,28 \pm 0,11	0,19 \pm 0,01	1,67 \pm 0,16	82,78 \pm 0,65	22,75 \pm 2,95	0,08 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02
NP	4,11 \pm 0,15 *	6,98 \pm 2,48 *	0,20 \pm 0,01	2,05 \pm 0,15 *	71,25 \pm 7,48	28,5 \pm 2,87	0,13 \pm 0,07	0,40 \pm 0,15 *
P	4,30 \pm 0,03 *	6,60 \pm 2,32 *	0,17 \pm 0,01	1,53 \pm 0,21	69,05 \pm 5,19	26,75 \pm 2,17	0,10 \pm 0,02	0,30 \pm 0,05 *

2.4.2 ABUNDÂNCIA DE ESPOROS DE FMA

A abundância de esporos de FMA apresentou um aumento de 16%, 24% e 51% no tratamento Ca em relação ao controle na rizosfera de *B. salicifolius*, *R. montana* e *C. brasiliense*, respectivamente. Ainda na rizosfera de *C. brasiliense*, houve um aumento de 29% na abundância de esporos de FMA no tratamento NP em relação ao controle. Já na rizosfera de *S. ferrugineus*, o tratamento N apresentou um aumento de 16% na abundância de esporos de FMA (figura 7). Por outro lado, a abundância de esporos de FMA na rizosfera de *R. montana* e *S. ferrugineus* diminuiu 20% e 30%, respectivamente, no tratamento P (figura 7). A partir de uma análise de permutação, não houve uma diferença do número total de esporos de FMA entre as espécies, sendo que os valores variaram de 1.175 a 5.200.

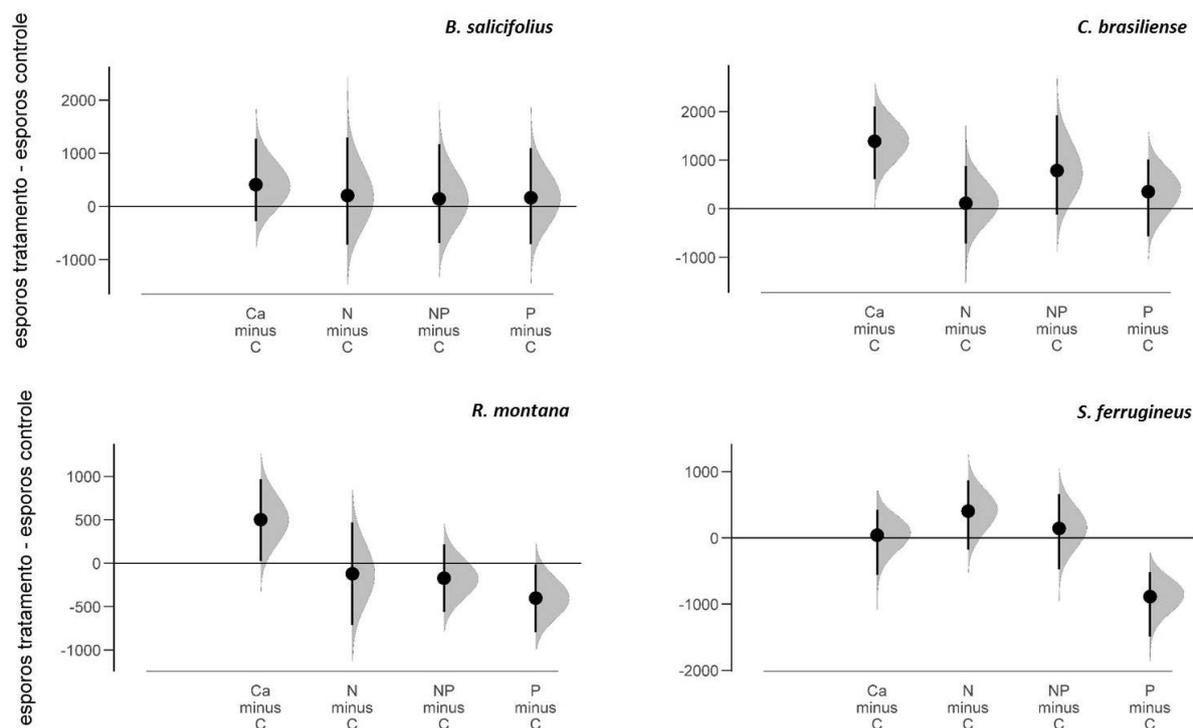


Figura 7. Diferença entre o número total de esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de *Blepharocalyx salicifolius*, *Caryocar brasiliense*, *Roupala montana* e *Styrax ferrugineus* nos tratamentos calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P) e o número total de esporos de fungos micorrízicos arbusculares no controle (C). Figura gerada a partir de 5.000 permutações e intervalo de confiança de 95%, barras verticais indicam esse intervalo.

2.4.3 INTERAÇÕES ACIMA E ABAIXO DO SOLO

Para análise de componentes principais, foi selecionada a espécie *B. salicifolius* como modelo pois esta apresentou mais metabólitos foliares em resposta aos tratamentos de fertilização.

Os dois eixos da PCA explicam 78,12% da variação total em relação ao número de esporos de FMA e aos 10 íons mais relevantes da análise metabolômica (Figura 8). O controle está separado em um grupo diferente dos demais tratamentos ($p=0,00$), enquanto N e Ca não apresentam diferenças significativas entre si ($p=0,47$). As amostras do tratamento N não se agrupam com as amostras do tratamento P ($p=0,03$), mas o tratamento NP é similar a ambos, com diferença significativa apenas em relação ao P ($p= 0,029$). A abundância de esporos de FMA não está relacionada com nenhum tratamento. A separação entre os grupos se deu principalmente pela diferença entre os íons, onde o íon 4 é o único que se relaciona ao controle. Dos 10 íons utilizados na PCA, apenas três foram identificados. O segundo íon mais importante, um derivado de ciclohexano é mais abundante nos tratamentos em relação ao controle enquanto o sétimo íon mais importante, um triterpeno é mais abundante no tratamento P e o décimo íon

mais importante, um terpeno é mais abundante nos tratamentos em relação ao controle (Tabela 4).

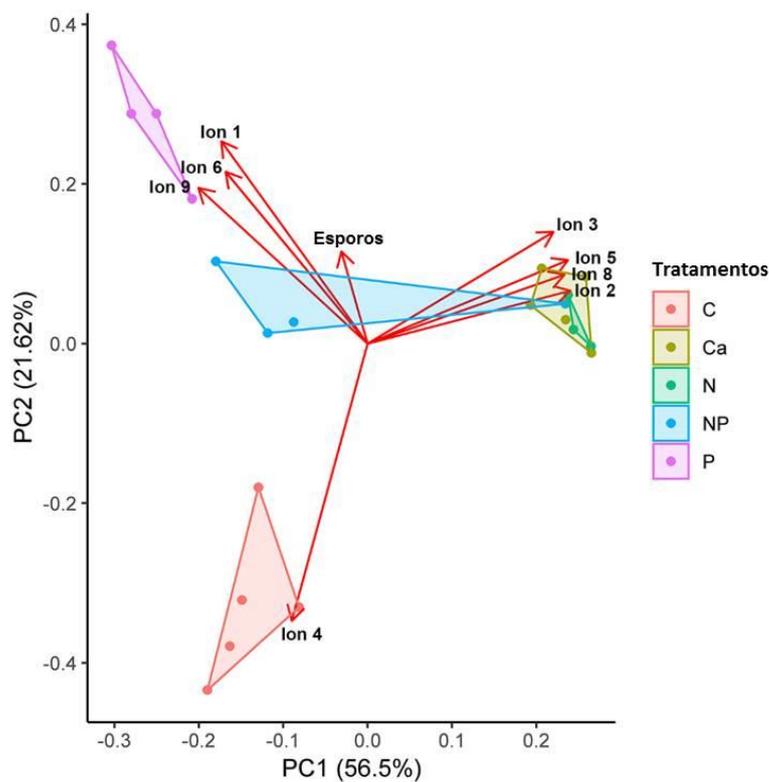


Figura 8. Análise de componentes principais (PCA) para esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera e os 10 íons mais importantes para a diferenciação dos tratamentos de *Blepharocayx salicidolius*. Tratamentos: controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P). Eixos explicam 78,12% da variação. Íons 7 e 10 foram removidos da análise em função da correlação com os íons 1 e 2, respectivamente.

Tabela 4. 10 íons mais importantes em folhas de *Blepharocalyx salicifolius* para a diferenciação dos tratamentos, do mais relevante ao menos. São apresentados os valores de massa carga (m/z), tempo de retenção (TR), perfil de fragmentação (MS/MS), fórmula molecular, composto identificado e diferenciação dos grupos. Tratamentos controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P), a ordem dos tratamentos na última coluna se refere a abundância relativa (> - <).

	m/z	TR (min)	MS/MS	Fórmula molecular	Identificação	Diferenciação dos grupos
1	509,2499	27,5	491,2328 273,1059 237,1426	Desconhecido	Desconhecido	P - C
2	391,3145	34,02	277,0921 149,0231	C ₂₃ H ₄₄ O ₃ + Na ⁺ (11 ppm)	Derivado de ciclohexenol	Ca - C N - C NP - C
3	341,2658	31,25	--	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ + Na ⁺ (2,8 ppm)	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C P - C
4	429,2344	33,17	--	C ₁₈ H ₃₆ O ₁₁ + H ⁺ (1,9 ppm)	Desconhecido	C - Ca C - N C - NP C - P
5	297,2382	31,21	--	C ₁₆ H ₃₄ O ₃ + Na ⁺ (7,9 ppm)	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C
6	313,2176	32,69	--	C ₂₁ H ₂₈ O ₂ + H ⁺ (2,7 ppm)	Desconhecido	P - C
7	531,2385	26,0	--	C ₃₀ H ₃₆ O ₇ + Na ⁺ (5,0 ppm)	Triterpeno	P - C
8	360,3231	34,06	--	Desconhecido	Desconhecido	Ca - C N - C NP - C
9	491,2466	26,1	--	Desconhecido	Desconhecido	C - Ca C - N P - C
10	393,2954	33,43	281,1721 167,0304 149,0235	C ₂₂ H ₄₂ O ₄ + Na ⁺ (6,8 ppm)	Terpeno	Ca - C N - C NP - C

2.5 DISCUSSÃO

Estudos que relatam a relação entre distúrbios do solo em áreas naturais do Cerrado e FMA ainda são escassos (Ferreira *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2016). No presente estudo, a primeira hipótese indicando que a adição de nutrientes ao solo e mudanças no pH alteram a abundância de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera, foi corroborada. Todas as espécies apresentaram variações na abundância de esporos de FMA em ao menos um dos tratamentos experimentais em relação ao controle.

No tratamento Ca, é possível observar um aumento no número de esporos de FMA na rizosfera de *B. salicifolius*, *C. brasiliense* e *R. montana*. Além da mudança no pH do solo, outros fatores que podem contribuir com maior abundância de FMA é a alta cobertura de gramíneas observada nesse tratamento (Rondina *et al.*, 2014; Mello, 2019), que causa um aumento na abundância de raízes finas para colonização (Miranda *et al.*, 2007; Zangaro *et al.*, 2013; Zangaro *et al.*, 2018). Um levantamento florístico realizado em 2007/2008 indicou uma maior cobertura de *Melinis minutiflora* (gramínea C4 exótica) nos tratamentos N e NP, enquanto no controle essa espécie não ocorria (Bustamante *et al.*, 2012). No levantamento posterior, em

2015 (Mello *et al.* submetido), houve uma redução de 50% da cobertura de *M. minutiflora* nas parcelas NP e aumento de 50% nas parcelas Ca. No entanto, é preciso considerar que o que pode estar ocorrendo na rizosfera das espécies não se reflita exatamente na abundância de esporos de FMA, uma vez que estas são formas de resistência e podem não ser uma representação exata do que é efetivamente ativo na comunidade, especialmente em condições de alteração pH do solo e disponibilidade de nutrientes (Weber *et al.*, 2019).

A fertilização do solo, em alguns casos, gera respostas na composição e riqueza das comunidades de FMA, levando à seleção de alguns grupos (Miranda *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2017). O aumento na abundância de esporos de FMA no tratamento N, na rizosferas de *S. ferrugineus*, e tratamento NP, na rizosfera de *C. brasiliense*, pode estar associada à maior demanda de P causada pela suplementação com N. A adição de nitrogênio no solo causa um desbalanço na estequiometria das espécies vegetais (Sardans *et al.*, 2012), podendo afetar seu metabolismo e crescimento (Matzek & Vitousek, 2009). Para compensar essa maior demanda de P, as espécies investem em mecanismos para aumentar a absorção de P e associações micorrízicas podem ajudar a suprir suas demandas nutricionais (Phoenix *et al.*, 2003).

Para ambas as espécies sempreverdes, *R. montana* e *S. ferrugineus*, houve uma diminuição do número de esporos de FMA nas parcelas fertilizadas com P. Tal resposta pode indicar maior controle no uso de recursos em solos com maior suprimento de P por meio da redução de interações micorrízicas, uma vez que não necessitam mais do investimento em simbiontes para a aquisição deste nutriente (Liu *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018). Por outro lado, mesmo com maior disponibilidade de P, não houve alteração na abundância de esporos de FMA na rizosfera das espécies brevidecíduas, *B. salicifolius* e *C. brasiliense*. Espécies brevidecíduas possuem uma maior demanda para mobilização de nutrientes para produção de folhas novas (Damascos *et al.*, 2005), o que pode estar intensificando a absorção de P e mantendo as interações com fungos micorrízicos arbusculares. Além disso, a relação planta – FMA envolve outros processos que não só a absorção de nutrientes, tais como a proteção química da planta contra estresse hídrico, ataque de patógenos, excesso de radiação, o estímulo do crescimento vegetal e proteção da planta contra elevada saturação de Al no solo (Jung & Martinez-Medina, 2012; Rapparini & Peñuelas, 2013; Aguilera *et al.*, 2015) tornando a associação necessária em solos ácidos como do Cerrado, mesmo em condições de menor limitação nutricional.

A segunda hipótese indicava que as mudanças acima e abaixo do solo responderiam na mesma direção, foi corroborada para duas espécies avaliadas. No tratamento Ca, houve um

aumento do número de esporos de FMA na rizosfera de *B. salicifolius* e *R. montana* e estas espécies também apresentaram uma maior abundância relativa de parte dos compostos detectados na análise metabolômica. Esses resultados mostram como as interações que ocorrem nas duas interfaces de interação das plantas podem estar associadas. A análise de componentes principais com dados de *B. salicifolius* (Figura 8) indica que alguns metabólitos estão associados com a separação dos tratamentos Ca e N em relação ao controle e P, enquanto o controle está separado dos demais tratamentos (Figura 1, capítulo 1).

Em geral, a vegetação do Cerrado evoluiu em um contexto de solos ácidos e distróficos, com alta concentração de metais como Al, Fe e Mn (Haridasan, 2000; 2008). Estudos anteriores indicaram que a comunidade de plantas do Cerrado são colimitadas por N e P (Bustamante *et al.*, 2012). A fertilização pode induzir a alocação de nutrientes para a produção de compostos secundários, em vez do crescimento das plantas, desde que terpenos e outros metabólitos possam agir como mecanismos de defesa (Sardans *et al.*, 2015; Tholl, 2015). Em ambientes pobres em nutrientes, pode ser mais vantajoso para as plantas investir na proteção das estruturas já existentes em vez de investir em estruturas novas (Coley *et al.*, 1985; Fine *et al.*, 2006; Züst & Agrawal, 2017). Contudo, a história evolutiva das espécies é determinante em suas respostas à disponibilidade de nutrientes no solo. *Blepharocalyx salicifolius* apresenta maior plasticidade de respostas em relação as demais espécies avaliadas pois, parte da sua história evolutiva se deu em solos mesotróficos (De Crvalho, 2013) o que pode permitir que a espécie responda mais prontamente a uma maior disponibilidade de nutrientes no solo. Em contraponto, *R. montana* não apresenta muitas respostas à entrada de nutrientes no sistema. Essa espécie pertence à família Proteaceae, adaptadas a regiões de solos oligotróficos (especialmente limitados em P) (Lambers *et al.*, 2011) o que faz com que mesmo a adição de nutrientes no solo não resulte em uma maior capacidade da planta em absorver e alocar tais nutrientes.

Os perfis de metabólitos das folhas de *B. salicifolius* e *R. montana* mostram significativas mudanças de acordo com os diferentes tratamentos. Entretanto, mudanças nas interações abaixo (esporos de FMA) e acima do solo (herbivoria em *B. salicifolius*) foram evidentes em indivíduos no tratamento Ca. A calagem altera profundamente as variáveis do solo, incluindo o pH, um dos mais importantes fatores no funcionamento de ecossistemas terrestres interferindo desde a produção e ativação de enzimas, até a disponibilidade de nutrientes e metais tóxicos no solo (Sinsabaugh *et al.*, 2008; Husson, 2013). A comunidade microbiana do solo é fortemente afetada pelo pH (Sugihara *et al.*, 2015). Delgado-Baquerizo *et al.* (2016), demonstraram que a intensificação do uso da terra afeta as propriedades do solo,

especialmente o pH e a abundância microbiana, podendo comprometer a entrada de nutrientes no sistema, interferindo também na comunidade acima do solo.

A calagem do solo induziu mudanças significativas no perfil metabólico foliar, que se traduzem em alterações nas interações ecológicas, como aumento dos esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera em três das quatro espécies estudadas e maior taxa de herbivoria (em *B. salicifolius*, capítulo 1). Este foi o tratamento que teve maior impacto em todos os resultados observados, corroborando com as evidências de que alterações no pH e outros parâmetros do solo (saturação por Al, CTC) levam à mudanças no ecossistema, interferindo na biota local e suas interações.

A taxa de herbivoria não variou substancialmente com os tratamentos de adição de nutrientes, embora a análise metabolômica tenha revelado uma alteração na concentração de diversos compostos. Isso pode indicar que as defesas constitutivas das folhas possam ter maior importância na defesa contra insetos herbívoros do que as defesas induzidas.

As interações abaixo do solo também foram afetadas pela adição de nutrientes, com respostas distintas entre os tratamentos e fenologia. Mesmo com maior disponibilidade de P no solo, as espécies brevidecíduas não tiveram uma diminuição do número de esporos de FMA, enquanto as sempreverdes diminuíram a abundância de esporos de FMA. Porém, esse padrão fenológico entre as respostas não foi observado em todos os resultados. *Blepharocalyx salicifolius* é a espécie que mais responde aos tratamentos, enquanto *R. montana* é menos responsiva. A história evolutiva das espécies pode contribuir para explicar os diferentes resultados encontrados, além de características intrínsecas de cada uma delas.

3. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 5S1. Altura e circunferência (a altura do solo) dos indivíduos amostrados, em cada parcela e seus respectivos tratamentos. Controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P).

Espécie	Indivíduo	Parcela	Tratamento	Altura (m)	Circunferência (cm)
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	1	1C	C	2.3	12
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	2	1C	C	2.5	11
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	3	1C	C	3.2	20
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	4	11C	C	2.4	10
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	5	11C	C	2	10
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	6	11C	C	2.8	15
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	7	5C	C	2.3	19
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	8	5C	C	2.5	19
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	9	21C	C	2	13
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	10	21C	C	2.3	14
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	11	12Ca	Ca	1.7	90
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	12	12Ca	Ca	1.8	11
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	13	17Ca	Ca	1.6	10
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	14	17Ca	Ca	2	14
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	15	3Ca	Ca	3.3	22
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	16	3Ca	Ca	3	18
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	17	3Ca	Ca	2.3	11
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	18	3Ca	Ca	2.4	17
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	19	20Ca	Ca	2.4	15
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	20	20Ca	Ca	2.4	17
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	21	14N	N	2.2	10
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	22	14N	N	2.1	12
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	23	2N	N	2.2	14
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	24	2N	N	2.2	16
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	25	7N	N	2.5	19
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	26	7N	N	2.5	23
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	27	7N	N	2.6	25
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	28	7N	N	2.1	14
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	29	10N	N	1.6	16
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	30	10N	N	1.6	11
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	31	16NP	NP	3.3	18
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	32	16NP	NP	2.8	17
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	33	16NP	NP	3.7	14
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	34	16NP	NP	1.8	12
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	35	13NP	NP	4.7	46
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	36	13NP	NP	2.9	13
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	37	6NP	NP	3	24

<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	38	6NP	NP	3	18
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	39	8NP	NP	2.3	15
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	40	8NP	NP	3.3	51
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	41	15P	P	2.2	15
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	42	15P	P	3	25
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	43	4P	P	1.9	14
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	44	4P	P	2	18
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	45	4P	P	2.1	10
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	46	4P	P	2.2	13
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	47	9P	P	3	20
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	48	9P	P	2.2	19
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	49	9P	P	2.3	15
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	50	19P	P	1.9	19
<i>Caryocar brasiliense</i>	51	1C	C	3.3	23
<i>Caryocar brasiliense</i>	52	1C	C	2.1	15
<i>Caryocar brasiliense</i>	53	1C	C	2.8	39
<i>Caryocar brasiliense</i>	54	5C	C	2	16
<i>Caryocar brasiliense</i>	55	5C	C	2	25
<i>Caryocar brasiliense</i>	56	5C	C	3.5	27
<i>Caryocar brasiliense</i>	57	5C	C	2.5	32
<i>Caryocar brasiliense</i>	58	5C	C	3.7	81
<i>Caryocar brasiliense</i>	59	5C	C	2	20
<i>Caryocar brasiliense</i>	60	11C	C	3.8	26
<i>Caryocar brasiliense</i>	61	20Ca	Ca	2.5	18
<i>Caryocar brasiliense</i>	62	20Ca	Ca	2.5	41
<i>Caryocar brasiliense</i>	63	20Ca	Ca	2.8	23
<i>Caryocar brasiliense</i>	64	20Ca	Ca	2.5	18
<i>Caryocar brasiliense</i>	65	20Ca	Ca	3.5	49
<i>Caryocar brasiliense</i>	66	17Ca	Ca	2.4	17
<i>Caryocar brasiliense</i>	67	17Ca	Ca	2.3	18
<i>Caryocar brasiliense</i>	68	17Ca	Ca	2.1	29
<i>Caryocar brasiliense</i>	69	3Ca	Ca	1.5	12
<i>Caryocar brasiliense</i>	70	3Ca	Ca	2.5	31
<i>Caryocar brasiliense</i>	71	2N	N	1.8	15
<i>Caryocar brasiliense</i>	72	2N	N	4.4	13
<i>Caryocar brasiliense</i>	73	2N	N	4.3	29
<i>Caryocar brasiliense</i>	74	2N	N	5.2	62
<i>Caryocar brasiliense</i>	75	14N	N	1.1	39
<i>Caryocar brasiliense</i>	76	10N	N	2.9	14
<i>Caryocar brasiliense</i>	77	10N	N	2.7	24
<i>Caryocar brasiliense</i>	78	10N	N	2.5	18
<i>Caryocar brasiliense</i>	79	2N	N	4.8	50
<i>Caryocar brasiliense</i>	80	14N	N	3.4	34
<i>Caryocar brasiliense</i>	81	13NP	NP	2.5	17

<i>Caryocar brasiliense</i>	82	13NP	NP	2.5	14
<i>Caryocar brasiliense</i>	83	13NP	NP	5.5	54
<i>Caryocar brasiliense</i>	84	13NP	NP	5.5	48
<i>Caryocar brasiliense</i>	85	13NP	NP	4.8	74
<i>Caryocar brasiliense</i>	86	8NP	NP	2.5	12
<i>Caryocar brasiliense</i>	87	6NP	NP	2.5	20
<i>Caryocar brasiliense</i>	88	6NP	NP	4	60
<i>Caryocar brasiliense</i>	89	6NP	NP	3.9	46
<i>Caryocar brasiliense</i>	90	6NP	NP	3.6	21
<i>Caryocar brasiliense</i>	91	15P	P	2.5	28
<i>Caryocar brasiliense</i>	92	15P	P	5.8	75
<i>Caryocar brasiliense</i>	93	15P	P	3.4	32
<i>Caryocar brasiliense</i>	94	15P	P	2.8	28
<i>Caryocar brasiliense</i>	95	4P	P	2.4	17
<i>Caryocar brasiliense</i>	96	9P	P	2	19
<i>Caryocar brasiliense</i>	97	19P	P	2.5	13
<i>Caryocar brasiliense</i>	98	19P	P	3	40
<i>Caryocar brasiliense</i>	99	19P	P	2.4	26
<i>Caryocar brasiliense</i>	100	19P	P	4.8	50
<i>Roupala montana</i>	101	1C	C	2	22
<i>Roupala montana</i>	102	1C	C	1.7	12
<i>Roupala montana</i>	103	11C	C	1.8	11
<i>Roupala montana</i>	104	11C	C	1.9	11
<i>Roupala montana</i>	105	5C	C	2.1	12
<i>Roupala montana</i>	106	5C	C	2.5	13
<i>Roupala montana</i>	107	5C	C	2.1	11
<i>Roupala montana</i>	108	5C	C	2.5	12
<i>Roupala montana</i>	109	21C	C	2.4	12
<i>Roupala montana</i>	110	21C	C	2.5	18
<i>Roupala montana</i>	111	12Ca	Ca	1.6	12
<i>Roupala montana</i>	112	12Ca	Ca	2.9	28
<i>Roupala montana</i>	113	17Ca	Ca	2.4	16
<i>Roupala montana</i>	114	17Ca	Ca	2.4	19
<i>Roupala montana</i>	115	17Ca	Ca	2.1	11
<i>Roupala montana</i>	116	3Ca	Ca	2	9
<i>Roupala montana</i>	117	3Ca	Ca	2	15
<i>Roupala montana</i>	118	3Ca	Ca	1.8	18
<i>Roupala montana</i>	119	20Ca	Ca	2.4	14
<i>Roupala montana</i>	120	20Ca	Ca	2.3	12
<i>Roupala montana</i>	121	2N	N	3.1	15
<i>Roupala montana</i>	122	10N	N	1.6	11
<i>Roupala montana</i>	123	10N	N	1.6	18
<i>Roupala montana</i>	124	7N	N	2	13
<i>Roupala montana</i>	125	7N	N	1.9	11

<i>Roupala montana</i>	126	7N	N	1.8	13
<i>Roupala montana</i>	127	7N	N	1.7	12
<i>Roupala montana</i>	128	14N	N	1.6	12
<i>Roupala montana</i>	129	14N	N	1.7	11
<i>Roupala montana</i>	130	14N	N	1.8	14
<i>Roupala montana</i>	131	16NP	NP	2.4	15
<i>Roupala montana</i>	132	16NP	NP	3	12
<i>Roupala montana</i>	133	13NP	NP	1.8	15
<i>Roupala montana</i>	134	13NP	NP	2.4	16
<i>Roupala montana</i>	135	13NP	NP	2.7	16
<i>Roupala montana</i>	136	6NP	NP	2.5	13
<i>Roupala montana</i>	137	6NP	NP	2.5	14
<i>Roupala montana</i>	138	6NP	NP	2	10
<i>Roupala montana</i>	139	8NP	NP	1.6	11
<i>Roupala montana</i>	140	8NP	NP	2	11
<i>Roupala montana</i>	141	15P	P	2.5	22
<i>Roupala montana</i>	142	15P	P	2.2	30
<i>Roupala montana</i>	143	15P	P	2.7	27.5
<i>Roupala montana</i>	144	4P	P	2.5	16
<i>Roupala montana</i>	145	4P	P	2.1	12
<i>Roupala montana</i>	146	4P	P	2.1	12
<i>Roupala montana</i>	147	9P	P	2	11
<i>Roupala montana</i>	148	19P	P	2	14
<i>Roupala montana</i>	149	19P	P	2.3	18
<i>Roupala montana</i>	150	19P	P	2.2	13
<i>Styrax ferrugineus</i>	151	1C	C	2.3	20
<i>Styrax ferrugineus</i>	152	1C	C	1.7	11
<i>Styrax ferrugineus</i>	153	1C	C	1.7	20
<i>Styrax ferrugineus</i>	154	11C	C	1.5	10
<i>Styrax ferrugineus</i>	155	11C	C	2.9	21
<i>Styrax ferrugineus</i>	156	5C	C	1.6	10
<i>Styrax ferrugineus</i>	157	5C	C	1.5	11
<i>Styrax ferrugineus</i>	158	5C	C	1.7	14
<i>Styrax ferrugineus</i>	159	5C	C	1.5	12
<i>Styrax ferrugineus</i>	160	21C	C	3.9	36
<i>Styrax ferrugineus</i>	161	17Ca	Ca	1.2	13
<i>Styrax ferrugineus</i>	162	12Ca	Ca	3.2	35
<i>Styrax ferrugineus</i>	163	12Ca	Ca	2.9	23
<i>Styrax ferrugineus</i>	164	12Ca	Ca	1.5	12
<i>Styrax ferrugineus</i>	165	3Ca	Ca	1.6	16
<i>Styrax ferrugineus</i>	166	3Ca	Ca	2.2	23
<i>Styrax ferrugineus</i>	167	3Ca	Ca	2	16
<i>Styrax ferrugineus</i>	168	3Ca	Ca	1.9	19
<i>Styrax ferrugineus</i>	169	20Ca	Ca	1.4	10

<i>Styrax ferrugineus</i>	170	20Ca	Ca	1.6	11
<i>Styrax ferrugineus</i>	171	7N	N	3	18
<i>Styrax ferrugineus</i>	172	7N	N	2.7	20
<i>Styrax ferrugineus</i>	173	7N	N	1.9	19
<i>Styrax ferrugineus</i>	174	7N	N	1.8	18
<i>Styrax ferrugineus</i>	175	7N	N	2.8	28
<i>Styrax ferrugineus</i>	176	14N	N	2	11
<i>Styrax ferrugineus</i>	177	14N	N	3	26
<i>Styrax ferrugineus</i>	178	14N	N	3	18
<i>Styrax ferrugineus</i>	179	10N	N	2.7	24
<i>Styrax ferrugineus</i>	180	10N	N	3.3	29
<i>Styrax ferrugineus</i>	181	16NP	NP	2.8	26
<i>Styrax ferrugineus</i>	182	16NP	NP	1.7	14
<i>Styrax ferrugineus</i>	183	16NP	NP	1.6	18
<i>Styrax ferrugineus</i>	184	13NP	NP	2.6	20
<i>Styrax ferrugineus</i>	185	13NP	NP	2.6	16
<i>Styrax ferrugineus</i>	186	6NP	NP	1.6	15
<i>Styrax ferrugineus</i>	187	6NP	NP	2.6	25
<i>Styrax ferrugineus</i>	188	8NP	NP	2.7	25
<i>Styrax ferrugineus</i>	189	8NP	NP	1.6	15
<i>Styrax ferrugineus</i>	190	8NP	NP	2.6	26
<i>Styrax ferrugineus</i>	191	15P	P	3.5	41
<i>Styrax ferrugineus</i>	192	15P	P	1.6	16
<i>Styrax ferrugineus</i>	193	15P	P	1.7	14
<i>Styrax ferrugineus</i>	194	4P	P	1.7	14
<i>Styrax ferrugineus</i>	195	4P	P	1.6	12
<i>Styrax ferrugineus</i>	196	9P	P	1.6	10
<i>Styrax ferrugineus</i>	197	9P	P	1.8	16
<i>Styrax ferrugineus</i>	198	19P	P	2	15
<i>Styrax ferrugineus</i>	199	19P	P	1.5	13
<i>Styrax ferrugineus</i>	200	19P	P	2.7	29

Tabela 6S2. Distribuição dos indivíduos amostrados por parcela e tratamento. Controle (C), calagem (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio + fósforo (NP) e fósforo (P).

Tratamento	Parcela	Número de indivíduos amostrados			
		<i>B. salicifolius</i>	<i>C. brasiliense</i>	<i>R. montana</i>	<i>S. ferrugineus</i>
C	1C	3	3	2	3
C	5C	2	6	4	4
C	11C	3	1	2	2
C	21C	2	0	2	1
Ca	3Ca	4	2	3	4
Ca	12Ca	2	0	2	3
Ca	17Ca	2	3	3	1
Ca	20Ca	2	5	2	2
N	2N	2	5	1	0
N	7N	4	0	4	5
N	10N	2	3	2	2
N	14N	2	2	3	3
NP	6NP	2	4	3	2
NP	8NP	2	1	2	3
NP	13NP	2	5	3	2
NP	16NP	4	0	2	3
P	4P	4	1	3	2
P	9P	3	1	1	2
P	15P	2	4	3	3
P	19P	1	4	3	3

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, A. A. (2011). Current trends in the evolutionary ecology of plant defence. *Functional Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01796.x>
- Agrawal, A. A., Hastings, A. P., Johnson, M. T. J., Maron, J. L., & Salminen, J.-P. (2012). Insect Herbivores Drive Real-Time Ecological and Evolutionary Change in Plant Populations. *Science*, 338, 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.1225977>
- Aguilera, P., Cumming, J., Oehl, F., Cornejo, P., & Borie, F. (2015). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in acidic soils and their contribution to aluminum phytotoxicity alleviation. In *Aluminum Stress Adaptation in Plants* (pp. 203–228). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19968-9>
- Ahmad, P., Abdel Latef, A. A., Abd_Allah, E. F., Hashem, A., Sarwat, M., Anjum, N. A., & Gucel, S. (2016). Calcium and Potassium Supplementation Enhanced Growth, Osmolyte Secondary Metabolite Production, and Enzymatic Antioxidant Machinery in Cadmium-Exposed Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00513>
- Alvarez, S., Marsh, E. L., Schroeder, S. G., & Schachtman, D. P. (2008). Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant, Cell & Environment*, 31, 325–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01770.x>
- Barônio, G. J. (2012). Leaf hairiness reduces herbivory of young and mature leaves of *Qualea multiflora* Mart. in Brazilian Savanna. *Neotropical Biology and Conservation*, 7(2), 122–128. <https://doi.org/10.4013/nbc.2012.72.06>
- Bautista, I., Boscaiu, M., Lidón, A., Llinares, J. V., Lull, C., Donat, M. P., ... Vicente, O. (2016). Environmentally induced changes in antioxidant phenolic compounds levels in wild plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2025-2>
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Bonfante, P., & Anca, I.-A. (2009). Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annual Review of Microbiology*, 63, 363–383. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504>
- Bryant, J. P., Chapin, F. S., & Klein, D. R. (1983). Carbon/Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory. *Oikos*, 40.
- Bucci, S. J., Scholz, F. G., Goldstein, G., Meinzer, F. C., Franco, A. C., Campanello, P. I., ... Miralles-wilhelm, F. (2006). *Nutrient availability constrains the hydraulic architecture and water relations of savannah trees*. 2153–2167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01591.x>
- Bucher, M. (2007). Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhizal interfaces. *New Phytol*, 173, 11–26.
- Bustamante, M. M. C., Brito, D. Q. d., Kozovits, A. R., Luedemann, G., De Mello, T. R. B., Pinto, A. de S., ... Takahashi, F. S. C. (2012). Effects of nutrient additions on plant biomass and diversity of the herbaceous-subshrub layer of a Brazilian savanna (Cerrado). *Plant Ecology*, 213, 795–808. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7939-6_16
- Calça, F. J. S. (2018). *Micobiota micorrízica e saprofítica em diferentes fitofisionomias de Cerrado no Distrito Federal, Brasil*. Universidade de Brasília.

- Cavararo, R. (2004). Reserva Ecológica do IBGE: Ambiente e plantas vasculares. Estudos & Pesquisas. *Informações Geográficas*, 3, 1–71.
- Coley, P. D., & Barone, J. A. (1996). Herbivory and Plant Defenses in Tropical Forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, 305–335.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.305>
- Coley, P. D., Bateman, M. L., & Kursar, T. A. (2006). The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. *Oikos*. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14928.x>
- Coley, P. D., Bryant, J. P., & Chapin, F. S. (1985). Resource Availability and Plant Antiherbivore Defense. *Science*, 230, 895–899.
- Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2014). On tropical forests and their pests. *Science*, 343, 35–36.
<https://doi.org/10.1126/science.1248110>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669–678.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Cordeiro, M. A. S., Ferreira, D. A., Paulino, H. B., Souza, C. R. F., Siqueira, J. O., & Carneiro, M. A. C. (2015). Mycorrhization stimulant based in formononetin associated to fungicide and doses of phosphorus in soybean in the cerrado. *Bioscience Journal*, 31, 1062–1070.
<https://doi.org/10.14393/bj-v31n4a2015-26185>
- Costa, O. B. da, Del Menezzi, C. H. S., Benedito, L. E. C., Resck, I. S., Vieira, R. F., & Ribeiro Bizzo, H. (2014). Essential Oil Constituents and Yields from Leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) Collected during Daytime. *International Journal of Forestry Research*. <https://doi.org/10.1155/2014/982576>
- Cuevas-Reyes, P., De Oliveira-Ker, F. T., Fernandes, G. W., & Bustamante, M. M. D. C. (2011). Abundance of gall-inducing insect species in sclerophyllous savanna: understanding the importance of soil fertility using an experimental approach. *Journal of Tropical Ecology*, 27, 631–640. <https://doi.org/10.1017/S02>
- Damascos, M. A., Prado, C. H. B. A., & Ronquim, C. C. (2005). Bud composition, branching patterns and leaf phenology in Cerrado woody species. *Annals of Botany*, 96, 1075–1084.
<https://doi.org/10.1093/aob/mci258>
- De Cravalho, P. S. (2013). *Ecologia e relações filogenéticas de Blepharocalyx salicifolius (Kunth) O. Berg (Myrtaceae)*. Universidade de Brasília.
- Delgado-Baquerizo, M., Grinyer, J., Reich, P. B., & Singh, B. K. (2016). Relative importance of soil properties and microbial community for soil functionality: insights from a microbial swap experiment. *Functional Ecology*, 30, 1862–1873. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12674>
- Diniz, I. R., & Morais, H. C. (1997). Lepidopteran caterpillar fauna of cerrado host plants. *Biodiversity and Conservation*, 817–836.
- Do Brasil, F. (2016). 2020 em construção.
- Dos Santos, V. S., Macedo, F. A., Do Vale, J. S., Silva, D. B., & Carollo, C. A. (2017). Metabolomics as a tool for understanding the evolution of *Tabebuia sensu lato*. *Metabolomics*, 13, 72.
<https://doi.org/10.1007/s11306-017-1209-8>

- Dyer, L. A., & Forister, M. L. (2019). Challenges and advances in the study of latitudinal gradients in multitrophic interactions, with a focus on consumer specialization. *Current Opinion in Insect Science*, 32, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.11.008>
- Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (1964). Butterflies and Plants: A study in coevolution. *Evolution*, (4), 586–608.
- Eiten, G. (1994). Vegetação do Cerrado. In *Cerrado: Caracterização, Ocupação e Perspectivas* (pp. 17–73). Brasília: Editora Universidade de Brasília.
- EMBRAPA. (2017). Manual de metodos de analises. In *Manual de métodos de análise de solo*.
- EMBRAPA, E. B. D. P. A. (2006). Sistema brasileiro de classificação de solos. In *Rio de Janeiro: Embrapa Solos* (2nd ed.). [https://doi.org/ISBN 978-85-7035-198-2](https://doi.org/ISBN%20978-85-7035-198-2)
- Ernst, M., Silva, D. B., Silva, R. R., Monge, M., Semir, J., Vêncio, R. Z. N., & Lopes, N. P. (2014). Advances in MALDI-MS/MS: A new metabolomic protocol for Brazilian “Cerrado” plants. *Planta Medica*, 80.
- Fageria, N. K., & Baligar, V. C. (2008). Ameliorating soil acidity of tropical oxisols by liming for sustainable crop production. *Advances in Agronomy*, 345–399. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)00407-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)00407-0)
- Fenny, P. (1976). Plant apparency and chemical defense. In *Biochemical interaction between plants and insects* (pp. 1–40). Boston: MA.
- Fernandes, R. A., Ferreira, D. A., Saggini-junior, O. J., Luiz, S., Paulino, H. B., Siqueira, J. O., ... Carneiro, C. (2016). Occurrence and species richness of mycorrhizal fungi in soil under different land use. *Canadian Journal of Soil Science*, 96, 271–280.
- Ferreira, D. A., Aurélio, M., & Carneiro, C. (2012). Fungos Micorrízicos Arbusculares em um Latossolo Vermelho sob Manejos e Usos no Cerrado. *Revista Brasileira de Ciências Do Solo*, 36.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48, 155–171. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860207>
- Fine, P. V. A., Miller, Z. J., Mesones, I., Irazuzta, S., Appel, H. M., Stevens, M. H. H., ... Coley, P. D. (2006). The growth-defense trade-off and habitat specialization by plants in Amazonian forests. *Ecology*, 87, S150-62.
- Fujii, K., Shibata, M., Kitajima, K., Ichie, T., Kitayama, K., & Turner, B. L. (2018). Plant–soil interactions maintain biodiversity and functions of tropical forest ecosystems. *Ecological Research*, (1), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s11284-017-1511-y>
- Furtado, F. B., Borges, B. C., Teixeira, T. L., Garces, H. G., De Almeida Junior, L. D., Alves, F. C. B., ... Fernandes Junior, A. (2018). Chemical composition and bioactivity of essential oil from *blepharocalyx salicifolius*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms19010033>
- Galili, G., Amir, R., & Fernie, A. R. (2016). The Regulation of Essential Amino Acid Synthesis and Accumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 153–178. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112213>
- Gange, A. C., Brown, V. K., & Aplin, D. M. (2003). Multitrophic links between arbuscular mycorrhizal fungi and insect parasitoids. *Ecology Letters*, 6, 1051–1055.

- Gargallo-Garriga, A., Sardans, J., Pérez-Trujillo, M., Guenther, A., Llusà, J., Rico, L., ... Peñuelas, J. (2016). Shifts in plant foliar and floral metabolomes in response to the suppression of the associated microbiota. *BMC Plant Biology*, *16*. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0767-7>
- Gargallo-Garriga, A., Wright, S. J., Sardans, J., Pérez-Trujillo, M., Oravec, M., Vecerová, K., ... Peñuelas, J. (2017). Long-term fertilization determines different metabolomic profiles and responses in saplings of three rainforest tree species with different adult canopy position. *PLoS ONE*, *12*, e0177030. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177030>
- Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, *46*, 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
- Godinho, W. M., Farnezi, M. M., Pereira, I. M., Gregório, L. E., & Graef, C. F. F. (2014). Volatile constituents from leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *13*, 249–253.
- Grattapaglia, D., Vaillancourt, R. E., Shepherd, M., Thumma, B. R., Foley, W., Külheim, C., ... Myburg, A. A. (2012). Progress in Myrtaceae genetics and genomics: Eucalyptus as the pivotal genus. *Tree Genetics and Genomes*, *8*, 463–508. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0491-x>
- Güsewell, S., & Gessner, M. O. (2009). N:P ratios influence litter decomposition and colonization by fungi and bacteria in microcosms. *Functional Ecology*, *(1)*, 211–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01478.x>
- Hajiboland, R. (2014). Reactive oxygen species and photosynthesis. In *Oxidative Damage to plants*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00011-3>
- Haridasan, M. (2000). Nutrição mineral de plantas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira De Fisiologia Vegetal*, *12*, 54–64. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00942.x>
- Haridasan, M. (2008). Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *20*, 183–195. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202008000300003>
- Hartley, S. E., & Gange, A. C. (2009). Impacts of Plant Symbiotic Fungi on Insect Herbivores: Mutualism in a Multitrophic Context. *Annual Review of Entomology*, *54*, 323–342. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090614>
- Hubbard, C. J., Li, B., Mcminn, R., Brock, M. T., Maignien, L., Ewers, B. E., ... Weinig, C. (2019). The effect of rhizosphere microbes outweighs host plant genetics in reducing insect herbivory. *Molecular Ecology*, *28*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/mec.14989>
- Husson, O. (2013). Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: A transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant and Soil*, *362*, 389–417. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1429-7>
- Jacobson, T. K. B. (2009). *Composição, estrutura e funcionamento de um cerrado sentido restrito submetido à adição de nutrientes em médio prazo*. Universidade de Brasília.
- Jacobson, T. K. B., Bustamante, M. M. D. C., & Kozovits, A. R. (2011). Diversity of shrub tree layer, leaf litter decomposition and N release in a Brazilian Cerrado under N, P and N plus P additions. *Environmental Pollution*, *159*, 2236–2242. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.10.019>
- Janz, N. (2011). Ehrlich and Raven Revisited: Mechanisms Underlying Codiversification of Plants and Enemies. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *(1)*, 71–89.

<https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145024>

- Jenkins, W. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, *48*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>
- Joern, A., Provin, T., & Behmer, S. T. (2012). Not just the usual suspects: Insect herbivore populations and communities are associated with multiple plant nutrients. *Ecology*, *93*, 1002–1015.
- Jung, S. C., & Martinez-Medina, A. (2012). *Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses*. 651–664. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6>
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *2*, 377–392. Retrieved from <https://docplayer.net/21209475-Plant-secondary-metabolites-biosynthesis-classification-function-and-pharmacological-properties.html>
- Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Saqlan, S. M., & Rasheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, *1*(1), 48–58. <https://doi.org/10.5923/j.re.20120201.10>
- Kozovits, A. R., Bustamante, M. M. C., Garofalo, C. R., Bucci, S., Franco, A. C., Goldstein, G., & Meinzer, F. C. (2007). Nutrient resorption and patterns of litter production and decomposition in a Neotropical Savanna. *Functional Ecology*, *21*, 1034–1043. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01325.x>
- Kula, A. A. R., Hartnett, D. C., & Wilson, G. W. T. (2005). Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant-herbivore interactions. *Ecology Letters*, *8*, 61–69. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00690.x>
- Kursar, T. a, Dexter, K. G., Lokvam, J., Pennington, R. T., Richardson, J. E., Weber, M. G., ... Coley, P. D. (2009). The evolution of antiherbivore defenses and their contribution to species coexistence in the tropical tree genus *Inga*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*, 18073–18078. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904786106>
- Lambers, H., Finnegan, P. M., Laliberté, E., Pearse, S. J., Ryan, M. H., Shane, M. W., & Veneklaas, E. J. (2011). Phosphorus Nutrition of Proteaceae in Severely Phosphorus-Impooverished Soils: Are There Lessons To Be Learned for Future Crops? *Plant Physiology*, *156*, 1058–1066. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174318>
- Lannes, L. S., Bustamante, M. M. C., Edwards, P. J., & Olde Venterink, H. (2016). Native and alien herbaceous plants in the Brazilian Cerrado are (co-)limited by different nutrients. *Plant and Soil*, *400*, 231–243. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2725-9>
- Lin, H., Rao, J., Shi, J., Hu, C., Cheng, F., Wilson, Z. A., ... Quan, S. (2014). Seed metabolomic study reveals significant metabolite variations and correlations among different soybean cultivars. *Journal of Integrative Plant Biology*, *56*, 826–836. <https://doi.org/10.1111/jipb.12228>
- Liu, M., Wang, Z., Li, S., Lü, X., Wang, X., & Han, X. (2017). Changes in specific leaf area of dominant plants in temperate grasslands along a 2500-km transect in northern China. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11133-z>
- Liu, W., Zhang, Y., Jiang, S., Deng, Y., Christie, P., Murray, P. J., ... Zhang, J. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi in soil and roots respond differently to phosphorus inputs in an intensively managed calcareous agricultural soil. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep24902>
- Macel, M., Dam, N. M. van, & Keurentjes, J. J. B. (2010). Metabolomics : the chemistry between

- ecology and genetics. *Molecular Ecology*, 583–593. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02854.x>
- Marquis, R. J. ., Diniz, I. R. ., & Morais, H. C. . (2001). Patterns and Correlates of Interspecific Variation in Foliar Insect Herbivory and Pathogen Attack in Brazilian Cerrado. *Journal of Tropical Ecology*, 17, 127–148.
- Marschner, P., Kandeler, E., & Marschner, B. (2003). Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(3), 453–461. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00297-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00297-3)
- Martucci, M. E. P., Loeuille, B., Pirani, J. R., & Gobbo-Neto, L. (2018). Comprehensive untargeted metabolomics of Lychnnophorinae subtribe (Asteraceae: Vernoniae) in a phylogenetic context. *PLoS ONE*, 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190104>
- Matzek, V., & Vitousek, P. M. (2009). N : P stoichiometry and protein : RNA ratios in vascular plants: an evaluation of the growth-rate hypothesis. *Ecology Letters*, 12, 765–771. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01310.x>
- McCormick, A. C., Unsicker, S. B., & Gershenzon, J. (2012). The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends in Plant Science*, 17, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.012>
- Meiners, T. (2015). Chemical ecology and evolution of plant-insect interactions: A multitrophic perspective. *Current Opinion in Insect Science*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.003>
- Mello, T. R. B. de (2019) *Efeitos a médio e longo prazo da adição de nutrientes em áreas de cerrado típico sobre a vegetação herbáceo-arbustiva e interações acima e abaixo do solo*. Universidade de Brasília.
- Mello, M. A. R. (2007). Influence of herbivore attack patterns on reproductive success of the shrub *Piper hispidum* (Piperaceae). *Ecotropica*, 13(1), 1–6.
- Mello, M. O., & Silva-Filho, M. C. (2002). Plant-insect interactions: An evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14, 71–81. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202002000200001>
- Mergulhão, A. C. do E. S., Silva, M. V. da, Lyra, M. do C. C. P. de, Figueiredo, M. do V. B., Silva, M. L. R. B. da, & Maia, L. C. (2014). Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares isolados de áreas de mineração de gesso, Araripina, PE, Brasil. *Hoehnea*, 41, 393–400. <https://doi.org/10.1590/s2236-89062014000300006>
- Miranda, J. C. C. de, & Miranda, L. N. de. (2002). Importância da micorriza arbuscular para o cultivo da soja na região do cerrado. In *Embrapa Cerrados-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.
- Miranda, L. N. de, Miranda, J. C. C. de, Rein, T. A., & Gomes, A. C. (2007). Manejo da calagem para culturas anuais no sistema de plantio direto e convencional. In *Resultados de pesquisa para o Cerrado: 2004-2005*. Embrapa Cerrados.
- MMA. (2011). *Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite - Monitoramento do Bioma Cerrado 2009-2010*. Brasília.
- Moles, A. T., Wallis, I. R., Foley, W. J., Poore, A. G. B., Seabloom, E. W., Veski, P. A., ... Mart, M. (2013). Correlations between physical and chemical defences in plants: tradeoffs, syndromes, or just many different ways to skin a herbivorous cat? *New Phytologist*, 27, 252–263.

- Moreira, W. R., Messner, W., Rios, J. A., Debona, D., Williams, C., & Nascimento, A. (2015). Magnesium-induced alterations in the photosynthetic performance and resistance of rice plants infected with *Bipolaris oryzae*. *Scientia Agricola*, *72*, 328–333.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, *403*, 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Narberhaus, I., Zintgraf, V., & Dobler, S. (2005). Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels - Evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. *Chemoecology*, *15*, 121–125. <https://doi.org/10.1007/s00049-005-0302-z>
- Neves, F. S., Araújo, L. S., Espírito-Santo, M. M., Fagundes, M., Fernandes, G. W., & G. Arturo Sanchez-Azofeifa, M. Q. (2010). Canopy Herbivory and Insect Herbivore Diversity in a Dry Forest – Savanna Transition in Brazil. *Biotropica*, *42*, 112–118.
- Oehl, F., Laczko, E., Oberholzer, H. R., Jansa, J., & Egli, S. (2017). Diversity and biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Biology and Fertility of Soils*, *53*, 777–797. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1217-x>
- Oliveira, C. A., Sá, N. M. H., Gomes, E. A., Marriel, I. E., Scotti, M. R., Guimarães, C. T., ... Alves, V. M. C. (2009). Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Applied Soil Ecology*, *41*, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.11.005>
- Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., & Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, *16*, 373–378. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01214-1)
- Padovan, A., Keszei, A., Külheim, C., & Foley, W. J. (2014). The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. *Phytochemistry Reviews*, *13*, 695–716. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9331-3>
- Padovan, A., Keszei, A., Wallis, I. R., & Foley, W. J. (2012). Mosaic Eucalypt Trees Suggest Genetic Control at a Point That Influences Several Metabolic Pathways. *Journal of Chemical Ecology*, *38*, 914–923. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0149-z>
- Pavarini, D. P., Pavarini, S. P., Niehues, M., & Lopes, N. P. (2012). Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*, *176*, 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.002>
- Peñuelas, J., & Sardans, J. (2009). Ecological metabolomics. *Chemistry and Ecology*, *25*, 305–309. <https://doi.org/10.1080/02757540903062517>
- Phoenix, G. K., Booth, R. E., Leake, J. R., Read, D. J., Grime, J. P., & Lee, J. A. (2003). Simulated pollutant nitrogen deposition increases P demand and enhances root-surface phosphatase activities of three plant functional types in a calcareous grassland. *New Phytologist*, *161*, 279–289. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00910.x>
- Pineda, A., Zheng, S. J., van Loon, J. J. A., Pieterse, C. M. J., & Dicke, M. (2010). Helping plants to deal with insects: The role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science*, *15*(9), 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.05.007>
- Pinheiro, F., Diniz, I. R., Coelho, D., & S., B. M. P. (2002). Seasonal pattern of insect abundance in the Brazilian cerrado. *Austral Ecology*, *27*, 132–136. <https://doi.org/10.1046/j.1442-9993.2002.01165.x>

- Poulin, R. X., & Pohnert, G. (2019). Simplifying the complex : metabolomics approaches in chemical ecology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*, 13–19.
- Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2012). Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: The quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology*, *20*(11), 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.08.001>
- Rapparini, F., & Peñuelas, J. (2013). *Mycorrhizal Fungi to Alleviate Drought Stress on Plant Growth Chapter 2 Mycorrhizal Fungi to Alleviate Drought Stress on Plant Growth*. (April 2016). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9466-9>
- Rashid, M. H.-O., & Chung, Y. R. (2017). Induction of Systemic Resistance against Insect Herbivores in Plants by Beneficial Soil Microbes. *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01816>
- Reatto, A., Correia, J. R., Spera, S. T., & Martins, É. de S. (2008). Solos do bioma Cerrado: aspectos pedológicos. In S. M. Sano & S. P. Almeida (Eds.), *Cerrado: ecologia e flora*. Planaltina: Embrapa Cerrados.
- Ribeiro, S. P., Londe, V., Bueno, A. P., Barbosa, J. S., Corrêa, T. L., Sousa, H. C. D. E., ... Jr, H. A. N. (2017). Plant defense against leaf herbivory based on metal accumulation : examples from a tropical high altitude ecosystem. *Plant Species Biology*, *32*, 147–155. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12136>
- Richards, L. A., Dyer, L. A., Forister, M. L., Smilanich, A. M., Dodson, C. D., Leonard, M. D., & Jeffrey, C. S. (2015). Phytochemical diversity drives plant–insect community diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*, 10973–10978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504977112>
- Rondina, A. B. L., Lescano, L. E. A. M., De Almeida Alves, R., Matsuura, E. M., Nogueira, M. A., & Zangaro, W. (2014). Arbuscular mycorrhizas increase survival, precocity and flowering of herbaceous and shrubby species of early stages of tropical succession in pot cultivation. *Journal of Tropical Ecology*, (6), 599–614. <https://doi.org/10.1017/S0266467414000509>
- Rosa, F. R., Arruda, A. F., Siqueira, E. M. A., & Arruda, S. F. (2016). Phytochemical compounds and antioxidant capacity of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* mart), Brazil's native fruit. *Nutrients*, *8*. <https://doi.org/10.3390/nu8030110>
- Samanta, A., Das, G., & Das, K. S. (2011). Roles of flavonoids in plants. *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, *6*, 12–35.
- Sampaio, B. L., Edrada-Ebel, R., & Da Costa, F. B. (2016). Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: A model for environmental metabolomics of plants. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep29265>
- Sardans, J., Gargallo-Garriga, A., Pérez-Trujillo, M., Parella, T. J., Seco, R., Filella, I., & Peñuelas, J. (2014). Metabolic responses of *Quercus ilex* seedlings to wounding analysed with nuclear magnetic resonance profiling. *Plant Biology*, *16*, 395–403. <https://doi.org/10.1111/plb.12032>
- Sardans, J., Llusia, J., Owen, S. M., Niinemets, Ü., & Peñuelas, J. (2015). Screening study of leaf terpene concentration of 75 borneo rainforest plant species: Relationships with leaf elemental concentrations and morphology. *Records of Natural Products*, *9*, 19–40.
- Sardans, J., Peñuelas, J., & Rivas-Ubach, A. (2011). Ecological metabolomics: Overview of current developments and future challenges. *Chemoecology*, *21*, 191–225. <https://doi.org/10.1007/s00049-011-0083-5>

- Sardans, J., Rivas-Ubach, A., & Peñuelas, J. (2012). The C:N:P stoichiometry of organisms and ecosystems in a changing world: A review and perspectives. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *14*, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2011.08.002>
- Sawyer, D. R., Mesquita, B., Coutinho, B., Almeida, F. D., Figueiredo, I., Lamas, I., ... Kasecker, T. (2016). *Ecosystem Profile Cerrado Biodiversity Hotspot*.
- Sbrana, C., Avio, L., & Giovannetti, M. (2014). Beneficial mycorrhizal symbionts affecting the production of health-promoting phytochemicals. *Electrophoresis*, *35*, 1535–1546. <https://doi.org/10.1002/elps.201300568>
- Seybold, S. J., Huber, D. P. W., Lee, J. C., Graves, A. D., & Bohlmann, J. (2006). Pine monoterpenes and pine bark beetles: A marriage of convenience for defense and chemical communication. *Phytochemistry Reviews*, *5*, 143–178. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9002-8>
- Shikano, I. (2017). Evolutionary Ecology of Multitrophic Interactions between Plants, Insect Herbivores and Entomopathogens. *Journal of Chemical Ecology*, *43*(6), 586–598. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0850-z>
- Shin, D. H., Choi, M. G., Lee, H. K., Cho, M., Choi, S. B., Choi, G., & Park, Y. Il. (2013). Calcium dependent sucrose uptake links sugar signaling to anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *430*, 634–639. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.100>
- Silva, N. A. P. Da, Frizzas, M. R., & Oliveira, C. M. De. (2011). Seasonality in insect abundance in the “Cerrado” of Goiás State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, *55*(1), 79–87. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262011000100013>
- Sinsabaugh, R. L., Lauber, C. L., Weintraub, M. N., Ahmed, B., Allison, S. D., Crenshaw, C., ... Zeglin, L. H. (2008). Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters*, *11*, 1252–1264. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x>
- Stevenson, P. C., Nicolson, S. W., & Wright, G. A. (2017). Plant secondary metabolites in nectar: impacts on pollinators and ecological functions. *Functional Ecology*, *31*, 65–75. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12761>
- Sugihara, S., Shibata, M., Mvondo Ze, A. D., Araki, S., & Funakawa, S. (2015). Effects of vegetation on soil microbial C, N, and P dynamics in a tropical forest and savanna of Central Africa. *Applied Soil Ecology*, *87*, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.11.002>
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. max, & Murphy, A. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal* (6th ed.; Artemed, Ed.). Porto Alegre.
- Terashima, I., Hanba, Y. T., Tholen, D., & Niinemets, U. (2011). Leaf Functional Anatomy in Relation to Photosynthesis. *Plant Physiology*, *155*(1), 108–116. <https://doi.org/10.1104/pp.110.165472>
- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. In *Biotechnology of isoprenoids* (pp. 63–103). <https://doi.org/10.1007/10>
- Tian, K., Zhao, Y., Xu, X., Hai, N., Huang, B., & Deng, W. (2015). Effects of long-term fertilization and residue management on soil organic carbon changes in paddy soils of China: A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *204*, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.02.008>
- Van der Heijden, M. G. A., Martin, F. M., Selosse, M. A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal

- ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205, 1406–1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>
- Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2, 105–113. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>
- Vilela, A. A., Torezan-Silingardi, H. M., & Del-Claro, K. (2014). Conditional outcomes in ant-plant-herbivore interactions influenced by sequential flowering. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 209, 359–366.
- Wang, M., Schäfer, M., Li, D., Halitschke, R., Dong, C., McGale, E., ... Baldwin, I. T. (2018). Blumenols as shoot markers of root symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi. *ELife*, 7, e37093. <https://doi.org/10.7554/elife.37093>
- Weber, S. E., Diez, J. M., Andrews, L. V., Goulden, M. L., Aronson, E. L., & Allen, M. F. (2019). Responses of arbuscular mycorrhizal fungi to multiple coinciding global change drivers. *Fungal Ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.11.008>
- Weihner, E., van der Werf, A., Thompson, K., Roderick, M., Garnier, E., & Eriksson, O. (1999). Challenging Theophrastus: A common core list of plant traits for functional ecology. *Journal of Vegetation Science*, 10, 609–620.
- Williams, A., Manoharan, L., Rosenstock, N. P., Olsson, P. A., & Hedlund, K. (2017). Long-term agricultural fertilization alters arbuscular mycorrhizal fungal community composition and barley (*Hordeum vulgare*) mycorrhizal carbon and phosphorus exchange. *New Phytologist*, 213, 874–885. <https://doi.org/10.1111/nph.14196>
- Wink, M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 75(2), 225–233.
- Wink, M. (2018). Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction? *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00364>
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2016). Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 55, 14.10.1-14.10.91. <https://doi.org/10.1002/cpbi.11>
- Xu, W., Peng, H., Yang, T., Whitaker, B., Huang, L., Sun, J., & Chen, P. (2014). Effect of calcium on strawberry fruit flavonoid pathway gene expression and anthocyanin accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.015>
- Yakhlef, W., Arhab, R., Romero, C., Brenes, M., de Castro, A., & Medina, E. (2018). Phenolic composition and antimicrobial activity of Algerian olive products and by-products. *Food Science and Technology*, 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.044>
- Yang, H., Schroeder-moreno, M., Giri, B., & Hu, S. (2018). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and their responses to nutrient enrichment. In *Root Biology* (pp. 429–449). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4>
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Zangaro, W., Lescano, L. E. A. M., Matsuura, E. M., Rondina, A. B. L., & Nogueira, M. A. (2018). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and exotic grasses differentially affect the

- establishment of seedlings of early- and late-successional woody species. *Applied Soil Ecology*, 124, 394–406. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.003>
- Zangaro, W., Rostirola, L. V., de Souza, P. B., de Almeida Alves, R., Lescano, L. E. A. M., Rondina, A. B. L., ... Carrenho, R. (2013). Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza*, 23, 221–233. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0464-9>
- Zanuncio, J. C., Zanuncio, T. V., De Freitas, F. A., & Pratisoli, D. (2003). Population density of Lepidoptera in a plantation of *Eucalyptus urophylla* in the state of Minas Gerais, Brazil. *Animal Biology*, 53, 17–26. <https://doi.org/10.1163/157075603769682549>
- Zhang, X., Wei, J., Huang, Y., Shen, W., Chen, X., Lu, C., ... Cui, J. (2018). Increased Cytosolic Calcium Contributes to Hydrogen-Rich Water-Promoted Anthocyanin Biosynthesis Under UV-A Irradiation in Radish Sprouts Hypocotyls. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01020>
- Züst, T., & Agrawal, A. A. (2017). Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory: An Emerging Mechanistic Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 513–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040856>