

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E UMIDADE DO SOLO COMO
PROMOTORAS DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ÁCIDA E COLONIZAÇÃO
MICORRÍZICA EM ESPÉCIES HERBÁCEAS DE CERRADO**

Amanda Ribeiro Petroni

Ilha Solteira - SP
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E UMIDADE DO SOLO COMO
PROMOTORAS DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ÁCIDA E COLONIZAÇÃO
MICORRÍZICA EM ESPÉCIES HERBÁCEAS DE CERRADO**

Amanda Ribeiro Petroni

Orientadora: Profa. Dra. Luciola Santos Lannes

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Engenharia, Câmpus de Ilha Solteira,
Universidade Estadual Paulista "Julio de
Mesquita Filho", como parte das
exigências para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Ilha Solteira - SP
2021

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Cursos: Eng^a Agrônômica, Ciências Biológicas, Eng. Civil, Eng. Elétrica, Eng. Mecânica, Física, Matemática e Zootecnia.
Avenida Brasil Centro, 56 CEP 15385-000 Ilha Solteira São Paulo Brasil
pabx (18) 3743 1000 fax (18) 3742 2735 scom@adm.feis.unesp.br www.feis.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

P497d Petroni, Amanda Ribeiro.
Diversidade de espécies e umidade do solo como promotoras da atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica em espécies herbáceas de Cerrado / Amanda Ribeiro Petroni. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2021
38 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2021

Orientador: Luciola Santos Lannes
Inclui bibliografia

1. Ecologia de ecossistemas. 2. Biodiversidade. 3. Solos do Cerrado. 4.
Micorriza e fosfatase ácida.


Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8 - 9999

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

"DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E UMIDADE DO SOLO COMO PROMOTORAS DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ÁCIDA E COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA EM ESPÉCIES HERBÁCEAS DE CERRADO"

Amanda Ribeiro Petroni

REGULAMENTO SOBRE A AVALIAÇÃO:

Artigo 25º - § 2º A apresentação pública do trabalho de TCC deverá ser de no mínimo 20 (vinte) minutos e máxima de 40 (quarenta) minutos. Após um intervalo de 5 (cinco) minutos, haverá a arguição do Trabalho pelos examinadores. O tempo de arguição, será de até 15 (quinze) minutos para cada examinador, e até 15 (quinze) minutos o tempo para a resposta do(a) aluno(a) a cada examinador ou no caso de se optar pelo diálogo o tempo conjunto entre examinador e acadêmico(a) será de no máximo 30 (trinta) minutos.

Artigo 24º – No julgamento do TCC, a banca examinadora deverá avaliar a apresentação oral, escrita e a defesa do trabalho durante a arguição. O conceito final será APROVADA ou REPROVADA.

COMISSÃO EXAMINADORA

1ª EXAMINADORA (Orientador-Presidente)

Nome: Profa. Dra. Lucíola Santos Lannes



2ª EXAMINADORA

Nome: Doutoranda Ana Leticia Antonio Vital



3º EXAMINADOR

Nome: Doutorando Lucas Lopes e Silva



CONCEITO

(X) Aprovado

() Reprovado

Ilha Solteira-SP, 15 de setembro de 2021.

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Cursos: Agronomia, Ciências Biológicas, Eng. Civil, Eng. Elétrica, Eng. Mecânica, Física, Matemática e Zootecnia.

Avenida Brasil Centro, 56 Caixa Postal 31 CEP 15385-000 Ilha Solteira São Paulo Brasil

tel (18) 3743 1100 fax (18) 3742 2735 stcom@adm.feis.unesp.br www.feis.unesp.br

Este Trabalho de Conclusão de Curso está organizado sob a forma de artigo científico a ser submetido à *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. Como partes integrantes deste Trabalho de Conclusão de Curso encontram-se:

1. O artigo científico em Português
2. As normas da Revista

Agradecimentos

Agradeço à agência Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela bolsa concedida e apoio financeiro para essa pesquisa.

Agradeço aos meus pais, Jane e Doni, que sempre valorizaram meus estudos e meu bem estar. Obrigada mãe e pai por serem tão presentes na minha vida. Minha orientadora Lucíola, que me acolheu, me ensinou e também não desistiu de mim.

Agradeço meu companheiro Bernardo, que compartilha todas as alegrias e enfrenta as dificuldades ao meu lado, com muito amor, compaixão e paciência. Não posso esquecer daqueles que me proporcionam as melhores risadas e um ombro pra chorar sempre que precisei, meus amigos Ana Leticia, Rafael D'Agosta, Aymar, Thalita, Paulo e Tainah. São a família que eu escolhi.

Agradeço a todos os professores da Unesp Feis, do curso de biologia, que são os melhores do Brasil!

Diversidade de espécies e umidade do solo como promotoras da atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica em espécies herbáceas de Cerrado

Amanda Ribeiro Petroni¹, Luciola Santos Lannes²

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Departamento de Biologia e Zootecnia. Ilha Solteira - SP, Brasil. Email: arpetroni@gmail.com

² Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Departamento de Biologia e Zootecnia. Ilha Solteira - SP, Brasil.

Resumo

Solos do bioma Cerrado são ácidos, possuem baixa disponibilidade de nutrientes inorgânicos e enfrentam períodos de seca bem definidos. Com uma grande diversidade e um alto grau de endemismo, as espécies vegetais do Cerrado apresentam numerosas adaptações. A atividade da enzima fosfatase ácida nas raízes é um dos mecanismos utilizados para extrair os nutrientes necessários do solo, assim como a associação com fungos micorrízicos. O objetivo desse estudo foi investigar a disponibilidade hídrica em vasos com diferentes números de espécies herbáceas como um fator determinante na atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica. O experimento foi conduzido por 90 dias em casa de vegetação com espécies do estrato herbáceo encontradas no Cerrado, sendo: uma gramínea naturalizada, uma gramínea exótica invasora e uma leguminosa nativa. Foram analisadas biomassa total, atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica em vasos contendo monoculturas e combinações de duas e três espécies. Os resultados indicam (1) diminuição da massa de água nos vasos conforme o aumento da biodiversidade, demonstrando o efeito da complementaridade de nicho em relação ao uso da água, (2) efeito negativo da disponibilidade hídrica sobre a atividade de fosfatase ácida, indicando que a ocorrência de secas intensas pode interferir no ciclo do fósforo e afetar

plantas viventes no Cerrado, (3) aumento da diversidade nos vasos promovendo aumento na colonização micorrízica nas três espécies, (4) utilização de estratégias diversas e alternadas para aquisição de nutrientes pela espécie naturalizada *Melinis repens*, evidenciando plasticidade fenotípica, e (5) efeito positivo da biodiversidade sobre a colonização micorrízica e da fosfatase ácida sobre a produção de biomassa para a espécie exótica invasora *Urochloa decumbens*, indicando que a mesma utiliza-se de diversas estratégias para ter sucesso no Cerrado. Em conjunto, os resultados desse trabalho indicam que a biodiversidade afeta a disponibilidade hídrica, alterando processos relacionados à aquisição de nutrientes de maneira diferenciada para espécies de diferentes grupos funcionais.

Palavras-chave: água, biodiversidade, micorriza, fosfatase, nutrientes

Species diversity and soil moisture as promoters of phosphatase activity and mycorrhizal colonization in Cerrado herbaceous plant species

Abstract

Soils in the Cerrado biome are acidic, have low availability of inorganic nutrients and face well-defined drought periods. With a high diversity and degree of endemism, plant species in the Cerrado have numerous adaptations to this environment. The activity of the acid phosphatase enzyme in the roots is one of the mechanisms used to extract nutrients from the soil, as well as the association with mycorrhizal fungi. The aim of this study was to investigate water availability in pots with different numbers of herbaceous species as a determining factor in acid phosphatase activity and mycorrhizal colonization. The experiment was conducted for 90 days in a greenhouse with species from the herbaceous stratum found in the Cerrado, namely: a naturalized grass, an invasive exotic grass and a legume. The plants grew in pots in monocultures and combinations of two and three species. Mean biomass, acid phosphatase activity and mycorrhizal colonization were determined for each species. The results indicate (1) decrease in water

availability as biodiversity increases, showing the effect of niche complementarity for water; (2) negative effect of water availability upon acid phosphatase activity, which may indicate that extreme droughts can affect the phosphorus cycle and influence plants living in the Cerrado, (3) plant diversity promoting high mycorrhizal colonization in all studied species, (4) use of diverse and alternated strategies for nutrient acquisition by the widespread naturalized species *Melinis repens*, showing phenotypic plasticity, and (5) positive effect of biodiversity upon mycorrhizal colonization and acid phosphatase activity of the exotic invasive species *Urochloa decumbens*, showing that it has numerous strategies to be a successful invasive species in the Cerrado. In summary, the results of this work indicate that plant biodiversity might affect water availability in the Cerrado, altering processes related to nutrient acquisition in different ways for plants of different functional groups in the Cerrado.

Keywords: biodiversity, mycorrhiza, nutrients, phosphatase, water

INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro, localizado principalmente no centro-oeste do país (Eiten 1972) é considerado um *hotspot* de biodiversidade por possuir alto grau de ameaça e endemismo (Myers 2000). O Cerrado possui sazonalidade pluviométrica definida e eventos esporádicos naturais de fogo (Ratter, Ribeiro e Bridgewater 1997). As diversidades taxonômicas e funcionais vegetais são elevadas, com um grande número de espécies herbáceas e subarbustivas características de ecossistemas savânicos (Eiten 1972). Tal variedade é devida ao mosaico de fitofisionomias existente no Cerrado, bem como ao específico funcionamento biológico do solo para cada fitofisionomia, o que possibilita o alto grau de endemismo desse bioma (Mendes et al. 2012).

Solos do Cerrado são reconhecidamente pobres em nutrientes minerais e ricos em fósforo orgânico (Goedert et al. 1983; Resende et al. 2011). Eles possuem características marcantes como acidez, baixa disponibilidade de nutrientes inorgânicos, particularmente fósforo (P), altas taxas de alumínio (Al) e intemperização, sendo as classes predominantes Latossolos e Argissolos (Embrapa Cerrado; Adamoli et al. 1986). As diferentes taxas sazonais de serrapilheira e decomposição foliar também influenciam o solo e, conseqüentemente, as fitofisionomias do bioma (Valenti et al. 2008).

Para sobrevivência nesse ambiente com sazonalidade climática, solos distróficos e ocasionalmente fogo, as espécies vegetais do Cerrado possuem diversas adaptações (Lambers e Poorter 1992). Tais adaptações estão associadas à aquisição e à conservação de nutrientes (Aerts e Chapin 1999). As espécies reduzem sua demanda nutricional, liberam substâncias que ajudam a quebrar as moléculas orgânicas do solo e as transformam em nutrientes inorgânicos na quantidade necessária (Goedert 1983). Outra adaptação está relacionada às associações com micro-organismos, que aumentam a superfície de contato das raízes (Abrahão et al. 2018) e expandem a eficiência de uso de nutrientes (Veneklaas et al. 2012).

Por possuir solos ricos em P orgânico (Goedert et al. 1983; Resende et al. 2011), espera-se que as plantas no Cerrado utilizem a enzima fosfatase ácida exsudada pelas raízes para disponibilizar P inorgânico oriundo das frações orgânicas do solo em locais com baixa disponibilidade de P inorgânico (Sultana e Siddique 2015). Este mecanismo pode favorecer o estabelecimento de espécies exóticas (Hacker et al. 2015), especialmente em comunidades com maior diversidade de espécies (Lannes et al. 2020). Um dos motivos que explicaria essa ocorrência é o fato de que em comunidades mais diversas as estruturas radiculares produtoras de fosfatase ácida são mais desenvolvidas devido à competição interespecífica (Vance, Uhde-Stone e Allan 2003).

A associação simbiótica com fungos micorrízicos é determinante em ambientes distróficos como os solos do Cerrado, visto que beneficia as plantas em diversas funções primordiais, como absorção de água, ciclagem de nutrientes e manutenção da biodiversidade (Enstone et al. 2003; Hacker et al. 2015; Kato e Okami 2011). A quantidade de nutrientes no solo, principalmente de P interfere nas associações micorrízicas, uma vez que solos com reduzida disponibilidade de P dificultam o processo de simbiose micorrízica devido ao custo de carbono para a planta (Abrahão et al. 2019).

Outra relação associada ao aumento do número de espécies em comunidades vegetais é o aumento da biomassa (Tilman et al. 1997; Hector et al. 1999; Waide et al. 1999; Roy 2001), que ocorre devido ao processo de complementaridade de nicho, onde as plantas retiram nutrientes de porções diferentes do (Ceulemans et al. 2017), fator que pode facilitar ou dificultar a invasão de espécies exóticas e interferir na umidade do solo.

Solos excessivamente úmidos ou secos podem impactar negativamente atividade microbiana e enzimática, criando condições com pouco oxigênio em situação de encharcamento (Walker et al. 2003; Borowik e Wyszowska 2016). Solos que apresentam uma certa porcentagem de umidade favorecem o aumento da biomassa fúngica, uma vez que propiciam elementos como

água e nutrientes para seu desenvolvimento e dispersão (A'Bear et al. 2014). Esta situação é contrastante para a atividade de fosfatase ácida. Isso ocorre, pois essa enzima também está associada a microorganismos, como a micorriza, que possui uma alta atividade em estações chuvosas devido ao alto carregamento de P e este elemento ficar em baixa quantidade disponível no solo (Huang et al 2011). A baixa porcentagem de água no solo pode levar a uma diminuição de associações micorrízicas e aumento das atividades enzimáticas como a fosfatase ácida exsudada pelas raízes (Borowik e Wyszowska 2016). Esse aumento da atividade de fosfatase ácida é devido a uma maior disponibilidade de P no solo, relacionada ao acúmulo de nutrientes liberados da decomposição de serrapilheira na estação seca (Huang et al 2011).

Ao longo das últimas décadas o Cerrado vem sofrendo com a perda de habitat natural (Françoso et al. 2015). Alterações de uso do solo, mudanças climáticas e ineficiência das áreas protegidas promovem a diminuição de espécies vegetais do Cerrado (Velazco et al. 2019). A inserção de espécies exóticas utilizadas na agropecuária – como as do gênero *Urochloa* – é uma significativa causa de processos relacionados à perda de diversidade (Assis, 2017). Devido ao seu potencial de dominância, tais gramíneas podem reduzir ou deslocar espécies nativas (Pivello et al. 1999). Espécies exóticas invasoras são capazes de modificar determinadas características do solo favorecendo o ambiente para sua perpetuação (Ehrenfeld et al. 2003). Elas também podem se beneficiar do exsudado de espécies nativas, que auxilia na disponibilização de P inorgânico no solo e facilita o estabelecimento de espécies exóticas (Wright et al. 2017).

Devido às mudanças climáticas, observa-se secas mais extremas, extensas e frequentes (Crausbay et al. 2017; Slette et al. 2019). Desta forma, a umidade do solo se mantém mais baixa por muito mais tempo (Van Loon et al. 2016). Períodos secos mais extensos podem impactar na atividade de fosfatase ácida pelas raízes devido ao aumento de biomassa seca em decomposição (Huang et al 2011).

Pesquisas que buscam identificar os mecanismos utilizados pelas espécies vegetais para sobrevivência em condições adversas são essenciais. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da diversidade de espécies vegetais sobre a disponibilidade hídrica, atividade de fosfatase ácida, colonização micorrízica e produção de biomassa em comunidades experimentais do Cerrado. Espera-se encontrar menor conteúdo de água, maior atividade de fosfatase ácida, maior biomassa e maiores taxas de colonização micorrízica em comunidades com maior diversidade de espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies utilizadas

Para a realização desse experimento foram selecionadas três espécies do estrato herbáceo encontradas no Cerrado, sendo: uma gramínea naturalizada não-invasora *Melinis repens* (Willd.) Zizka, uma gramínea não-nativa invasora *Urochloa decumbens* Stapf. e uma leguminosa *Calopogonium mucunoides* Dasv.

Localização

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada no Campus II da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), na cidade de Ilha Solteira, estado de São Paulo, Brasil.

Desenho experimental

Após seis semanas de germinação, o experimento foi montado com as espécies *Melinis repens*, *Urochloa decumbens* e *Calopogonium mucunoides*. O solo foi composto de duas partes de solo de Cerrado e uma parte de areia, e foi adicionado em vasos de polipropileno de 380 ml devidamente etiquetados de acordo com as espécies dispostas.

Foram preparados três vasos com três indivíduos da mesma espécie, seis vasos com duas espécies iguais e uma diferente, e um vaso com três indivíduos de espécies diferentes. Para cada combinação foram montadas cinco réplicas, totalizando 50 vasos e 150 indivíduos (Fig. 1).

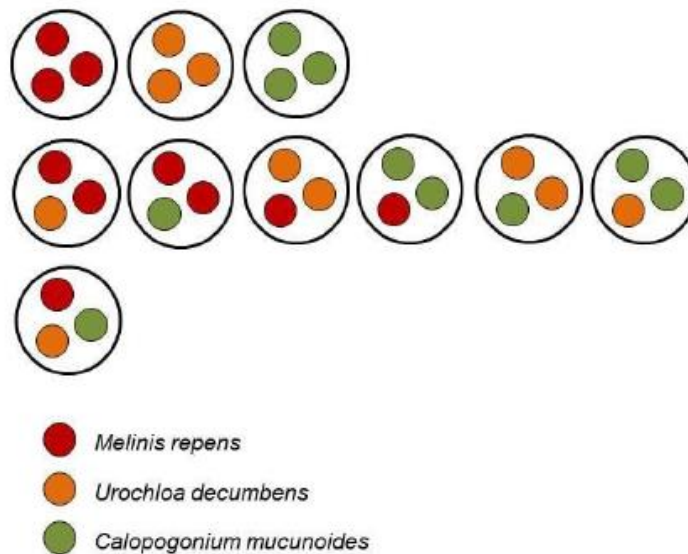


Fig. 1 Desenho experimental com três indivíduos em cada vaso, obtendo 10 combinações: três com espécies iguais (monoculturas), seis com duas espécies iguais e uma diferente, e um com três espécies diferentes

Durante 90 dias os vasos foram pesados e regados diariamente com quantidade de água variando entre 50, 80 e 100 ml, dependendo da umidade relativa do dia. Os resultados foram registrados diariamente para determinar a umidade dos vasos (Fig. 2).

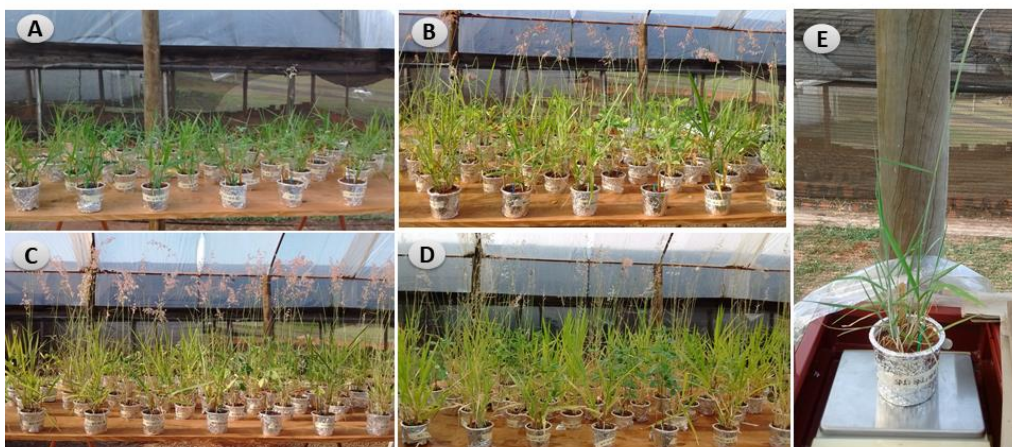


Fig 2 Experimento em casa de vegetação ao longo dos 90 dias, (a) Semana 4; (b) Semana 7; (c) Semana 9; (d) Semana 13. Todos os 50 vasos foram pesados (e) ao longo de 90 dias e regados com quantidades iguais de água entre os vasos.

Determinação de atividade de fosfatase ácida radicular

Ao fim dos 90 dias os vasos foram desmontados, a biomassa vegetal foi separada entre raiz e parte aérea e armazenada em saco de papel. Uma fração de 100 mg de raiz por indivíduo foi separada para determinação de fosfatase ácida. Após, as frações foram colocados em pequenos potes com água destilada (Fig 3). A desmontagem do experimento foi realizada em dois dias para garantir que as determinações da atividade de fosfatase ácida fossem realizadas no mesmo dia da coleta. Apesar de no início haver o total de 50 vasos e 150 indivíduos, quatro espécimes em quatro vasos diferentes morreram ao longo do experimento, tendo sido estes vasos descartados durante a desmontagem. Dessa forma, foram desmontados 46 vasos (23 vasos no primeiro dia e 23 vasos no segundo dia) e realizadas 69 determinações no primeiro dia e 69 determinações no segundo dia, totalizando 138 determinações de atividade de fosfatase ácida nas raízes.

Após este pré-preparo em casa de vegetação, os procedimentos em laboratório foram os mesmos para os dois dias. Para determinação de fosfatase ácida, utilizou-se o método do nitrofenilfosfato (adaptado de Olde Venterink, 2011). Todos os dados coletados foram tabulados em uma planilha no Excel para a geração de gráficos para análise de resultados.



Fig 3 Desmontagem do experimento em casa de vegetação, após 90 dias de pesagem e rega diários. **a.** Desmontagem do vaso; **b.** Lavagem grossa, retirada da maior parte do solo; **c.** Lavagem fina, retirada do excesso de solo das raízes; **d.** Desagregação das raízes; **e.** Separação dos indivíduos; **f.** Desassociação de raiz e parte aérea; **g.** Armazenamento de biomassa aérea e radicular separadamente; **h.** Extração de amostra de 100 mg de raiz para determinação de atividade de fosfatase ácida.

Biomassa seca

Após todos os procedimentos laboratoriais para determinação de fosfatase ácida, o material vegetal separado em parte aérea e radicular foi acondicionado em estufa de circulação a 60 °C por 72 horas para secagem completa. Para a obtenção dos dados de biomassa, este material foi pesado em balança de precisão.

Determinação de colonização micorrízica

Para determinação da colonização micorrízica em microscópio óptico, as raízes passaram por um processo de descoloração com solução de hidróxido de potássio (KOH 10%), seguido de coloração com tinta de caneta, de acordo com o protocolo de Vierheilig et al. (1998).

Para o processo de descoloração as raízes foram colocadas separadamente em tubos de ensaio numerados. Adicionou-se a solução de KOH 10% com auxílio da pipeta, e então as raízes

foram submetidas a banho-maria (90°C) por até três horas. Durante esse processo, caso a solução apresentasse uma coloração muito amarelada seria necessária a troca do líquido para que a descoloração fosse suficientemente eficaz. Após o tempo estimado, as raízes foram respectivamente lavadas com ácido clorídrico (HCl 5%) e água para interromper o processo de descoloração. Para o processo de coloração foi utilizada solução de tinta de caneta e ácido acético (segundo Vierheilig et al. 1998). A solução foi colocada em quantidade suficiente para cobrir as raízes no tubo de ensaio e retornada para o banho-maria por 20 minutos. Ao final dessa etapa, as raízes foram lavadas com água e dispostas em eppendorfs com glicerina para armazenamento e análise posterior.

As lâminas graduadas utilizadas para análise em microscópio e foram montadas individualmente para análise de colonização micorrízica da raiz de cada espécie. No total foram analisados 128 indivíduos. Esse valor é diferente em relação a amostragem de atividade de fosfatase ácida, pois em alguns indivíduos a quantidade de raízes finas para esse tipo de análise era muito pequena, sendo priorizado para determinação de atividade de fosfatase ácida.

Análise estatística

Foram aplicadas análises de variância (ANOVA) seguidas por testes de Tukey para avaliar o efeito do número de espécies por vaso (biodiversidade) sobre a atividade de fosfatase ácida radicular, a colonização micorrízica, a massa de água e a biomassa vegetal. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio de software R versão 4.0.4.

Foram aplicados modelos de equações estruturais (SEM) visando verificar os efeitos da biodiversidade sobre a disponibilidade hídricas nos vasos, destes sobre atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica como determinantes da biomassa vegetal, utilizando-se o software Stata 16 (64-Bit).

RESULTADOS

Comunidades mais biodiversas em geral apresentaram menores massas de água nos vasos, tendo esse efeito sido significativo para *Melinis repens* e *Urochloa decumbens* (Fig 4).

Fortes efeitos positivos da biodiversidade sobre as taxas de colonização micorrízica foram detectados para todas as espécies estudadas (Fig 5). A gramínea naturalizada *Melinis repens* apresentou valores significativamente mais elevados de atividade de fosfatase ácida nas policulturas em relação às monoculturas, o que não ocorreu com a gramínea invasora nem com a leguminosa (Fig 6). Vasos mais biodiversos promoveram biomassas mais baixas para as espécies estudadas, com exceção de *Melinis repens* (Fig7).

Quando verificados os diagramas de SEM – nos quais todos os dados são analisados integradamente – confirma-se que a diversidade de espécies nos vasos afeta positivamente as taxas de colonização micorrízica. Observamos resultados semelhantes quando os dados são analisados conjuntamente para todas as espécies (Fig 8a), bem como quando analisados separadamente para cada espécie (Fig 8 b-d). Confirma-se também o efeito positivo da biodiversidade sobre a atividade de fosfatase ácida para a espécie *Melinis repens*. Para as gramíneas, a quantidade de espécies influenciou negativamente a umidade do solo (Figuras 8 c-d), enquanto *Colopogonium mucunoides* não apresentou diferença significativa para esta relação (Figura 8b). Os diagramas revelam a influência positiva da atividade de fosfatase ácida sobre a biomassa da invasora *Urochloa decumbens* (Figura 8d) e relação negativa entre colonização micorrízica e atividade de fosfatase ácida.

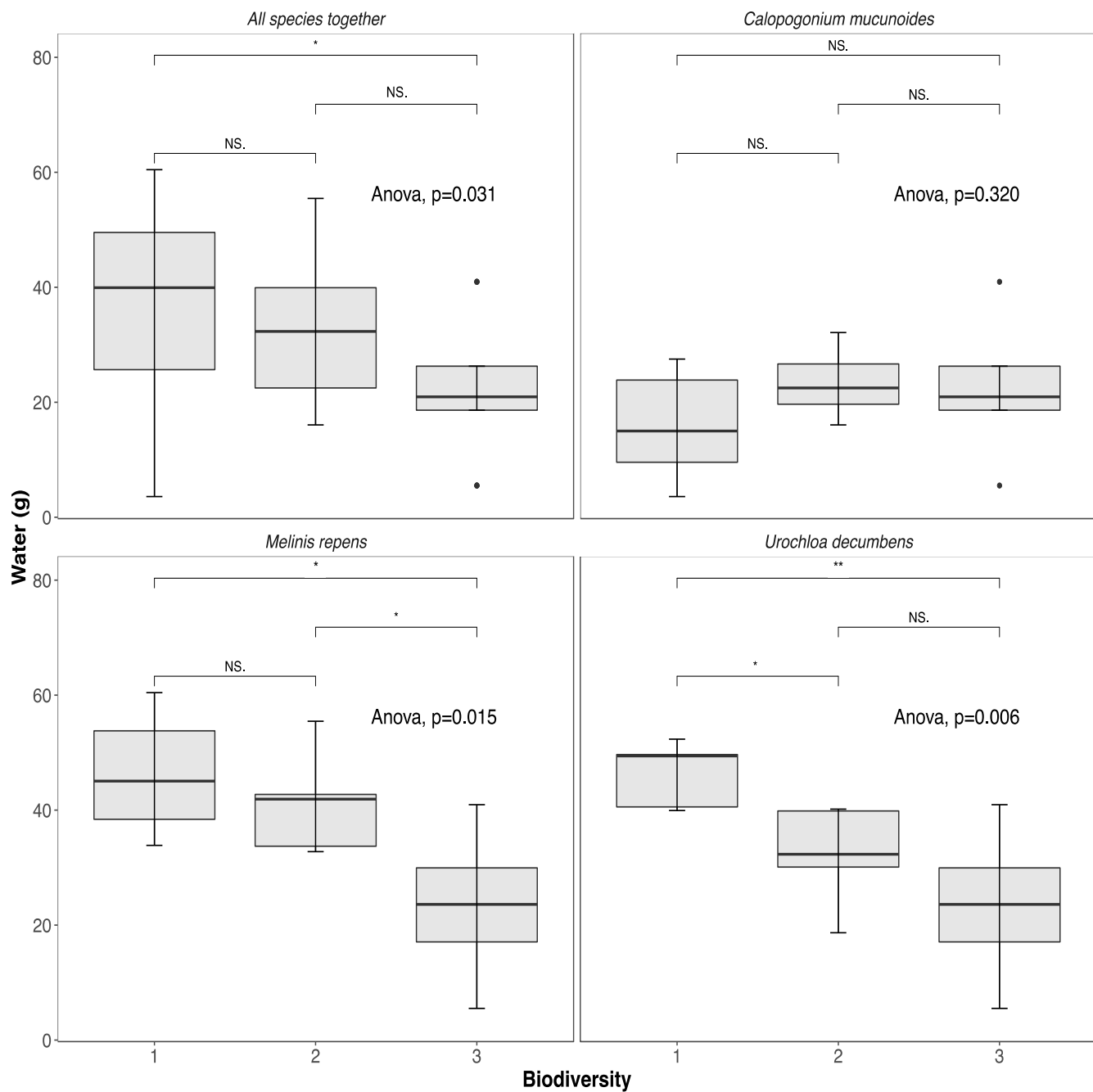


Fig 4 Efeito do número de espécies sobre a massa de água total em todos os vasos analisados em conjunto e em vasos com as plantas focais *Calopogonium mucunoides*, *Melinis repens* e *Urochloa decumbens* em monoculturas (N=15), combinações de duas espécies (N=17) ou três espécies (N=14). As barras horizontais acima do gráfico mostram a significância entre os grupos NS: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; * * $P \leq 0.01$.

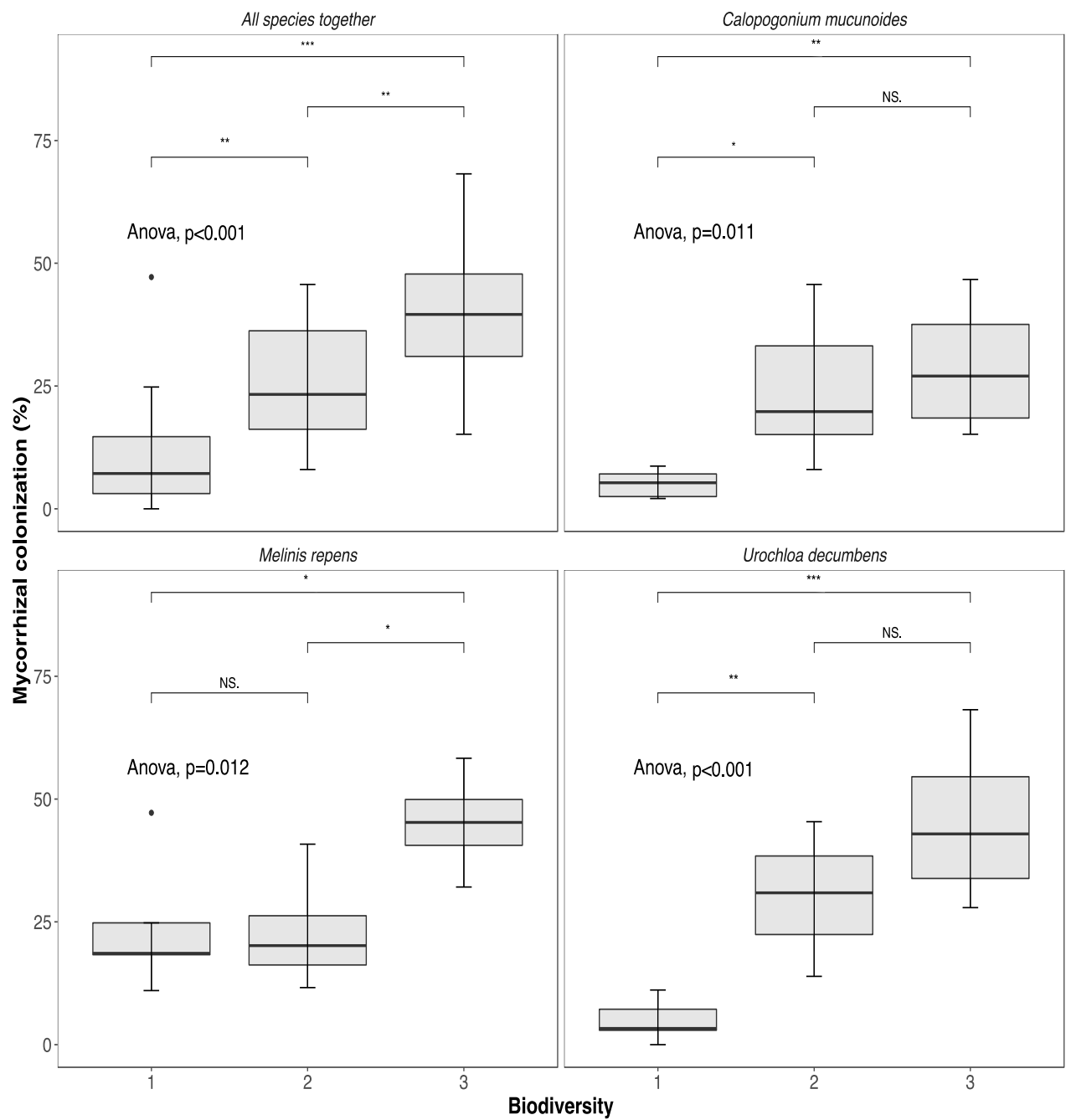


Fig 5 – Efeito do número de espécies sobre a taxa de colonização micorrízica em todos os vasos analisados em conjunto e em vasos com as plantas focais *Calopogonium mucunoides*, *Melinis repens* e *Urochloa decumbens* em monoculturas (N=15), combinações de duas espécies (N=17) ou três espécies (N=14). As barras horizontais acima do gráfico mostram a significância entre os grupos NS: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

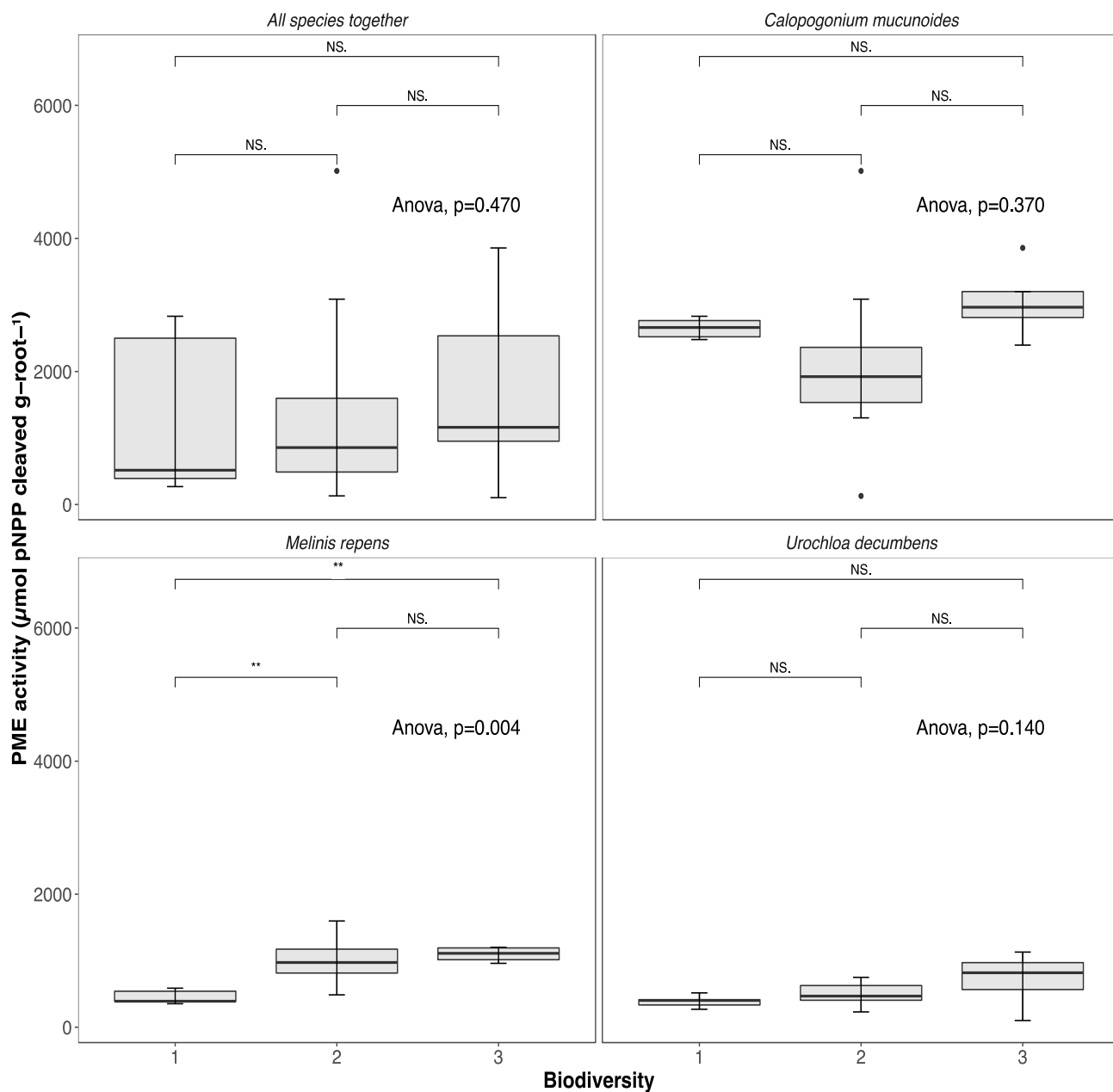


Fig 6 Efeito do número de espécies sobre a atividade de fosfatase ácida em todos os vasos analisados em conjunto e em vasos com as plantas focais *Calopogonium mucunoides*, *Melinis repens* e *Urochloa decumbens* em monoculturas (N=15), combinações de duas espécies (N=17) ou três espécies (N=14). As barras horizontais acima do gráfico mostram a significância entre os grupos NS: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

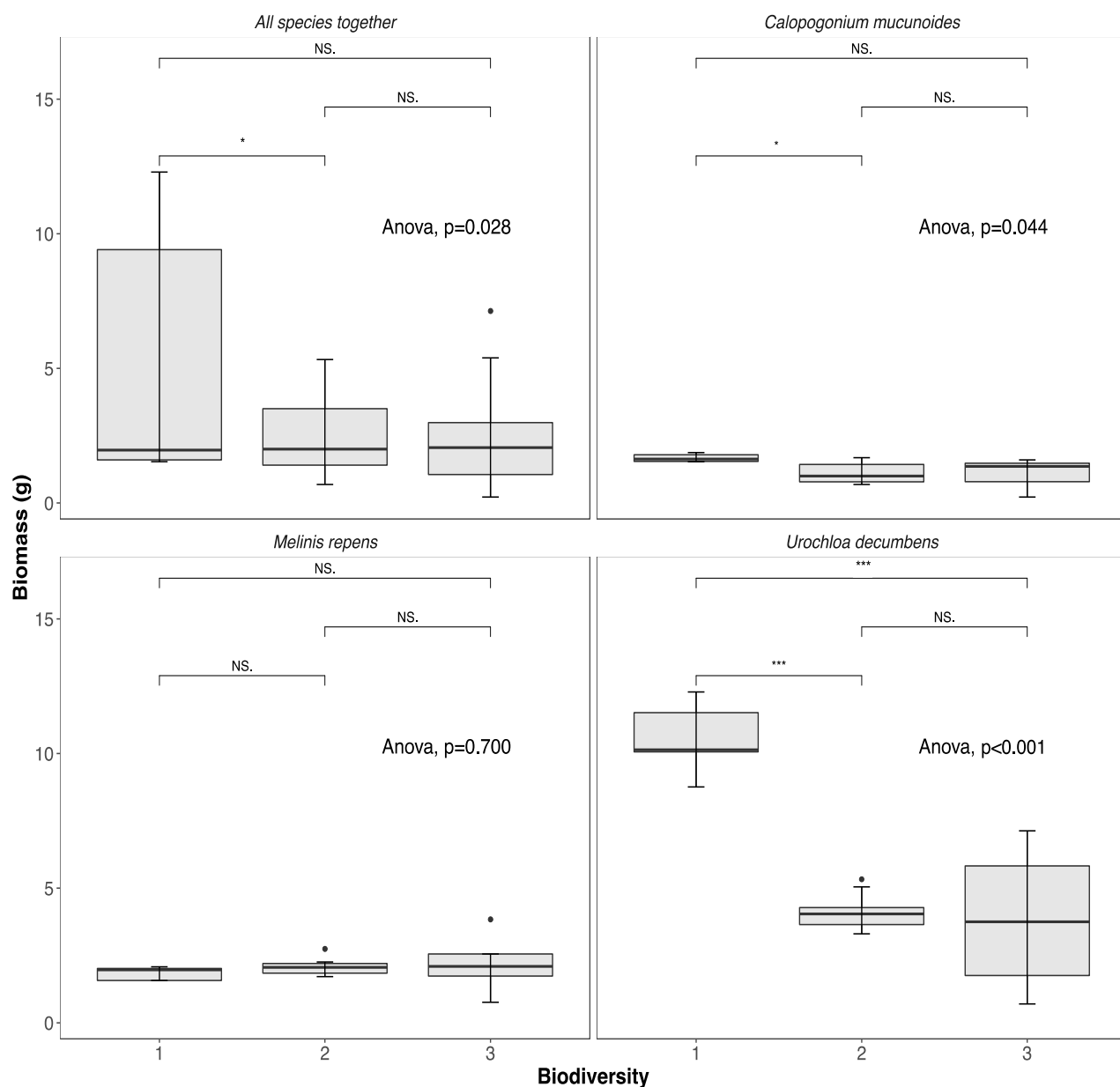


Fig 7 Efeito do número de espécies sobre a biomassa total em gramas em todos os vasos analisados em conjunto e em vasos com as plantas focais *Calopogonium mucunoides*, *Melinis repens* e *Urochloa decumbens* em monoculturas (N=15), combinações de duas espécies (N=17) ou três espécies (N=14). As barras horizontais acima do gráfico mostram a significância entre os grupos NS: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

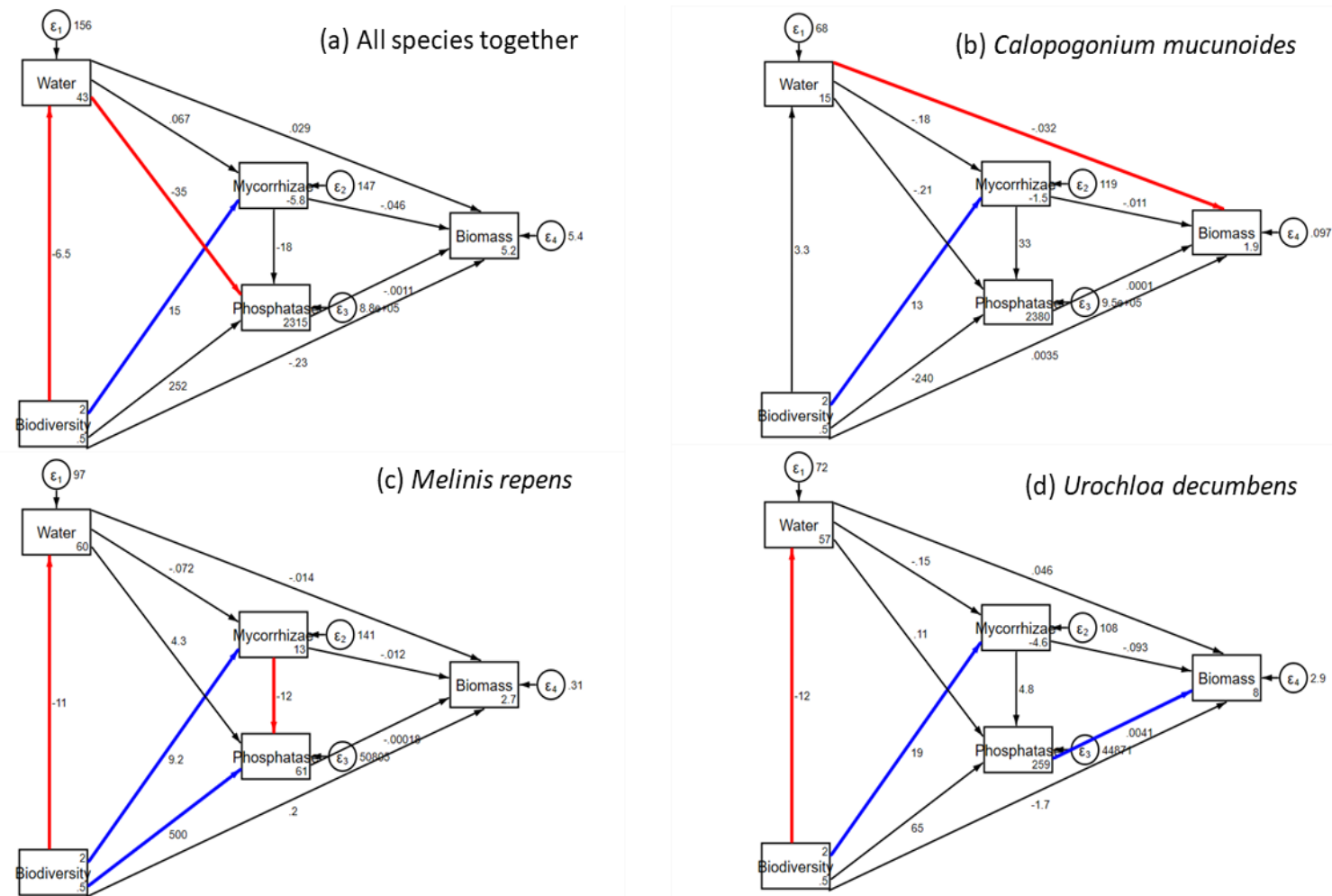


Fig 8 Modelagem de equação estrutural (SEM) mostrando os efeitos do conteúdo de água e da biodiversidade sobre a atividade das fosfatase ácida radicular, colonização micorrízica e biomassa de *Calopogonium mucunoides*, *Melinis repens*, *Urochloa decumbens* e de todas estas espécies analisadas em conjunto. Os números ao lado das setas indicam os valores padronizados (escalonados pelos desvios-padrão das variáveis). As setas azuis e vermelhas respectivamente indicam relações positivas e negativas significativas. Boa adaptação de todos os modelos SEM: $p \chi^2 > 0,05$ (um bom ajuste do modelo indica que o ajuste não é claramente diferente do modelo teórico).

DISCUSSÃO

Nos vasos contendo a gramínea naturalizada *Melinis repens* e a gramínea exótica *Urochloa decumbens*, o aumento da diversidade de espécie promoveu maior consumo de água nos vasos. Essa observação pode ser explicada com base na complementaridade de nicho quando espécies enraízam em diferentes camadas do solo e, portanto, retiram água em estratos específicos (Ceulemans et al. 2017).

Uma maior diversidade gerou aumento significativo na atividade de fosfatase ácida radicular e colonização micorrízica para a espécie *Melinis repens*, resultado também indicado por Lannes et al. (2020) para outras espécies encontradas no Cerrado. Essa relação positiva entre a atividade de fosfatase ácida e a diversidade de espécies pode ser atribuída ao aumento da produção das estruturas produtoras de fosfatase ácida (pontas de raízes) como resposta ao reconhecimento de espécies vizinhas como possíveis competidoras (Biedrzycki et al. 2010; Semchenko et al. 2014; Lannes et al. 2020). A gramínea naturalizada *Melinis repens* foi a única a ter a biodiversidade afetando positivamente micorriza e fosfatase ácida e apresentou relação negativa entre essas duas variáveis (Figura 8c), indicando que a mesma se beneficia da biodiversidade nesses dois aspectos diferentes relacionados à aquisição de recursos, alternando-os. Essa alternância de estratégias pode conferir ao indivíduo grande plasticidade fenotípica em ambientes com escassez de recursos, tornando a espécie uma boa colonizadora. De fato, percebe-se que esta espécie – o capim-favorito – é amplamente distribuída em áreas naturais e degradadas no Cerrado.

A leguminosa *Calopogonium mucunoides* apresentou elevados valores de fosfatase ácida em relação às gramíneas, mesmo não indicando diferença entre vasos com monocultura, com duas ou com três espécies. Os altos valores observados para a leguminosa podem ser explicados pela capacidade da espécie fixar nitrogênio e este elemento ser abundante na enzima fosfatase ácida (Houlton et al. 2008), e pela associação a outros microorganismos

produtores de fosfatase ácida, como fungos micorrízicos (Nahas 2002).

A quantidade de água nos vasos seguiu padrão oposto da atividade de fosfatase ácida radicular para a gramínea naturalizada *Melinis repens*. O aumento no comprimento das raízes, e em especial o de raízes finas, pode proporcionar o aumento do contato com o solo e permitir uma maior absorção de água e nutrientes pela planta em áreas menos úmidas (Luizão et al. 2007; Metcalfe et al. 2008), o que é observado em estudos de campo comparando-se produção de raízes finas entre o período seco e o período chuvoso (Joslin et al. 2000). Esta maior produção de raízes gera também a produção de estruturas produtoras de fosfatase ácida, como pontas de raiz (Vance et al. 2003). Portanto, para a gramínea naturalizada, este trabalho foi capaz de corroborar a hipótese de que uma maior diversidade de espécies gera menor umidade e aumenta a atividade de fosfatase ácida radicular. Quando comunidades experimentais são investigadas quanto à resposta da produção de raízes finas face à escassez de água, estudos mostram que o padrão pode ser variável e dependente da natureza dos competidores, se em monoculturas ou em competição interespecífica (Ludovici e Morris 1997).

O aumento na diversidade de espécies aumentou as taxas de colonização micorrízica em todas as espécies estudadas. A relação positiva entre essas duas variáveis já havia sido descrita na literatura, entretanto, nos estudos a causalidade era o maior comprimento de hifas micorrízicas no solo com concomitante diminuição da concentração de fósforo disponível no solo e aumento do fósforo foliar, indicando uma exploração eficiente do fósforo no solo e possibilitando maior biodiversidade de espécies vegetais (van der Heijden et al. 1998). No presente estudo, a relação de causalidade se dá no sentido contrário – maior biodiversidade de plantas gerando maiores taxas de colonização micorrízica. Uma possível explicação para este fenômeno está relacionada à capacidade destas plantas terem desenvolvido, ao longo de sucessivas gerações, características que garantem sua sobrevivência em solos com baixo teor

de nutriente em áreas de alta biodiversidade. Uma destas características pode estar associada ao reconhecimento de seus vizinhos como sendo de outras espécies e, portanto, possíveis fortes competidores (Semchenko et al. 2014; Biedrzycki et al. 2010), incentivando as plantas a produzirem estruturas importantes para competição radicular, como mais pontas de raízes e área radicular superficial em comunidades mais biodiversas- (Lannes et al. 2020). Este investimento em estruturas radiculares em vasos mais biodiversos pode ter gerado maior área para colonização micorrízica nas espécies focais estudadas, o que explica a maior taxa de colonização micorrízica em plantas co-existindo com vizinhos de espécies distintas.

Quando se comparam as espécies focais em monoculturas, o fato da gramínea naturalizada *Melinis repens* ter apresentado maior taxa de colonização micorrízica do que a gramínea invasora *Urochloa decumbens* e a leguminosa *Calopogonium mucunoides* pode estar relacionado às estratégias diferenciadas de aquisição de nutrientes destas espécies. A gramínea invasora possui estrutura radicular agressiva, sendo eficaz e eficiente na absorção de nutrientes e água no solo, o que a torna menos dependente de fungos micorrízicos. A leguminosa, por sua vez, é menos dependente da associação com micorrizas por apresentar capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico. Isso associado ao fato da biodiversidade não ter afetado a disponibilidade de água nos vasos para a leguminosa indica maior autonomia no processo de aquisição de nutrientes importantes como fósforo e nitrogênio e menor dependência em relação às micorrizas.

Adicionalmente, a SEM confirmou o efeito do número de espécies sobre colonização micorrízica e fosfatase ácida, mas estas foram raramente traduzidas em aumento de biomassa pela planta. Ajustes fisiológicos, morfológicos e anatômicos nas raízes, assim como associação com microrganismos são comuns para que a planta consiga ajustar a absorção de água e nutrientes em relação às condições do solo (Enstone et al. 2003; Kato e Okami 2011; Hacker et al. 2015). O indivíduo, porém, pode investir recursos em outras estruturas e funções

além de biomassa, como defesa e reprodução, por exemplo. Entretanto, tais variáveis não foram objetos de estudo neste projeto.

A gramínea invasora *Urochloa decumbens* é a única espécie desse experimento que possui valores significativos em relação à rota “efeito do número de espécies → aumento na colonização micorrízica” e “atividade de fosfatase ácida → aumento de biomassa”. Esta planta, a qual possui alta capacidade invasora (Pivello et al. 1999; Lannes et al. 2016), se beneficia da fosfatase ácida e da associação com fungos micorrízicos para o seu desenvolvimento. Seu sucesso, mesmo em áreas naturais, pode ser explicado, devido ao fato dessa planta usar como estratégia a absorção de fósforo disponibilizado pela fosfatase ácida exsudada de plantas nativas (Lannes et al. 2020) e se privilegiar com a alta diversidade ampliando as chances de colonização micorrízica

Aumentos de temperatura seguindo o aumento da concentração de gases de efeito estufa na atmosfera devem mudar padrões hidrológicos, causando uma maior seca no Cerrado (IPCC, 2014). Essa alteração no padrão de pluviosidade, aumentando a frequência e intensidade das secas pode inibir a atividade de fosfatase ácida para algumas espécies nativas, e consequentemente gerar uma perda de diversidade, o que pode acarretar perda de funcionabilidade, assim como maior probabilidade de invasão de espécies exóticas.

Esse estudo demonstra a importância da diversidade para o funcionamento do ecossistema e manutenção da própria diversidade. Com o aumento gradual da riqueza de espécies nos vasos as taxas de colonização micorrízica e de atividade de fosfatase ácida pelas raízes dos indivíduos aumentaram. Entretanto, a umidade do solo nos vasos mais diversos diminuiu e esta variável geralmente não exerceu influência significativa nos outros valores avaliados. Assim como as mudanças climáticas podem alterar padrões hidrológicos, a perda de diversidade, muitas vezes como consequência das mudanças do uso do solo e invasão de espécies exóticas, pode ocasionar desequilíbrio ecológico acarretando extinções de inúmeras espécies vegetais.

REFERÊNCIAS

- A'Bear AD, Jones TH, Kandeler E, Boddy L (2014). Interactive effects of temperature and soil moisture on fungal-mediated wood decomposition and extracellular enzyme activity. *Soil Biology and Biochemistry* 70: 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.017>.
- Abrahão A, Costa PB, Lambers H, Andrade SAL, Sawaya ACHF, Ryan MH, Oliveira RS (2019) Soil types select for plants with matching nutrient-acquisition and -use traits in hyperdiverse and severely nutrient- impoverished campos rupestres and cerrado in Central Brazil. *Journal of Ecology*.
- Adamoli J, Macedo J, Azevedo LG, Madeira Netto J (1986). Caracterização da região dos cerrados. In: Goedert WJ (ed) *Solos dos Cerrados: tecnologia e estratégias de manejo*. Embrapa-CPAC/Nobel. 33–74.
- Aerts R. & Chapin FS (1999). The mineral nutrition of wild plants revisited: A re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research*, 30: 1–67.
- Assis, GB (2017) Invasão do campo cerrado por braquiária (*Urochloa decumbens*): perdas de diversidade e técnicas de restauração. Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro / Escola Nacional de Botânica Tropical.
- Biedrzycki ML, Jilany TA, Dudley SA, Pais HP (2010). Root exudates mediate kin recognition in plants. *Community Integrative Biology* 3: 28–35.
- Borowik A & Wyszowska J (2016). Soil moisture as a factor affecting the microbiological and biochemical activity of soil. *Plant Soil Environ* 6:250–255. <https://doi.org/10.17221/158/2016-PSE>.
- Ceulemans T, Bodé S, Bollyn J, Harpole S, Coorevits K, Van Acker K, Smolders E, Boeckx P, Honnay O (2017). Phosphorus resource partitioning shapes phosphorus acquisition and plant species abundance in grasslands. *Nature Plants* 3, 16224.

Crausbay DS, Ramirez AR, Carter SL, Cross MS, Hall KR, Bathke DJ, Betancourt JL, Colt S, Cravens AE, Dalton MS, Dunham JB, Hay LE, Hayes MJ, McEvoy J, McNutt CA, Moritz MA, Nislow KH, Raheem N, Sanford T (2017). Defining ecological drought for the twenty-first century. *American Meteorological Society*. 2543-2550.

Ehrenfeld JG (2003). Effects of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes. *Ecosystems* 6: 503–523.

Eiten G (1972). The cerrado vegetation of Brazil. *The Botanical Review*, 38 (2): 201–341.

Enstone DE, Peterson CA, Ma F (2003). Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 335– 351.

Françoso RD, Brandão R, Nogueira CC, Salmons YB, Machado RB, Colli GR (2015). Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. *Natureza & conservação*, 13 (1): 35–40.

Goedert WJ (1983). Management of the Cerrado soils of Brazil: a review. *J. Soil Sci.* 34: 405–428.

Hacker N, Ebeling A, Gessler A, Gleixner G, Macé OG, Kroon H, Lange M, Mommer L, Eisenhauer N, Ravenek J, Scheu S, Weigelt A, Wagg C, Wilcke W, Oelmann Y (2015). Plant diversity shapes microbe-rhizosphere effects on P mobilization from organic matter in soil. *Ecology Letter*. 18: 1356–1365.

Hector A, Schmid B, Beierkuhnlein C, Caldeira MC, Diemer M, Dimitrakopoulos PG, Finn JA, Freitas H, Giller PS, Good J, Harris R, Höglberg P, Huss-Danell K, Joshi J, Jumpponen A, Körner C, Leadley PWS, Loreau M, Minns A, Mulder CPH, O'Donovan G, Otway SJ, Pereira JS, Prinz A, Read DJ, Scherer-Lorenzen M, Schulze ED, Siamantziouras ASD, Spehn EM, Terry AC, Troumbis AY, Woodward FI, Yachi S, Lawton JH (1999). Plant diversity and productivity experiments in European grasslands. *Science* 286:1123–1127.

Houlton BJ, Wang YP, Vitousek PM, Field CB (2008). A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature* 454: 327–331.

Huang W, Liu J, Zhou G, Zhang D, Deng Q (2011) Effects of precipitation on soil acid phosphatase activity in three successional forests in southern China. *Biogeosciences* 8: 1901–1910 <https://doi.org/10.5194/bg-8-1901-2011>.

IPCC (2014) *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.

Joslin JD, Wolfe MH, Hanson PJ (2000). Effects of altered water regimes on forest root systems. *New Phytologist*. 147: 117–129.

Kato Y & Okami M (2011). Root morphology, hydraulic conductivity and plant water relations of high-yielding rice grown under aerobic conditions. *Annals of Botany* 108(3): 575–583.

Lambers H. & Poorter H (1992). Inherent variation in growth rate between higher plants: A search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecological Research*, 23: 187–261.

Lannes LS; Bustamante MMC; Edwards PJ; Venterink HO (2016). Native and alien herbaceous plants in the Brazilian Cerrado are (co-)limited by different nutrients. *Plant and Soil*, 400: 234–243.

Lannes LS, Karrer S, Teodoro DAA, Bustamante MMC, Edwards PJ, Venterink HO (2020). Species richness both impedes and promotes alien plant invasions in the Brazilian Cerrado. *Nature*. 10:11365.

Ludovici KH & Morris LA (1997). Competition-induced reductions in soil water availability reduced pine root extension rates. *Soil Science Society of America Journal* 61: 1196–1202.

Luizão RCC, Luizão FJ, Proctor J (2007). Fine root growth and nutrient release in decomposing leaf litter in three contrasting vegetation types in Central Amazonia. *Plant Ecology* 192: 225–236.

Melinis repens in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR). Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/melinis_repens>. Acesso em 19 de fevereiro de 2021.

Mendes IC, Fernandes MF, Chaer GM, Reis Junior FB (2012). Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. *Plant Soil*. 359: 183–195.

Metcalf DB, Meir P, Aragão, LEOC, Costa ACL, Braga AP, Gonçalves PHL, Junior JAS, Almeida SS, Dawson LA, Mahli Y, Williams M (2008). The effects of water availability on root growth and morphology in an Amazonian rainforest. *Plant and Soil* 311: 189–199.

Myers N, Mittermeier A, Mittermeier CG, Fonseca GAB and Kents J (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403: 853–858.

Nahas E (2002). Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Bragantia*. 61(3): 267–275.

Olde Venterink H (2011). Legumes have a higher root phosphatase activity than other forbs, particularly under low inorganic P and N supply. *Plant Soil*. 347:137–146.

Pivello VR, Shida CN, Meirelles ST (1999). Alien grasses in Brazilian savannas: a threat to biodiversity. *Biodiversity and Conservation*, 8: 1281–1294.

Ratter J, Ribeiro JF & Bridgewater S (1997). The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. *Annals Of Botany*, 80 (3): 223–230. Oxford University Press (OUP).

Resende JCF, Markewitz D, Klink CA, Bustamante MMC, Davidson EA (2011). Phosphorus cycling in a small watershed in the Brazilian Cerrado: impacts of frequent burning. *Biogeochemistry* 105: 105–118.

Roy J (2001). How does biodiversity control primary productivity. In: Roy J, Saugier B, Mooney HA (eds) Terrestrial global productivity. Academic Press, San Diego.

Sanzonowics C. Solos do Cerrado. Agência de Informação Embrapa Biomas Cerrado. Disponível em <
https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_14_911200585231.html>, acesso em 15 de fevereiro de 2021.

Semchenko M; Saar S, Lepik A (2014). Plant root exudates mediate neighbor recognition and trigger complex behavioural changes. *New Phytologist* 204: 631–637.

Slette IJ, Post AK, Awad M, Even T, Punzalan A, Williams S, Smith MD, Knapp AK (2019). How ecologists define drought, and why should do better. *Global Change Biology*. 25:3193–3200. <https://doi.org/10.1111/gcb.14747>.

Sultana J & Siddique MNA. Quantifying the role of arbuscular mycorrhizal colonization and acid phosphatase activity in grass biomass production. *J. Mol. Stud. Med. Res*. 01: 01–15 (2015). <https://doi.org/10.18801/jmsmr.010115.01>

Tilman D, Knops J, Wedin D, Reich P, Ritchie M, Seimann E (1997) The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* 277:1300–1302.

Wright AJ, Wardle DA, Callaway R, Gaxiola A (2017). The overlooked role of facilitation in biodiversity experiments. *Trends Ecol. Evol.* 32: 383–390.

van der Heijden M, Klironomos J, Ursic M et al. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69–72.

Valenti MW, Cianciaruso MV, Batalha MA (2008). Seasonality of litterfall and leaf decomposition in a cerrado site. *Brazilian Journal of Biology* 68: 459-465.

Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*. 157: 423–447.

Van Loon AF, Gleeson T, Clark J, Van Dijk AIJM, Stahl K, Hannaford J, Di Baldassarre G, Teuling AJ, Tallaksen LM, Uijlenhoet R, Hannah DM, Sheffield J, Svoboda M, Verbeiren B, Wagener T, Rangelcroft S, Waders N, Van Lanen HAJ (2016). Drought in the Anthropocene. *Nature Geoscience* 9.

Velazco SJE., Villalobos F., Galvão F, De Marco Júnior P (2019). A dark scenario for Cerrado plant species: Effects of future climate, land use and protected areas ineffectiveness. *Diversity and distributions*, 25 (4): 660–673.

Veneklaas EJ, Lambers H, Bragg J., Finnegan PM., Lovelock CE, Plaxton WC, Price CA, Scheible WR, Shane MW, White PJ, Raven JA (2012). Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *New Phytologist*, 195 (2): 306–320.

Waide RB, Willig MR, Steiner CF, Mittelbach G, Gough L, Dodson SI, Juday GP, Parmenter R (1999). The relationship between productivity and species richness. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 30: 257–300.

Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM (2003). Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology* 132: 44–51 <https://doi.org/10.1104/pp.102.019661>.

Normas da Revista *Theoretical and Experimental Plant Physiology*

Title page

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration

Trial registration number, date of registration followed by “retrospectively registered”

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

To be used for all articles, including articles with biological applications

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)

Availability of data and material (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Authors' contributions (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

Additional declarations for articles in life science journals that report the results of studies involving humans and/or animals

Ethics approval (include appropriate approvals or waivers)

Consent to participate (include appropriate statements)

Consent for publication (include appropriate statements)

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using [Springer Nature's LaTeX template](#).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Text Organization

Text Organization (after the title page and abstract):

- Introduction;
- Material and Methods;
- Results (separated from discussion);
- Discussion;
- References.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Please alphabetize according to the following rules: 1) For one author, by name of author, then chronologically; 2) For two authors, by name of author, then name of coauthor, then chronologically; 3) For more than two authors, by name of first author, then chronologically.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see ISSN LTWA.

If you are unsure, please use the full journal title.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1