

O IMPACTO DOS FOGOS FLORESTAIS NOS SOLOS E NO BACTERIOMA DE *ACACIA LONGIFOLIA*:
UM CASO DE ESTUDO EM MIRA, AVEIRO*

THE IMPACT OF FOREST FIRES ON SOILS AND THE BACTERIOME OF *ACACIA LONGIFOLIA*:
A CASE STUDY IN MIRA, AVEIRO

Joana Jesus

Universidade de Lisboa, cE3c - Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes
CHANGE - Global Change and Sustainability Institute (Portugal)
Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal
ORCID 0000-0002-8007-5031 jgjesus@fc.ul.pt

Cristina Máguas

Universidade de Lisboa, cE3c - Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes
CHANGE - Global Change and Sustainability Institute (Portugal)
Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal
ORCID 0000-0002-4396-7073 cmhanson@fc.ul.pt

Helena Trindade

Universidade de Lisboa, cE3c - Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes
CHANGE - Global Change and Sustainability Institute (Portugal)
Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal
ORCID 0000-0002-1209-2622 htrindade@fc.ul.pt

RESUMO

Os fogos florestais provocam perturbações nos ecossistemas, sendo cada vez mais frequentes nos climas Mediterrânicos. A introdução de espécies exóticas, que podem tornar-se invasoras, como o género *Acacia*, tem-se revelado impactante em regiões do nosso país, diminuindo a biodiversidade e alterando a composição dos solos. Atualmente, *Acacia longifolia* é uma das invasoras mais agressivas, e como leguminosa, é capaz de fixar azoto atmosférico por associação simbiótica com bactérias no interior de nódulos radiculares, com outras funções ainda desconhecidas. Neste trabalho foram amostradas áreas não ardidas e ardidas, onde se estudou (1) o impacto do fogo nas propriedades químicas dos solos e (2) a diversidade de bactérias cultiváveis isoladas do interior de nódulos radiculares de *A. longifolia*, por técnicas de microbiologia clássica, *DNA fingerprinting* e identificação por sequenciação de genes. Em zonas ardidas, verificou-se um aumento da matéria orgânica, fósforo e azoto nos solos e uma alteração do bacterioma de *A. longifolia* com *Bradyrhizobium sp.* mantendo-se como principal mutualista. Encontrou-se uma menor diversidade, associada a uma maior especificidade para os fixadores de azoto. Estas alterações podem potenciar a invasão de *A. longifolia* após o fogo.

Palavras-chave: Espécies invasoras, *Acacia longifolia*, *Bradyrhizobium*, perturbação de ecossistemas, nodulação.

ABSTRACT

Forest fires cause disruption in ecosystems, with increasing frequency in Mediterranean-type climates. The introduction of exotic species, that could become invasive, such as the genus *Acacia*, has become a challenging issue in Portugal, decreasing local biodiversity and changing soil composition. *Acacia longifolia* is one of the most aggressive invaders and, as a legume, it is able to fix atmospheric nitrogen through symbiotic associations with bacteria inside root nodules, whose functions are so far not understood. In this study, we sampled unburnt and burnt zones, where we studied (1) the impact of forest fires on soil chemical properties, and (2) the diversity of cultivable bacteria inside *A. longifolia* root nodules, through classic microbiology techniques, DNA fingerprinting and identification through gene sequencing. In burnt areas, we found a higher content of soil organic matter, available phosphorus and total nitrogen in soils and a change in the *A. longifolia* bacteriome with *Bradyrhizobium sp.* as the main mutualistic partner. Less diversity was found, with a higher specificity for nitrogen-fixing bacteria. These modifications could trigger an uncontrolled invasion by *A. longifolia* after fire.

Keywords: Invasive species, *Acacia longifolia*, *Bradyrhizobium*, ecosystem disturbance, nodulation.

* O texto deste artigo foi submetido em 04-04-2022, sujeito a revisão por pares a 19-05-2022 e aceite para publicação em 21-09-2022.

Este artigo é parte integrante da Revista *Territorium*, n.º 30 (II), 2023, © Riscos, ISSN: 0872-8941.

Introdução

Os fogos representam um grave problema nas regiões de clima mediterrânico, nas quais se incluem Portugal e a zona envolvente do mar Mediterrâneo, bem como outras regiões do globo, como o sul da Califórnia, centro do Chile e sudoeste da África do Sul e da Austrália. Esta propensão para os fogos resulta de verões secos e quentes (Gams *et al.*, 1993) e da presença de uma vegetação adaptada, detentora de propriedades que a tornam altamente inflamável. Dentro dessas propriedades destacam-se a retenção de material morto e a presença de compostos secundários inflamáveis, incluindo uma grande quantidade de resinas e substâncias voláteis (Correia e Ascensão, 2017). A extensão da área florestal no nosso país com ecossistemas constituídos por florestas com espécies altamente inflamáveis como pinheiros e eucaliptos, frequentemente em plantações mal geridas (ICNF, 2019), traduz-se numa grande suscetibilidade ao fogo. Em verões secos, ou como ocorreu em 2017, a ocorrência de um mês de outubro excepcionalmente quente após um verão muito seco (Turco *et al.*, 2019), criou condições em que as plantas apresentavam um conteúdo hídrico muito baixo, criando uma matriz “combustível-ar” facilitadora do arejamento e da propagação do fogo, desencadeando os fogos catastróficos que afetaram uma área de cerca de 190.000 hectares (ICNF, 2017).

Associados aos fogos florestais, existem problemas além das perdas humanas e materiais, como alterações dos ecossistemas *a posteriori*, resultando na erosão dos solos (Faria *et al.*, 2015), perda de biodiversidade e o crescimento de espécies invasoras que encontram oportunidades na ausência de cobertura vegetal (i.e., competição interespecífica) (Silva e Marchante, 2012). Apesar das espécies vegetais mediterrânicas persistirem após o fogo, o seu crescimento é, na maioria das vezes, mais lento do que o de outras espécies exóticas, e pensa-se que fogos mais frequentes e intensos tenham efeitos graves nas populações de plantas nativas nas regiões mediterrânicas (Bellan, 2016).

Acacia longifolia (Andrews) Willd., também conhecida como acácia-de-espigas, é uma planta nativa da Austrália, tendo sido trazida para Portugal no final do século XIX, para controlo da erosão das dunas costeiras (Yelenik *et al.*, 2007). Trata-se de uma espécie leguminosa de rápido crescimento, capaz de sobreviver em solos muito pobres e que tem ainda a vantagem de enriquecer os solos em azoto que fica disponível para ser absorvido e utilizado por outras espécies vegetais (Ulm *et al.*, 2017), acabando por alterar a dinâmica do ciclo de nutrientes (Marchante *et al.*, 2003). A fixação de azoto atmosférico é feita através de bactérias que se encontram nos nódulos das raízes da planta (hospedeiro), coletivamente designadas de rizóbios (simbiontes). As simbioses que as plantas estabelecem com alguns micro-organismos, como é o

caso das associações acácias-rizóbios, são muitas das vezes tão próximas e dependentes, que se considera a existência de meta-organismos (plantas + micro-organismos), de forma semelhante ao que ocorre com o microbioma coabitante dos nossos intestinos e pele (East, 2013). Nas plantas, o bacterioma tem um papel muito relevante sendo coletivamente designado de PGPB (do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria* ou Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas).

Inicialmente, as acácias foram muito apreciadas pelo seu papel no controlo da erosão bem como pelas suas qualidades ornamentais, resultado da explosão de um amarelo intenso nas copas destas árvores ou arbustos, no período de floração. No entanto, devido à dispersão descontrolada e à colonização de novas áreas, atualmente algumas acácias têm o estatuto de espécies invasoras em diferentes locais do globo, sendo de destacar em Portugal, *A. dealbata*, *A. longifolia* e *A. saligna* (Marchante *et al.*, 2014). Na altura da floração, o grande número de flores produzido origina uma enorme quantidade de semente, que se acumula na folhada e vagens no solo, constituindo um coberto orgânico. Estas sementes podem também ficar enterradas, permanecendo viáveis por vários anos, constituindo um banco de sementes no solo. A quantidade de semente total (enterrada no solo ou presente no coberto orgânico) que *A. longifolia* produz foi avaliada numa média de 1017 sementes.m⁻², conforme reportado por Strydom *et al.* (2017), na África do Sul. Os esforços mecânicos e biológicos para controlar a invasão têm-se revelado infrutíferos devido, sobretudo, à dificuldade de remover de forma efetiva o banco de sementes e à grande viabilidade das mesmas, que podem persistir viáveis até 50 ou mais anos (Milton e Hall, 1981). Esta viabilidade persistente deve-se à existência de um tegumento impermeável que mantém a dormência até que haja um dano mecânico (ex. escarificação) ou um choque térmico, tal como ocorre durante um fogo. O fogo é assim um promotor da germinação das sementes destas espécies (Richardson e Kluge, 2008), levando simultaneamente à perda de viabilidade de sementes de outras *taxa*. Este efeito antagónico do fogo favorece assim duplamente a expansão das acácias após a sua ocorrência. Além disso, a dispersão das sementes é feita maioritariamente por aves ou formigas, havendo evidência que na ausência de fogo, as espécies cujas sementes são dispersas por formigas, como é o caso de *A. longifolia*, acumulam um banco de sementes mais persistente, dada a maior dormência e menor percentagem de germinação e decomposição quando comparadas com as dispersas pelas aves. Assim, após o fogo, ocorre um rápido restabelecimento das populações sem necessidade de intervenção humana. Por último, é importante realçar que o fogo provoca alterações físicas, químicas e biológicas nos solos, dependendo da duração e da intensidade do mesmo (Bento-Gonçalves *et al.*, 2012), tais como i) diminuição no teor de matéria

orgânica, ii) alterações nos ciclos bioquímicos do azoto e do fósforo com o enriquecimento em formas inorgânicas (p.e., amónia e nitratos) e formas disponíveis de fósforo utilizáveis pelas plantas e iii) mudanças na composição e diversidade microbiana do solo (ver Certini, 2005 e referências incluídas). Assim, a rápida e eficaz colonização dos solos por acácias invasoras associada ao seu desenvolvimento acelerado tem um efeito devastador sobre outras plantas, impedindo o estabelecimento e crescimento de outras espécies.

A escolha deste tema prende-se com a emergente presença de espécies exóticas e/ou invasoras altamente adaptadas à regeneração e adaptação pós-fogo, uma perturbação muito frequente no nosso país. As estratégias utilizadas pelas plantas perante estas perturbações são cruciais para melhor compreender os mecanismos de adaptação, a fim de contribuir com conhecimento para uma melhor gestão e implementação de medidas de controlo.

Assim, neste contexto, pretende-se estudar o impacto da ocorrência de fogos florestais no bacterioma de *A. longifolia*, incluindo o impacto do fogo i) nas propriedades químicas do solo e ii) na diversidade e composição bacterianas no interior de nódulos, incluindo os rizóbios e outros géneros bacterianos envolvidos noutros processos. Desta alteração no bacterioma e da presença da acácia, podem resultar também mudanças no ambiente envolvente que pode impactar outras espécies coexistentes.

Metodologia

Descrição dos locais de estudo

A recolha de dados foi realizada em Mira, Aveiro, Portugal (40.52451° N, 8.67253° W; 15 m de altitude), um ano após a ocorrência do fogo de outubro de 2017. Foram selecionadas duas áreas florestais mistas com *Eucalyptus globulus* e *Pinus* spp. invadidas por *A. longifolia*, sendo esta última a espécie dominante e em cada uma delas foram implementadas três parcelas (5x5 m) não ardidas e três ardidas (fot. 1). A região de Mira caracteriza-se pelo

clima mediterrânico com influência atlântica, registando temperaturas médias mínima e máxima de 10,1°C e 20,2°C, respetivamente, e uma precipitação média anual de 904 mm. Nesta zona, os solos têm uma textura maioritariamente arenosa, sendo descritos como regossolos (FAO, 2015). Para estudar a nodulação em *A. longifolia*, foram selecionadas aleatoriamente oito acácias jovens com tamanhos entre 20-60 cm provenientes dos seis locais de amostragem (três ardidos e três não ardidos), escavando-se a zona próxima das plantas jovens para localizar as raízes com os nódulos; estes nódulos foram removidos e armazenados em sílica gel para contagem e caracterização morfológica, tendo sido mantidos no laboratório à temperatura ambiente até posterior utilização.

Análise de solos e análises isotópicas

As amostras para as análises de solos foram recolhidas em profundidade até cerca de 20 cm (i.e., zona envolvente dos nódulos radiculares), constituindo-se uma amostra composta da recolha em três pontos em cada área estudada. Em laboratório, as amostras foram crivadas a 2mm e só a fração inferior foi utilizada. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de solos e Plantas da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), onde foram analisados o teor em matéria orgânica (MO), o fósforo disponível (P_2O_5) e azoto total (N). Considerando que *A. longifolia* é uma espécie leguminosa, aumentando o teor de MO e alterando a dinâmica dos ciclos de fósforo e azoto (Marchante *et al.*, 2003), estes parâmetros foram incluídos nas análises para melhor compreensão das alterações que decorrem após o fogo.

Para as análises isotópicas nas amostras de *A. longifolia*, procedeu-se à secagem em estufa dos nódulos e dos filódios durante 48h a 60°C, sendo depois moídos num pó fino para análise da razão $^{13}C/^{12}C$ e $^{15}N/^{14}N$, esta última determinada para inferir a fixação do azoto. As análises foram realizadas no Laboratório de Isótopos Estáveis (LIE-SIAF) na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa de acordo com procedimento descrito em Jesus *et al.* (2020).



Fot. 1 - Áreas de amostragem não ardidas (a) e ardidas (b e c) estudadas incluídas em florestas mistas com *Acacia longifolia* como espécie dominante (Fotografias de Joana Jesus, tiradas a 1 de outubro de 2018).

Photo 1 - Study areas: unburnt (a) and burnt (b and c); areas sampled were in mixed forest with *Acacia longifolia* as dominant species (Photos by Joana Jesus, taken on 1 of October 2018).

Análise do bacterioma: procedimentos laboratoriais

Os nódulos recolhidos no campo foram reidratados em laboratório para posterior desinfecção e isolamento das bactérias envolvidas na simbiose. Após obtenção de culturas puras, o DNA foi extraído e amplificado por PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), a fim de ser sequenciado para identificação dos géneros isolados (fig. 1). Estes procedimentos serão descritos em detalhe.

Isolamento, cultivo in vitro e caracterização fenotípica de bactérias dos nódulos

Previamente à inoculação em meio de cultura, os nódulos foram reidratados em água destilada durante 12 h, seguindo-se a desinfecção do exterior dos mesmos, para garantir que as bactérias isoladas provinham do interior, de acordo com a metodologia descrita em Jesus *et al.* (2020). Os crescimentos bacterianos foram obtidos em meio YMA (do inglês *Yeast Mannitol Agar*) com cicloheximida 0,01 %, após esmagamento dos nódulos, seguido da inoculação das diluições seriadas (10^0 a 10^{-3}) e incubação a 28 °C durante 12 dias. Após obtenção das culturas puras, foi feita a caracterização fenotípica e bioquímica das mesmas por métodos de microbiologia clássica, incluindo a coloração de Gram, teste do hidróxido de potássio (KOH) e testes da catalase e oxidase, permitindo o agrupamento das colónias de acordo com os resultados obtidos (Cappuccino e Sherman, 1998).

Fingerprinting genético e identificação dos isolados bacterianos por sequenciação da região 16S

O protocolo de extração do DNA genómico baseou-se no protocolo GES modificado (do inglês *Guanidium thiocyanate, EDTA and Sarkosyl*) a partir de colónias com crescimento recente (24 h), conforme descrito por Pitcher (1989). No caso das colónias muito mucosas, foram feitas lavagens prévias em água destilada, seguidas de centrifugação, de modo a remover o excesso de mucilagem, permitindo um rendimento adequado do processo, que se traduz na recuperação de DNA em quantidade suficiente. O DNA foi resuspenso em tampão

TE (Tris-EDTA) e mantido a 4 °C, sendo preparadas soluções de trabalho a 10 ng/μL. O *fingerprinting* molecular foi obtido após amplificação por PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se o *primer* (iniciador) csM13 (5' GAGGGTGGCGTTCT 3') e as condições de amplificação descritas em Jesus *et al.* (2020), seguindo-se a migração das bandas amplificadas em gel de agarose a 1 %.

A identificação das estirpes bacterianas obtidas baseou-se na amplificação de regiões do gene 16S rRNA, a partir dos pares de *primers* PA(8f)-907r e 104f-1392r (Marchesi *et al.*, 1998). As sequenciações foram feitas nos laboratórios StabVida (Costa da Caparica, Portugal) pelo método Sanger.

Análise de Dados

A análise comparativa do teor de MO, fósforo disponível e azoto total entre as áreas florestais mistas com acácia como espécie dominante não ardidas e ardidas (A - F e A + F, respetivamente) foi feita através do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($\alpha < 0.05$), utilizando a *package* stats do *software* R studio (v3.6.1).

Os perfis de bandas dos isolados foram comparados recorrendo ao *software* BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latern, Bélgica), cuja análise resultou num dendrograma composto por *clusters* agrupados por similaridade dos diferentes perfis, permitindo o cálculo dos índices de diversidade Shannon-Wiener e de equitabilidade de Pielou para as comunidades bacterianas obtidas a partir das zonas não ardidas e ardidas.

As sequências das diferentes estirpes bacterianas foram analisadas com o recurso ao *software* Geneious (v5.3, 2010), por alinhamentos entre si e recorrendo à informação disponível na base de dados *GenBank* através da realização do BLAST (do inglês *Basic Local Sequence Alignment Tool*).

Resultados e Discussão

Neste estudo, apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas, foi verificada uma tendência para alterações ao nível das propriedades químicas

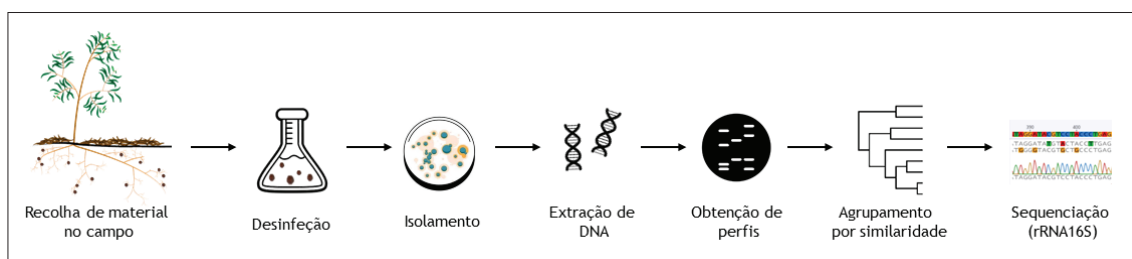


Fig. 1 - Esquema ilustrativo do processo laboratorial após a recolha de material nas áreas de estudo.

Fig. 1 - Schematic figure of the laboratory procedure after samples collection in the field.

do solo nas áreas florestais estudadas, comparando condições não ardidas e ardidas, um ano após o fogo, bem como composição e diversidade da comunidade bacteriana encontrada nos nódulos de *A. longifolia*.

Relativamente às análises de solo, verificou-se que o teor de MO, a quantidade de fósforo disponível (P_2O_5) e o azoto total são superiores nos solos após a ocorrência de fogo, havendo uma tendência para uma maior quantidade de fósforo e de azoto comparativamente à matéria orgânica (fig. 2). De facto, todo o coberto vegetal arde, e mesmo que o ecossistema perturbado inclua espécies adaptadas aos fogos na sua diversidade específica, estas vão apresentar um crescimento mais lento comparativamente às acácias. Há estudos que mostram que as sementes de acácia, acumuladas no solo, germinam rapidamente e em grande quantidade após o fogo (Strydom *et al.*, 2017). Nestas condições, ocorrendo a ausência de competição interespecífica e havendo esta estimulação da germinação, o estabelecimento e a expansão da acácia são facilitados, potenciando assim a invasão. Além disto, apesar das diferenças não serem significativas, observou-se um maior teor de MO na zona ardida. Considerando que a amostragem foi feita um ano após o fogo, e sabendo que a presença de espécies fixadoras de azoto (como é o caso de *A. longifolia*) aumentam significativamente o sequestro de carbono no solo (Johnson e Curtis, 2001), o aumento no teor de MO observado pode ser resultado da rápida colonização e presença desta espécie. Simultaneamente, as plantas jovens resultantes deste *boom* de germinação poderão beneficiar do aumento das formas inorgânicas de azoto e fósforo disponíveis (como descrito em Certini (2005), potenciando o seu desenvolvimento.

De facto, *A. longifolia* é uma espécie exótica invasora e este estatuto pode prender-se com a capacidade que a acácia tem de estabelecer relações de simbiose que tiram partido da comunidade bacteriana da rizosfera. A grande vantagem destas relações mutualistas é o *timing* de restabelecimento que ocorre após o fogo, já que a nodulação parece ser um processo mais rápido, estando presente nas raízes de acácias muito jovens (observadas no campo em plantas com 5-10 cm); estes processos parecem ter um papel determinante na regeneração pós-fogo, já que um dos efeitos desta perturbação é a quebra das interações planta-solo-microbiota (Kulmatiski e Kardol, 2008).

O estabelecimento destas relações mutualistas permite ultrapassar condições adversas, potenciando o sucesso pós-fogo, uma vez que as mesmas parecem ser promotoras de uma *fitness* aumentada nestas condições. Além disso, apesar de, como referido anteriormente, no ambiente pós-fogo ocorrer uma expansão massiva de acácias potenciando a invasão, o seu sucesso regenerativo e o sucesso no restabelecimento de simbioses, permitem o enriquecimento do solo em fontes de azoto utilizáveis por outras plantas (como já observado por Ulm *et al.*, 2017), o que poderá facilitar o desenvolvimento e aumentar o vigor vegetativo de outras espécies. Desta forma, a disponibilização de azoto em ecossistemas mais pobres por estas leguminosas e que levou à sua introdução em muitas partes do mundo, poderia ser um fator facilitador da regeneração de um ecossistema perturbado (i.e., ardido); no entanto, a abundância do banco de sementes parece dificultar o estabelecimento das outras espécies de crescimento mais lento, comprometendo a biodiversidade local.

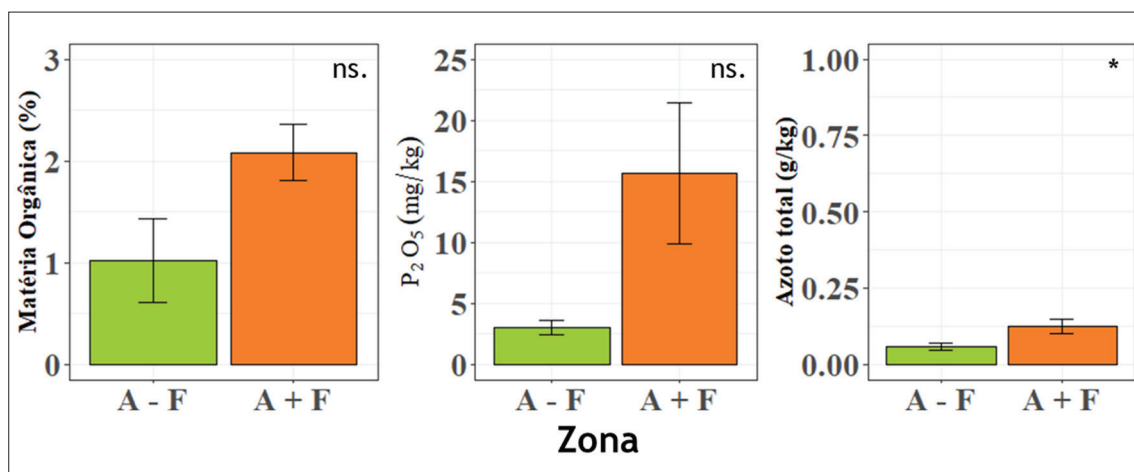


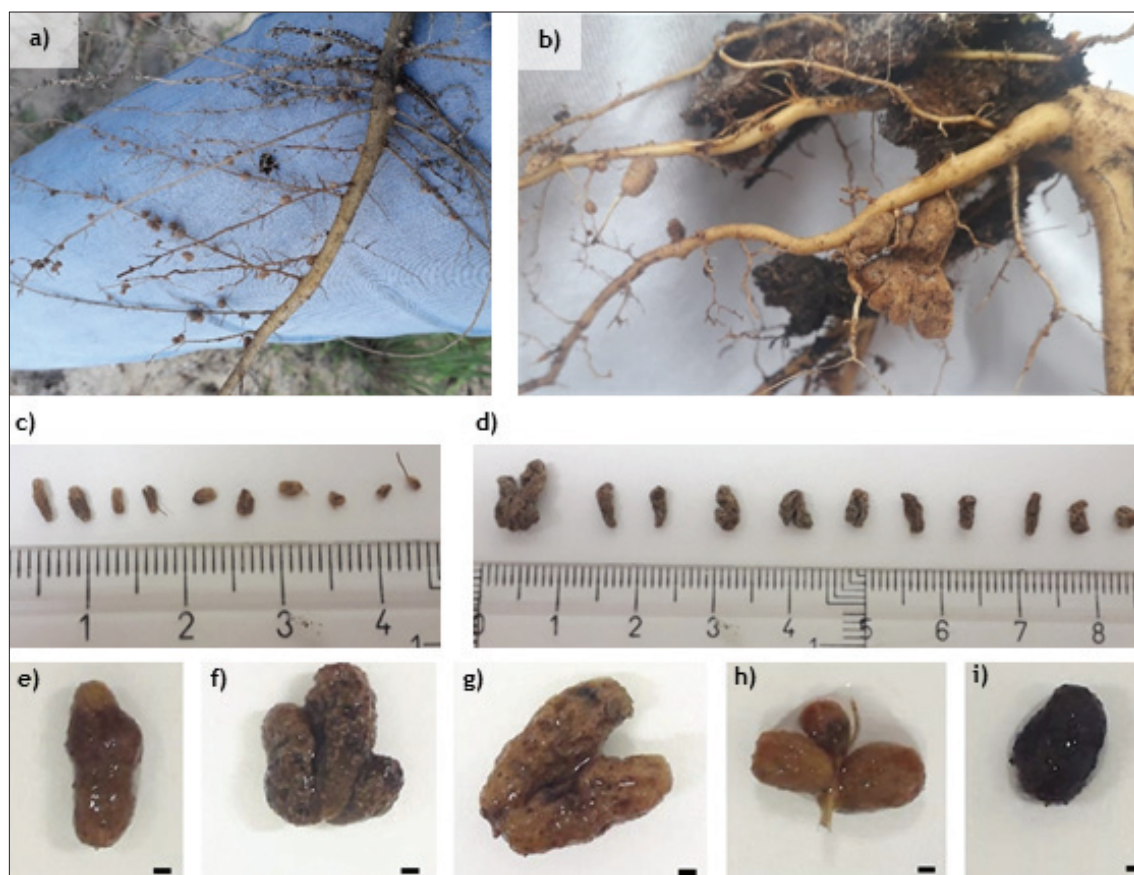
Fig. 2 - Comparação da matéria orgânica (%), fósforo disponível (mg/kg) e azoto total (g/kg) (média \pm se) em florestas mistas com *Acacia longifolia* como espécie dominante não ardidas (A - F) e ardidas (A + F). A ausência e presença de diferenças significativas está representada por "ns." e "*" respetivamente testada através do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($\alpha < 0,05$).

Fig. 2 - Comparison of soil organic matter (%), available phosphorus (mg/kg) and total nitrogen (g/kg) (mean \pm se) in mixed forests with *Acacia longifolia* as dominant species unburnt (A - F) and burnt (A + F). Absence and presence of statistically significant differences are identified with "ns." and "*" tested through Wilcoxon-Mann-Whitney test ($\alpha < 0,05$).

Relativamente à nodulação, neste estudo, não foram observadas diferenças na morfologia e tamanho dos 579 nódulos recolhidos de ambas as zonas estudadas (fot. 2). Observou-se um maior número de nódulos por planta na zona ardida comparativamente com a zona não ardida (14,0 e 10,1 nódulos em média por planta, respetivamente), apesar destas diferenças não serem estatisticamente significativas. Esta observação parece indicar uma maior nodulação em ambiente pós-fogo a fim de facilitar o estabelecimento e desenvolvimento das plantas de acácias jovens, o que permitirá, por consequência, uma maior disponibilidade de azoto fixado no solo, o que é corroborado pelos resultados de solo apresentados (ver fig. 2).

A funcionalidade dos nódulos pode ser inferida através da assinatura isotópica do azoto nos filódios, conforme descrito em trabalhos prévios com outras leguminosas, *Stauracanthus spectabilis*, *Ulex europaeus* and *Cytisus grandiflorus* (Rodríguez-Echeverría *et al.*, 2009; Hellmann *et al.*, 2011; Rascher *et al.*, 2012). Os valores próximos de 0 ‰ da assinatura isotópica de

azoto nos filódios ($\delta^{15}\text{N}$) em ambas as zonas (-1,0 ‰ para as zonas não ardidas e 0,8 ‰ para as zonas ardidas) corroboram a ocorrência de fixação de azoto atmosférico através da presença de rizóbios (ou Bactérias Fixadoras de Azoto) presentes nos nódulos e estão também de acordo com os estudos de Godfrey e Glass (2011) que referem que valores de $\delta^{15}\text{N}$ em folhas entre -2 ‰ e 2 ‰ evidenciam a ocorrência de fixação biológica de azoto. No entanto, apesar deste processo de fixação de azoto ocorrer nos nódulos, a assinatura isotópica determinada para estas estruturas variou entre 7,4 ‰ e 7,9 ‰, para as zonas ardidas e não ardidas, respetivamente (como mostrado em Jesus *et al.*, 2020). Estes valores muito positivos parecem corroborar a hipótese de que o azoto fixado não é acumulado nos nódulos, mas sim mobilizado para as componentes aéreas da planta (*viz* filódios) como esperado. De facto, durante o crescimento da parte aérea, há naturalmente um grande aumento do número de filódios, com concomitante aumento do número de células, proteínas e ácidos nucleicos totais, moléculas estas com um elevado conteúdo azotado, beneficiando



Fot. 2 - Nódulos recolhidos de raízes de *Acacia longifolia* (a e b) de plantas jovens crescidas em zonas não ardidas (c) e ardidas (d) e diferentes morfologias encontradas em ambas as zonas (e-i). A barra de escala das alíneas e) a i) corresponde a 1 mm (Fotografias de Joana Jesus, tiradas a 8 de outubro de 2018).

Photo 2 - Nodules collected from *Acacia longifolia* roots (a and b) from young plants collected in unburnt (c) and burnt (d) zones and the different morphologies found in both zones (e-i). Scale bar from e) to i) corresponds to 1 mm (Photos by Joana Jesus, taken on 8 October 2018).

deste azoto fixado disponibilizado pela simbiose. Já os nódulos, são estruturas diferenciadas nas raízes, que servem de “abrigo” para as bactérias, contudo não se observa um crescimento ativo dos mesmos associado ao desenvolvimento das plantas. Ainda relativamente à análise isotópica realizada para o carbono, a análise do $\delta^{13}\text{C}$ revelou valores semelhantes para os filódios de plantas jovens crescidas nas zonas não ardidas e ardidas, variando entre -28,8 ‰ e -30,2 ‰, o que está de acordo com os estudos de Ehleringer (1988) e Boutton (1991), estando estes valores relacionados com o fracionamento que ocorre durante a fotossíntese, devido à presença da RUBISCO (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase).

No que diz respeito à diversidade dos isolados bacterianos obtidos, o índice de Shannon-Wiener mostrou que existe maior diversidade correspondendo a $H' = 1,0$ nas zonas não ardidas comparativamente a $H' = 0,74$ para as zonas ardidas, o que pode indicar uma menor diversidade bacteriana após o fogo. No entanto, a grande diversidade observada (fig. 3) confirma que as acácias são espécies promíscuas no que diz respeito ao recrutamento dos seus parceiros de simbiose (Thrall *et al.*, 2005), estando presentes os mesmos grupos bacterianos nas duas zonas. Estes valores revelam que, apesar da menor diversidade bacteriana após os fogos florestais, a capacidade de recuperação de *A. longifolia* não parece ser impactada negativamente. De notar que o índice de equabilidade de Pielou revelou que em ambas as zonas existem isolados dominantes ($J' = 0,75$ para a zona não ardida e

$J' = 0,67$ para a zona ardida). De facto, nas nossas áreas amostradas, o género *Bradyrhizobium* foi o grupo de isolados mais comum na regeneração sem fogo e pós-fogo (Jesus *et al.*, 2020), sendo também o género de simbiontes mais comum tanto em zonas nativas como não nativas (Rodríguez-Echeverría, 2010). As espécies deste género são fixadoras de azoto, e a sua presença como género dominante pode potenciar a melhor *fitness* das acácias.

Em ambas as zonas, o bacterioma cultivável incluiu bactérias das classes α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Baccili e Actinobacteria, corroborando que *A. longifolia* é uma espécie mutualista generalista. Nas zonas ardidas, dentro das α -Proteobacteria, apenas se identificou o género *Bradyrhizobium*, não se identificando *Althererythrobacter* sp., *Paracoccus* sp. e *Rhizobium* sp., sugerindo uma maior especificidade da simbiose após o fogo, para este parceiro preferencial. De facto, embora seja difícil fazer previsões sobre a produtividade vegetal associada à diversidade de rizóbios presentes, Barrett *et al.* (2015) refere que a presença de múltiplos rizóbios na rizosfera das acácias pode contribuir para o decréscimo na produtividade em comparação com situações em que o parceiro simbiote é de uma única espécie. Esta hipótese pode dever-se ao facto de alguns rizóbios fixarem o azoto a níveis sub-ótimos ou terem mesmo perdido a capacidade de fixação de azoto. Desta forma, a diversidade aumentada de mutualistas pode não refletir um efeito positivo no

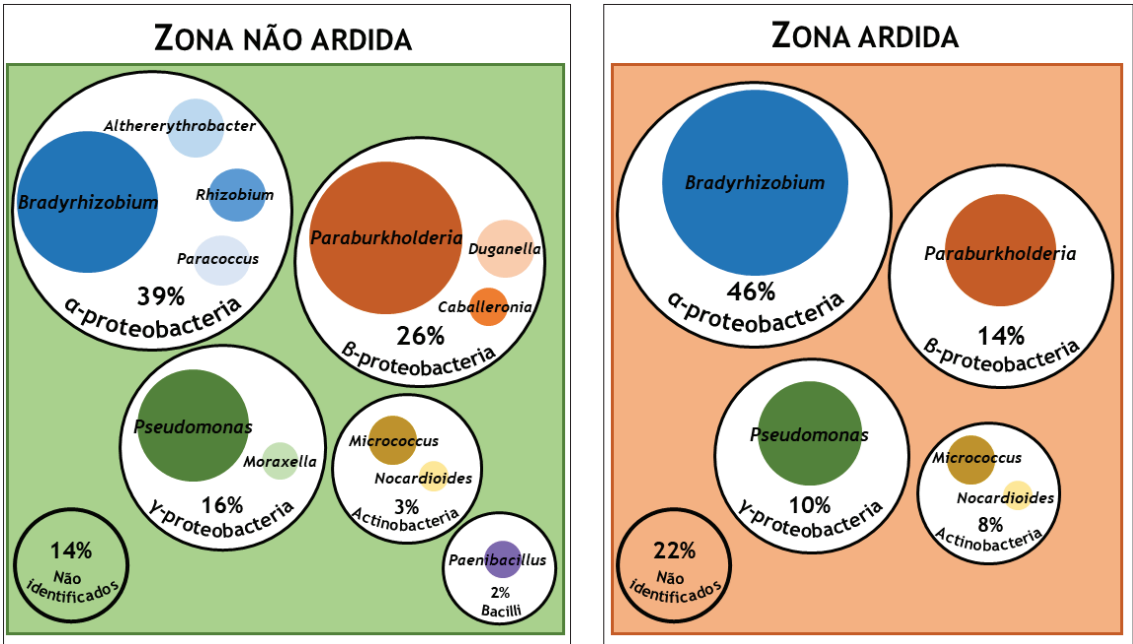


Fig. 3 - Diversidade de géneros bacterianos presente no interior de nódulos de *Acacia longifolia* crescidas em zonas não ardidas e ardidas amostradas. As diferentes cores representam as diferentes classes e os respetivos géneros isolados e foi considerada a sua representatividade (%).

Fig. 3 - Diversity of bacterial genera present inside *Acacia longifolia* root nodules from unburnt and burnt zones. Different colours represent different classes and genera isolated, considering their representativeness (%).

crescimento das plantas. Por outro lado, a diversidade funcional no interior dos nódulos pode transpor a fixação de azoto, uma vez que *Paraburkholderia* spp. e *Pseudomonas* spp., identificados nesta simbiose, já foram descritos como PGPB, induzindo a nodulação, apresentando assim semelhanças com os rizóbios (Shiraishi *et al.*, 2010) e estando presentes em ambas as condições estudadas. Adicionalmente, Saïdi *et al.* (2013) mostraram ainda que *Pseudomonas* spp. podem facilitar a solubilização do fósforo e a produção de sideróforos, facilitando a captação de ferro ou de outros metais. O género *Micrococcus*, também presente de entre os isolados em ambas as zonas estudadas, foi identificado como um micro-organismo promotor do desenvolvimento das plantas (Martínez-Hidalgo e Hirsch, 2017). A complexidade dos mecanismos ecológicos juntamente com a diversidade funcional associada à nodulação dificulta a interpretação destas interações planta-bacterioma e corrobora a necessidade de desenvolver estudos focados nesta multifuncionalidade no interior dos nódulos.

O facto de *Bradyrhizobium* sp. ser o género dominante nas zonas não ardida e ardida indica que *A. longifolia* beneficia do processo de fixação de azoto, tendo uma vantagem acrescida sobre as restantes espécies vegetais. Isto parece corroborar então que, mesmo após o fogo, a capacidade de fixar azoto e de consequentemente enriquecer o solo com este nutriente tão importante para as plantas, pode ser facilitador do desenvolvimento de outras espécies. No entanto, o rápido crescimento de *A. longifolia* impossibilita o desenvolvimento de outras plantas, sendo este uma das principais ameaças à biodiversidade local dos ecossistemas invadidos e a razão que despoleta a necessidade de encontrar medidas de controlo eficazes.

Conclusão

O fogo parece ter um papel determinante no comportamento de *A. longifolia*, uma espécie exótica invasora, nas áreas estudadas. As alterações no solo resultantes do fogo e da presença desta espécie parecem criar condições mais favoráveis ao seu estabelecimento e desenvolvimento. O bacterioma presente nos nódulos de acácia parece ser influenciado pelo fogo, havendo uma maior especificidade para a fixação de azoto em áreas aridas, podendo estes fixadores ser caracterizados como os primeiros colonizadores no restabelecimento da simbiose. Assim, a acácia é uma espécie mutualista generalista, apresentando uma grande promiscuidade em ecossistemas invadidos, sendo capaz de tirar partido da diversidade funcional da rizosfera dos solos. Considerando a problemática das espécies exóticas invasoras, o maior conhecimento do seu comportamento, especialmente após o fogo que potencia a sua dispersão, é crucial para a tomada de decisão mais

informada de implementação de medidas de gestão e controlo. Estudos futuros poderão focar-se, por um lado, na multifuncionalidade do bacterioma dos nódulos para melhor compreender esta rápida capacidade de adaptação e dispersão e, por outro lado, na transformação dos solos resultante da presença desta espécie a longo prazo, a fim de compreender a dinâmica de interação planta-solo, contribuindo para a reabilitação dos ecossistemas.

Agradecimentos

Este trabalho de Investigação foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal), FCT/MCTES, através do apoio financeiro ao Centro de Ecologia, Evolução e Alterações Ambientais (cE3c) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FC-UL), Bolsa de Unidade de Investigação número UIDB/00329/2020 e também do Projeto R3forest - Using exotic biomass for post-fire recovery: reuse, regenerate and reforest (PCIF/GVB/0202/2017).

Agradecemos cordialmente à colega Andreia Anjos pela ajuda imprescindível no trabalho de campo e na revisão deste artigo.

Referências bibliográficas

- Barrett, L. G., Bever, J. D., Bissett, A. & Thrall, P.H. (2015). Partner diversity and identity impacts on plant productivity in Acacia-rhizobial interactions. *Journal of Ecology*, 103: 130-142.
DOI: <http://www.jstor.org/stable/24542192>
- Bellan, E. (2016). *JRC Annual Report*, EUR 28435 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2017, ISBN 978-92-79-65348-3.
DOI: <https://doi.org/10.2760/094558>
- Bento-Gonçalves, A., Vieira, A., Úbeda, X. Martin, D. (2012). Fire and soils. Key concepts and recent advances. *Geoderma*, 191: 3-13.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.01.004>
- Boutton, T. W. (1991). Stable carbon isotope ratios of natural materials. II. In: Coleman, D.C. & Fry, B. (eds) *Carbon isotope techniques*. Academic Press: San Diego, 173-185. Disponível em: http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:24010391
- Cappuccino, J. & Sherman, N. (1998). *Microbiology, A Laboratory Manual*, 5th Edition, Experiment 2, Techniques for Isolation of Pure Cultures, p. 16.
- Certini, G. (2005). Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia*, 143: 1-10.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1788-8>
- Correia, O. & Ascensão, L. (2017). Summer semi-deciduous species of the Mediterranean landscape:

- a winning strategy of *Cistus* species to face the predicted changes of the Mediterranean climate. In: Ansari, A. A., Gill, S. S., Abbas, Z. K. & Naeem, M. CAB International, *Plant Biodiversity: Monitoring, Assessment and Conservation*. DOI: <https://doi.org/10.1079/9781780646947.0195>
- East, R. (2013). Soil science comes to life. *Nature* 501(7468): S18-9. DOI: <https://doi.org/10.1038/501S18a>
- Ehleringer, J. R. (1988). Carbon isotope ratios and physiological processes in aridland plants. In: Rundel, P. W., Ehleringer, J. R. & Nagy, K.A. (eds) *Stable isotopes in ecological research*. Springer, Berlin, New York, 41-54. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3498-2_3
- FAO (2015) Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Soils Portal - World Reference Base. Consultado em setembro de 2022.
- Faria, S. R., De la Rosa, J. M., Knicker, H., González-Pérez, J. A. & Keizer, J. J. (2015). Molecular characterization of wildfire impacts on organic matter in eroded sediments and top soil in Mediterranean eucalypt stands. *Catena*, 135: 29-37; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.catena.2015.07.007>
- Gams, I., Nicod, J., Julian, M., Anthony, E. & Sauro, U. (1993). Environmental Change and Human Impacts on the Mediterranean Karsts of France, Italy and the Dinaric Region. *Catena Supplement*, 25: 59-58. DOI: <http://geoprodig.cnrs.fr/items/show/85514>
- Geneious v5.3. (2010). Available online: <http://www.geneious.com> (accessed on 3 April 2019).
- Godfrey, L. & Glass, J. (2011). The geochemical record of the ancient nitrogen cycle, nitrogen isotopes, and metal cofactors (chapter two), *Parts on Nitrification and Related Processes in Methods in Enzymology*, 486: 483-506. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381294-0.00022-5>
- Hellmann, C., Sutter, R., Rascher, K. G., Máguas, C., Correia, O. & Werner, C. (2011) Impact of an exotic N₂-fixing *Acacia* on composition and N status of a native Mediterranean community. *Acta Oecologica*, 37:43-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actao.2010.11.005>
- ICNF - INSTITUTO DA CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E DAS FLORESTAS (2017). 10º Relatório Provisório de Incêndios Florestais. Departamento de Gestão de Áreas Públicas e de Proteção Florestal, RIF102017.
- ICNF - INSTITUTO DA CONSERVAÇÃO DA NATUREZA E DAS FLORESTAS (2019). Inventário Florestal Nacional 6 (IFN6-ICNF).
- Jesus, J. G., Tenreiro, R., Máguas, C. & Trindade, H. (2020). *Acacia longifolia*: A Host of Many Guests Even after Fire. *Diversity*, 12: 250. DOI: <https://doi.org/10.3390/d12060250>
- Johnson, D. W. & Curtis, P. S. (2001). Effects of forest management on soil C and N storage: meta-analysis. *Forest Ecology and Management*, 140: 227-238. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00282-6](http://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00282-6)
- Kulmatiski, A. & Kardol, P. (2008). Getting plant-soil feedbacks out of the greenhouse: experimental and conceptual approaches. *Progress in Botany*, 69: 449-472. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-72954-9_18
- Marchante, H., Marchante, E. & Freitas, H. (2003). Invasion of the Portuguese dune ecosystems by the exotic species *Acacia longifolia* (Andrews) Willd.: effects at the community level. *Plant invasions: ecological threats and management solutions*, 75-85.
- Marchante, H., Morais, M., Freitas, H. & Marchante, E. (2014) *Guia prático para a identificação de Plantas Invasoras em Portugal*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra. DOI: <http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0786-3>
- Marchesi, J., Sato, T., Weightman, A., Martin, T., Fry, J., Him, S. & Wade, W. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 795-799. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.795-799.1998>
- Martinez-Hidalgo, P. & Hirsch, A. (2017). The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes*, 1: 70-82. DOI: <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-16-0019-RVV>
- Milton, S. J. & Hall, A. V. (1981). Reproductive biology of Australian acacias in the south-western Cape Province, South Africa. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 44: 465-485. DOI: <https://doi.org/10.1080/00359198109520589>
- Pitcher, D., Saunders, N. & Owen, R. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8: 151-156. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
- Rascher, K., Hellman, C., Máguas, C. & Werner, C. (2012). Community scale ¹⁵N isoscapes: Tracing the spatial impact of an exotic N₂-fixing. *Ecology Letters*, 15: 484-491. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01761.x>
- Richardson, D. M. & Kluge, R. L. (2008). Seed banks of invasive Australian *Acacia* species in South Africa: Roles in invasiveness and options for management. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematic*, 10: 161-177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2008.03.001>
- Rodríguez-Echeverría, S., Crisóstomo, J. A., Nabais, C. & Freitas, H. (2009). Belowground mutualists and the

- invasive ability of *Acacia longifolia* in coastal dunes of Portugal. *Biological Invasions*, 11:651-661.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10530-008-9280-8>
- Rodríguez-Echeverría, S. (2010). Rhizobial hitchhikers from Down Under: invasional meltdown in a plant-bacteria mutualism? *Journal of Biogeography*, 37: 1611-1622.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02284.x>
- Saïdi, S., Chebil, S., Gtari, M. & Mhamdi, R. (2013) Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29: 1099-1106.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1278-4>
- Shiraishi, A., Matsushita, N. & Hougetsu, T. (2010) Nodulation in black locust by the γ -proteobacteria *Pseudomonas* sp. and the β -proteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology*, 33: 269-274.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.04.005>
- Silva, J. S. & Marchante, H. (2012). Post-fire management of exotic forests. In: Moreira, F., Heras, J., Corona, P. & Arianoutsou, M. (Eds.), *Post-Fire Management and Restoration of Southern European Forests*. Springer, Dordrecht, 223-255.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-2208-8_10
- Strydom, M., Veldtman, R., Ngwenya, M. Z. & Esler, K. J. (2017). Invasive Australian *Acacia* seed banks: Size and relationship with stem diameter in the presence of gall-forming biological control agents. *PLoS ONE*, 12: e0181763.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181763>
- Thrall, P. H., Millsom, D. A., Jeavons, A. C., Waayers, M., Harvey, G. R., Bagnall, D. J. & Brockwell, J. (2005). Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances revegetation success. *Journal of Applied Ecology*, 42: 740-751.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.01058.x>
- Turco, M., Jerez, S., Augusto, S., Tarín-Carrasco, P., Ratola, N., Jiménez-Guerrero, P. & Trigo, R. M. (2019). Climate drivers of the 2017 devastating fires in Portugal. *Scientific Reports*, 9: 13886.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50281-2>
- Ulm, F., Gouveia, C., Dias, T. & Cruz, C. (2017). N fertilization in a Mediterranean ecosystem alters N and P turnover in soil roots and the ectomycorrhizal community. *Soil Biology and Biochemistry*, 11: 60-70.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.05.028>
- Yelenik, S., Stock, W. & Richardson, D. (2007). Functional group identity does not predict invader impacts: differential effects of nitrogen-fixing exotic plants on ecosystem function. *Biological Invasions*, 9: 117-125.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10530-006-0008-3>