



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Shantau Camargo Gomes Stoffel

Título: Inoculante micorrízico à base de *Rhizophagus intraradices* na colonização micorrízica e rendimento do milho.

Florianópolis

2023

Shantau Camargo Gomes Stoffel

Título: Inoculante micorrízico à base de *Rhizophagus intraradices* na colonização micorrízica e rendimento do milho.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Roberto Fonseca Sousa Soares

Coorientador: Prof. Dr. Admir José Giachini

Florianópolis

2023

Stoffel, Shantau Camargo Gomes

Inoculante micorrízico à base de *Rhizophagus intraradices* na colonização micorrízica e rendimento do milho. / Shantau Camargo Gomes Stoffel ; orientador, Claudio Roberto Fonsica Sousa Soares, coorientador, Admir Jose Giachini, 2023.

108 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Fertilizantes Fosfatados. 3. Micorriza Arbuscular. 4. Eficiência de Fertilizantes. 5. Rootella BR. I. Soares, Claudio Roberto Fonsica Sousa. II. Giachini, Admir Jose. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Shantau Camargo Gomes Stoffel

Título: Inoculante micorrízico à base de *Rhizophagus intraradices* na colonização micorrízica e rendimento do milho

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 31 de maio de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. José Oswaldo de Siqueira, Dr.

Universidade Federal de Lavras

Prof. Gustavo Brunetto, Dr.

Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Paulo Emílio Lovato, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Ciências.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Claudio Roberto Fonseca Sousa Soares, Dr. Orientador

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho ao meu leal e espirituoso
companheiro Willian, que generosamente
contribuiu de infinitas formas tornando o
processo leve e divertido.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Claudio R. F. S. Soares pelos onze anos de orientação, ensinando muito durante essa caminhada, agradeço por sua infinita paciência e amizade.

Ao meu coorientador professor Admir J. Giachini, tão importante na minha trajetória pela UFSC, abrindo portas profissionais e que também se tornou um grande amigo.

Aos meus pais, por todo amor dedicado a mim e por serem meus principais exemplos de gentileza, dedicação e educação com tudo e com todos.

Ao meu fiel escudeiro e companheiro de vida Willian A. Suguino, que me apoia desde as primeiras experiências científicas na bancada, e me incentiva a progredir sempre. Obrigada por investir em mim seu amor, carinho e atenção. Com sua companhia e humor sagaz essa jornada foi muito mais feliz.

Agradeço aos meus irmãos, tios, primos e avós que mesmo alguns de longe, sempre se fizeram presentes comemorando as minhas conquistas. Em especial a minha pequena irmã Isadora “Dorinha”, que se mostrou uma excelente mini cientista participando inclusive de algumas etapas deste trabalho.

Agradeço ao meu grande amigo “pra lá de década” Ednilson Meyer, colega e profissional excepcional, sem o qual este projeto não teria saído do papel. A vida é muito melhor quando compartilhada com amigos como você!

Aos professores Márcio, Rubens e Lovato e aos meus queridos estagiários, que diretamente colaboraram com este projeto seja “na bancada” ou com palavras de incentivo.

Agradeço aos colegas do NEPEA – UFSC, os quais não ousaria citar nomes para não esquecer nenhuma das pessoas incríveis que “lá habitam”. O que aprendi com vocês fará parte de mim para sempre!

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UFSC pela oportunidade de realizar meu doutorado em um programa de excelência.

Ao Pedro, Dydys, Muka, e Barreto por toda amizade, encontros divertidos e incentivo.

Aos meus colegas do Floripa Ichiban Softball e Baseball, pois não sei o que seria da minha vida sem os amigos que esse esporte me apresentou e experiências que proporcionou. Resistimos a pandemia amigos!!!

Reservo aqui um espaço especial para a minha “cachorrinha” Nala. A “Popotossaura Leishmodel” que entrou na minha vida produzindo um turbilhão de emoções, mas muitas alegrias. Meus dias e noites escrevendo esse documento foram muito mais leves com você dormindo do meu lado.

Agradeço a toda equipe da NovaTero BioAg. pela parceria neste e em muitos outros trabalhos desenvolvidos desde o ano de 2018.

Aos laboratórios LAMEB, REMA e Laboratório de Solos da UFSC por disponibilizarem espaço e equipamentos primordiais para o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos órgãos CAPES e FAPESC, fontes financiadoras para a realização deste projeto.

*“Nada na vida deve ser temido, somente
compreendido. Agora é hora de compreender
mais para temer menos”*

Marie Curie

RESUMO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam associações com mais de 80 % das espécies de plantas terrestres, com registros do estabelecimento há mais de 450 milhões de anos. Os FMA colonizam as raízes lançando suas hifas no solo, formando uma rede de micélio que atua como uma extensão do sistema radicular. Entre os benefícios da associação estão a maior absorção de nutrientes e água, resistência a estresses e estímulo da atividade do solo. Inoculantes buscam unir isolados de FMA que entreguem aos produtores os benefícios da associação em formulações que viabilizem a prática de inoculação a campo. Conhecer o potencial infectivo, a velocidade do estabelecimento da colonização micorrízica arbuscular, o efeito do seu crescimento na produtividade e o efeito da associação nos atributos químicos e biológicos do solo destes inoculantes é importante para definir estratégias de manejo que promovam a colonização e estimulem os benefícios da associação. Para isso, dois estudos divididos em capítulos foram realizados, onde o primeiro avaliou o percentual e a velocidade do estabelecimento da colonização micorrízica de um inoculante comercial à base de *Rhizophagus intraradices* nos estágios iniciais de crescimento do milho (6, 9, 13, 18, 23 e 26 dias após a emergência – DAE). O segundo capítulo avaliou os efeitos da aplicação do inoculante a campo combinado com fontes de P de diferentes solubilidades (superfosfato simples, superfosfato triplo, fosfato natural, e um tratamento sem adubação fosfatada) na produtividade de milho e na absorção e disponibilização de P, no efeito residual de P e atributos químicos e biológicos do solo. No experimento a campo foram realizados dois ciclos de cultivo nas mesmas parcelas, porém no segundo ano não foram realizadas novas adubações fosfatadas. No primeiro experimento constatou-se que a colonização se inicia entre 9 e 13 DAE e aos 26 DAE a colonização média foi de 16,3 %. Não foram observados efeitos da inoculação nas variáveis biomassa, glomalina total e facilmente extraível no período e condições avaliadas. No experimento a campo (segundo capítulo), os teores de P no solo variaram em função da inoculação e dos tratamentos de P no início do primeiro ciclo e ao final do segundo. A atividade da β -glucosidase variou em função da inoculação e do efeito residual dos adubos fosfatados ao final do segundo ciclo. Conclui-se que o inoculante à base de *R. intraradices* apresenta potencial para rápida colonização e que a produtividade das plantas respondeu positivamente à inoculação no primeiro ciclo de cultivo, independente da adubação fosfatada. No segundo ciclo, as plantas inoculadas responderam de maneira diferente ao efeito residual dos adubos fosfatados.

Palavras-chave: eficiência de fertilizantes; micorrizas arbusculares; fosfato natural; Rootella BR.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) form associations with more than 80% of terrestrial plant species, with records dating back more than 450 million years. AMF colonize roots by releasing their hyphae into the soil, forming a mycelium network that acts as an extension of the root system. Among the benefits of the association are greater absorption of nutrients and water, stress resistance and soil activity stimulation. Inoculants aim to group AMF isolates that deliver the benefits of association to producers in easy-to-use formulations. Knowing the infective potential, the rate of establishment of arbuscular mycorrhizal colonization, the effect of their growth on productivity and the effect of the association on the chemical and biological soil attributes of these inoculants is important to define management strategies that promote colonization and stimulate its benefits. For this, two studies divided into chapters were carried out, the first evaluated the percentage and rate of establishment of mycorrhizal colonization of a commercial inoculant based on *Rhizophagus intraradices* in the initial stages of corn growth (6, 9, 13, 18, 23 and 26 days after emergence - DAE). The second chapter evaluated the effects of field application of the inoculant combined with P sources of different solubilities (simple superphosphate, triple superphosphate, natural phosphate, and a treatment without phosphate fertilization) on corn yield and on the uptake and availability of P, in the residual effect of P and chemical and biological attributes of the soil. In the field experiment, two cultivation cycles were carried out in the same plots, but in the second year no new phosphorus fertilization was carried out. In the first experiment, it was found that colonization starts between 9 and 13 DAE and at 26 DAE the average colonization was 16.3%. No inoculation effects were observed on the variables biomass, total and easily extractable glomalin in the period and conditions evaluated. In the field experiment (second chapter), P levels in the soil varied as a function of inoculation and P treatments at the beginning of the first cycle and at the end of the second. β -glucosidase activity varied as a function of inoculation and the residual effect of phosphate fertilizers at the end of the second cycle. It is concluded that the inoculant based on *R. intraradices* has the potential for rapid colonization and that the corn yield responded positively to the inoculation in the first cycle of cultivation, regardless of the phosphate fertilization. In the second cycle, the inoculated plants responded differently to the residual effect of phosphate fertilizers.

Keywords: fertilizer efficiency; arbuscular mycorrhizae; natural phosphate; Rootella BR.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	2
2. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Dinâmica de P no solo	6
3.2. Fertilização fosfatada	11
3.3. Magnitude do efeito residual de fertilizantes	14
3.4. Milho (<i>Zea mays</i> L.) e práticas de cultivo	15
3.5. Microrganismos e atividade enzimática do solo	17
3.6. Fungos micorrízicos arbusculares	18
3.7. Efeito da espécie <i>Rhizophagus intraradices</i> no desenvolvimento do milho ...	23
3.8. Referências bibliográficas	24
4. HIPÓTESES	37
5. OBJETIVOS	38
5.1. Objetivo geral	38
5.2. Objetivos específicos	38
6. CAPÍTULO 1. Estabelecimento da colonização micorrízica de <i>Rhizophagus intraradices</i> em milho	39
6.1. Resumo	39
6.2. Introdução	40
6.3. Material e Métodos	43
6.4. Resultados	47
6.5. Discussão	48
6.6. Conclusões	55
6.7. Referências bibliográficas	55
7. CAPÍTULO 2. Efeitos da aplicação do inoculante micorrízico à base de <i>Rhizophagus intraradices</i> e adubos fosfatados sobre a produtividade do milho e atributos biológicos do solo	61
Resumo	61
7.1. Introdução	62
7.2. Material e Métodos	65
7.2.1. Área experimental	65

7.2.2. Delineamento experimental	66
7.2.3. Insumos	67
7.2.4. Avaliações.....	69
7.2.5. Tratamento estatístico e análise dos resultados	71
7.3. Resultados.....	71
7.4. Discussão	75
7.5. Conclusões	85
7.6. Referências bibliográficas.....	86
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
9. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	95
10. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	96

1. APRESENTAÇÃO

Os projetos de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos (LAMPB) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) iniciaram em 2010 com o objetivo de construir uma coleção de microrganismos, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) isolados de áreas degradadas e agrícolas que pudessem ser utilizados em projetos de revegetação. Em uma primeira triagem, o grupo de pesquisa do LAMPB avaliou a ocorrência de FMA em áreas degradadas pela mineração de carvão no Sul de Santa Catarina no ano 2010 e seis isolados de FMA foram adicionados à coleção do laboratório (dados não publicados). Destes isolados, alguns foram testados em mudas de leguminosas arbóreas no trabalho de Stoffel *et al.* (2016) onde a inoculação promoveu acréscimos na produção de biomassa e na absorção de fósforo. Outro estudo com estes isolados foi conduzido por Meyer *et al.* (2016), onde a inoculação de alguns destes isolados de FMA em vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) também aumentou a produção de biomassa e a absorção de P das plantas associadas.

No mesmo período foram isolados rizóbios com potencial efeito promotor de crescimento de plantas (Moura *et al.*, 2016) e foram obtidos 19 isolados a partir do solo próximo do sistema radicular de leguminosas arbóreas. Os isolados foram testados quanto a sua capacidade nodulífera e às características de crescimento em meio de cultura. Três grupos provavelmente pertencendo ao gênero *Rhizobium* (frequentemente encontrados em solos ácidos e com capacidade produzir grande quantidade de exopolissacarídeos) foram identificados (Ferreira *et al.*, 2012). Dezesesseis isolados de rizóbios destas áreas foram testados por Hernandez *et al.* (2017), avaliando o crescimento de leguminosas associadas a estes isolados. Em outro estudo com 30 isolados de bactérias nodulíferas das mesmas áreas, Hernandez *et al.* (2019) identificaram cinco que apresentaram características de microrganismos promotores de crescimento de plantas, como produção de ácido indol-3-acético, solubilização de fosfato e formação de biofilme.

Áreas de restinga também foram objeto de estudos do grupo de pesquisa, pois se caracterizam por possuírem solos arenosos, susceptíveis a déficit hídrico, normalmente com baixos teores de matéria orgânica e disponibilidade de nutrientes e elevada salinidade e Al^{3+} . No trabalho de Canei (2014) foram obtidos mais de 100 isolados de rizóbios oriundos de duas áreas de restinga arbórea em estágio avançado de regeneração do Parque

Estadual do Rio Vermelho (Florianópolis-SC/BR). No trabalho de Meyer *et al.* (2015) avaliaram a eficiência simbiótica de 11 isolados em *Phaseolus vulgaris* obtidos do trabalho de Canei (2014) e compararam à uma estirpe recomendada para a cultura. No trabalho de Nascimento *et al.* (2014), foram avaliadas a filogenia, evolução e importância ecológica da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase (importante mecanismo de promoção vegetal) em microrganismos isolados de diferentes materiais e condições ambientais. Enquanto no trabalho de Pinto (2018) o efeito de plantas de cobertura e de biocarvão foi avaliado na estrutura de comunidades microbianas do solo em áreas de mineração de carvão em recuperação.

Estes trabalhos mostram o potencial de aplicação de microrganismos isolados de áreas degradadas ou naturalmente adversas para o crescimento vegetal tanto na otimização da agricultura, quanto para a recuperação de áreas degradadas. Porém, no ano de 2016, o grupo de pesquisa iniciou um estudo a campo com um produto comercial a base de FMA para as culturas de soja e milho, que foram publicados alguns anos depois (Stoffel *et al.*, 2020a,b). Estes trabalhos despertaram o interesse do grupo em avaliar a formulação comercial em diferentes condições e para diferentes objetivos. Entre os objetivos dos estudos realizados com a formulação comercial estão a redução de adubação fosfatada (Stoffel, 2019), a revegetação de áreas degradadas (Bernardes, 2018; Canei, 2021; Scarsanella, 2022; Meyer, 2022) e a compatibilidade de moléculas fungicidas no tratamento de sementes (Vieira, 2022).

Estes estudos e o desejo do grupo de pesquisa em seguir entendendo o comportamento de formulações comerciais de produtos à base de FMA resultaram na estruturação do projeto apresentado neste documento. Este estudo foi planejado, implementado e avaliado pelo grupo de pesquisa do LAMPB com o objetivo de desvendar o comportamento de um inoculante comercial a base de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) à campo, aumentando a escala de estudos laboratoriais para estudos em lavouras comerciais.

2. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil é um grande produtor mundial de grãos, na safra 2022 produziu aproximadamente 263,2 milhões de toneladas de cereais, leguminosas e oleaginosas, e estima-se que na safra de 2023 chegue a 302,1 milhões de toneladas (IBGE, 2023). A

produtividade média do milho no Brasil é de 4,55 t ha⁻¹, mas em algumas regiões como em Santa Catarina, pode ultrapassar 8,7 t ha⁻¹ (IBGE, 2022). Muitos fatores alteram a produtividade do milho, como a escolha da cultivar, a disponibilidade de água e nutrientes (principalmente em períodos críticos como germinação, florescimento e enchimento de grãos), o ataque de pragas e doenças e os cuidados durante etapas como o plantio e colheita, visando reduzir ao máximo as perdas (Cruz *et al.*, 2008).

O sistema agrícola produtivo adotado no Brasil exige um grande aporte de insumos, como os fertilizantes fosfatados, que são requeridos para os cultivos agrícolas uma vez que os solos naturalmente ácidos reduzem a disponibilidade de fósforo para as plantas (Pavinato *et al.*, 2020). Em função da importância econômica que esta atividade representa para o país, toda prática que vise economizar e melhor aproveitar os insumos agrícolas, gera economia e reduz os riscos de poluir o meio ambiente com a aplicação excessiva de fertilizantes. Entre os nutrientes que são requeridos em grande quantidade pelas plantas está o fósforo (P), e para não se tornar um elemento limitante na produtividade, aplicações frequentes de fertilizantes à base deste nutriente são necessárias (Novais & Smyth, 1999).

As plantas absorvem P da solução do solo, e nos sistemas agrícolas este nutriente é fornecido principalmente pela aplicação de adubos fosfatados que apresentam diferentes velocidades de solubilização (Raghothama & Karthikeyan, 2005). A recomendação da aplicação de adubos fosfatados de alta ou baixa solubilidade (como o superfosfato triplo e os fosfatos naturais, respectivamente), pode variar dependendo da fertilidade natural de cada solo e da necessidade de aplicação para a rápida disponibilidade ou para reposição do P extraído pelos cultivos. Em solos que possuem uma demanda imediata de reposição de P deve-se priorizar a utilização de fertilizantes com maior solubilidade, enquanto os fosfatos naturais podem ser utilizados em locais com P disponível adequado em que a solubilização de P poderá ocorrer de forma mais lenta no decorrer dos ciclos das culturas.

Na natureza existem microrganismos capazes de solubilizar e captar nutrientes do solo às plantas. Muitos desses são mutualistas, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Smith & Read, 1997), os quais participam de uma simbiose denominada micorriza. A associação das plantas com os FMA promove diversos benefícios às plantas, ao fungo e ao solo. O micélio dos FMA atua como uma extensão

das raízes e, dessa forma, absorve água e nutrientes (notadamente P) de um volume maior de solo quando comparado ao sistema radicular das plantas que, em contrapartida, fornecem carboidratos da fotossíntese para os FMA (Varma, 2008).

Outros mecanismos podem indiretamente favorecer a nutrição e a saúde das plantas associadas aos FMA e, conseqüentemente, aumentar o potencial produtivo. Os FMA interagem com a comunidade de microrganismos aumentando a atividade biológica do solo e com macro organismos colaborando com a reestruturação do solo e estabilidade dos agregados (Rillig & Mummey, 2006). Também participam da produção de enzimas como as fosfatases, que atuam no processo de mineralização do P orgânico do solo (Conte; Anghinoni; Rheinheimer, 2003; Gatiboni *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2015), aumentando a disponibilidade de P para as plantas e microrganismos. No contexto das adubações fosfatadas de origem mineral, é importante pontuar que a rápida liberação de P dos adubos nas proximidades das raízes pode reduzir a colonização micorrízica e, conseqüentemente, os benefícios da associação com os FMA. Porém, o crescimento do micélio extra radicular (MER) altera a dinâmica de nutrientes em toda sua superfície (micorrizosfera), podendo acidificar essa região próxima do micélio (Moreira & Siqueira, 2006; Ferrol; Azcón-Aguilar; Pérez-Tienda, 2018), aumentando a solubilidade de fosfatos inorgânicos de menor solubilidade, bem como estimular a atividade de outros microrganismos solubilizadores de fosfato da micorrizosfera (Giri *et al.*, 2005; Priyadharsini *et al.*, 2017; Kothe & Turnau, 2018).

Várias espécies de FMA têm sido indicadas para a inoculação em plantas de interesse agrícola. Dentre as espécies de FMA, uma das mais encontradas no mercado é *Rhizophagus intraradices* (*Glomus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler), comercializado tanto como organismo único quanto misturado a outros gêneros de FMA em formulações comerciais (Control Bio, 2018). Trabalhos com a inoculação de *R. intraradices* mostram o efeito da inoculação dessa espécie no crescimento de plantas como soja, trigo e tabaco em diferentes condições (Meghvansi & Mahna, 2009; Ardakani *et al.*, 2011; Bidondo *et al.*, 2011; Sena *et al.*, 2014; Spagnoletti & Lavado, 2015), o que no geral favorece a nutrição mineral e o crescimento das plantas (Stoffel *et al.*, 2020a,b). O FMA *R. intraradices* é uma espécie generalista de crescimento rápido, que produz grande quantidade de esporos (INVAM, 2021), portanto, ótimo candidato para a formulação de produtos comerciais.

Os FMA têm um potencial tecnológico para aplicação na agricultura, porém sua natureza biotrófica obrigatória (Varma, 2008) torna o processo de produção de um produto comercial lento e custoso. Apesar das dificuldades no processo, inoculantes à base de FMA são encontrados no mercado com indicações para muitas culturas de importância agrícola como soja, feijão, lentilhas, batatas, tomate, entre outros. Mesmo considerando esses cenários, até o ano de 2018 nenhum produto com essa característica havia sido registrado para comercialização no Brasil.

A partir de estudos realizados pelo Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos (LAMPB) no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/CCB-UFSC), foi realizada a validação agrônômica para a obtenção do primeiro registro de um inoculante micorrízico arbuscular à base de *Rhizophagus intraradices* no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com nome comercial de Rootella BR (registro nº SC 001620-9.000001), autorizando a comercialização e recomendação do produto para soja, milho, trigo, arroz, feijão, aveia e cevada (Stoffel *et al.*, 2020a,b).

A aplicação de inoculantes à base de FMA apresenta um enorme potencial para aplicação na agricultura, pois essa associação pode aumentar a produtividade por promover o aporte de água e nutrientes e amenizar estresses bióticos e abióticos por benefícios diretos e indiretos (Smith & Read, 2008; Tang *et al.*, 2009; Thirkell *et al.*, 2017). Existem muitas variáveis que ainda podem ser exploradas pela comunidade científica, como a interação dos FMA e fertilizantes minerais com diferentes velocidades de solubilização ou até mesmo a necessidade de recomendação de adubos fosfatados conjuntamente à inoculação com FMA. Dessa forma, estudos para avaliar a eficiência de inoculantes previamente formulados e registrados contribuem para elucidar os mecanismos de ação e efeitos desses microrganismos sobre a nutrição e produtividade de plantas de importância agrícola, facilitando a recomendação correta e a aplicação eficiente destes produtos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Dinâmica de P no solo

O fósforo é absorvido pelas raízes das plantas da solução do solo na forma inorgânica (P_i) ($H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-}). Isso implica que todas as frações de P precisam passar

por diferentes processos de transformação (absorção, imobilização, decomposição, mineralização, adsorção, dessorção, solubilização) para que o elemento possa ser absorvido quando solubilizado. Entretanto, esta é normalmente a menor fração de P nos solos, pois esta molécula, em condições ácidas ($\text{pH} < 7,0$) facilmente se liga aos grupos funcionais de superfície de partículas reativas, especialmente, as inorgânicas (Fink *et al.*, 2016). A este processo se dá o nome de adsorção. A adubação fosfatada na presença de água e cargas positivas gera a liberação de P solúvel [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 4\text{H}^+ \rightarrow 3\text{Ca}^{2+} + 2\text{H}_2\text{PO}_4^-$] (Novais; Smyth; Nunes, 2007). Existem diversas superfícies com o potencial de adsorver ou dessorver (“liberar”) íons fosfato, como os oxidróxidos de Fe, Al e Mn, aluminossilicatos e a matéria orgânica do solo (MOS) (Novais; Smyth; Nunes, 2007).

Nos oxidróxidos de Fe, Al, e aluminossilicatos o processo de adsorção é muito similar, ocorrendo uma troca de ligantes em condições de pH mais ácido (os grupamentos OH e OH_2^+ podem ser trocados por fosfato) (Novais; Smyth; Nunes, 2007). O H_2PO_4^- liga-se as cargas positivas da superfície dos oxidróxidos (Figura 1 e 2) fazendo com que a elevação do pH do solo torne a superfície das partículas cada vez com maior concentração de cargas negativas e, conseqüentemente, com menor capacidade de adsorver o H_2PO_4^- da solução. Realizar a correção do pH propicia benefícios ao crescimento vegetal por neutralizar a acidez do solo, a toxicidade de Al^{3+} e aumentar a disponibilidade de Ca^{2+} e Mg^{2+} (Neme & Lovadini, 1967; Ernani *et al.*, 2000). Dessa forma, em virtude da neutralização dos óxidos de Fe e Al na fração argilosa, o processo de adsorção do P é reduzido (Resende *et al.* 2006; Santos, Gatiboni; Kaminski, 2008).

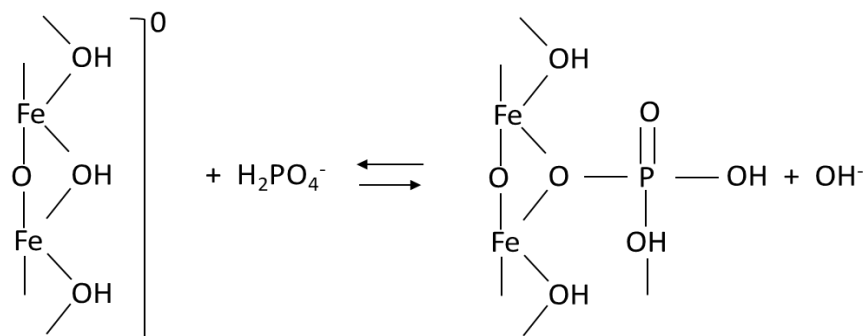


Figura 1. Adsorção do íon H_2PO_4^- na superfície de oxidróxido de Fe, com cargas líquidas zero. Fonte: Novais; Smyth; Nunes (2007).

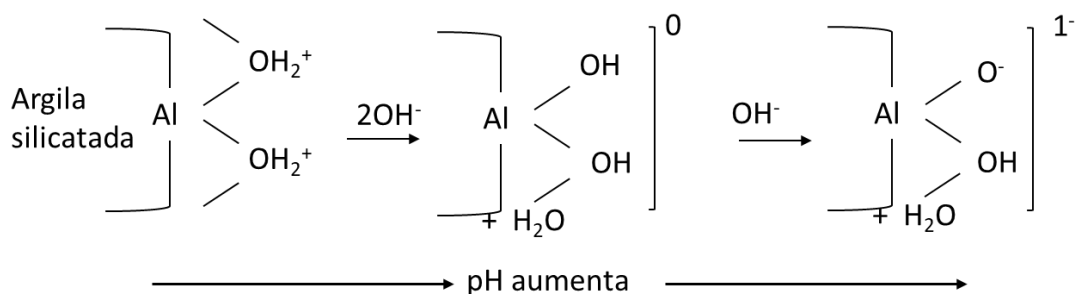


Figura 2. Desenvolvimento de carga elétrica em aluminossilicatos. Fonte: Novais; Smyth; Nunes (2007).

Dois fatores que alteram a proporção entre as frações de P no solo são os diferentes teores de argila (Machado & Souza, 2012) e a MOS (Beck & Sanches, 1994; Rheinheimer, 1999). Solos mais argilosos ou que possuam maior teor de MOS possuem maior área superficial e mais sítios de ligação dos grupos funcionais de superfície dos minerais, como óxidos de Fe e Al. Já na MOS incrementam-se os grupos funcionais carboxílico, hidroxílico e carbonila, entre outros (Rheinheimer, 1999). A existência destes grupos funcionais faz com que uma quantidade maior de P_i lábil (P_{i-RTA}) seja fonte de P para tamponar as frações menos lábeis, quantificadas por extratores como o NaHCO_3 (orgânico - P_{o-BIC} e inorgânico - P_{i-BIC}) e a fração inorgânica moderadamente lábil extraída por HCl (P_{HCl}) (Hedley; Stewart; Chauhan, 1982; Gatiboni *et al.*, 2007). Quando há uma exportação de P_{i-RTA} pelas plantas, o caminho contrário também é observado. Nesses casos, as frações menos lábeis são a fonte de P para tamponar o P_{i-RTA} (Gatiboni *et al.*, 2007; Tiecher *et al.*, 2018).

O P absorvido pelas raízes das plantas (ácido fosfórico ou ortofosfórico) que pode se ligar às cargas do solo, como os óxidos de Fe, Al e Mn da superfície dos coloides (Dalal, 1977; Parfitt, 1978; Fink *et al.*, 2016) forma ligações consideradas fortes, ou seja, mantêm o elemento fortemente adsorvido nas cargas de superfície no solo, e demandam muita energia ou elevada concentração para serem disponibilizadas na solução do solo para as plantas (Dalal, 1977; Santos; Gatiboni; Kaminski, 2008). Algumas metodologias de extração de P_i do solo são utilizadas para avaliar a quantidade de P_i disponível no solo para as plantas, entre eles o método de extração com resina trocadora de ânions (P_{i-RTA}) do fracionamento químico sequencial proposto por Hedley; Stewart; Chauhan (1982). Com essa informação é possível definir as doses adequadas de fertilizante fosfatado para a manutenção das culturas agrícolas.

O P_i -resina (P_{i-RTA}) é apenas uma das frações de P que existem no solo que é resultado da interação e equilíbrio entre as frações de P_i e P orgânico (P_o) no solo (Hedley;

Stewart; Chauhan, 1982; Gatiboni *et al.*, 2007; Santos; Gatiboni; Kaminski, 2008). As diferentes formas de P, distribuídas entre orgânicas e inorgânicas, e de baixa a alta labilidade, podem também ser quantificadas pelo método químico sequencial (Hedley; Stewart; Chauhan, 1982; Gatiboni *et al.*, 2007; Santos; Gatiboni; Kaminski, 2008). O P_o está ligado à compostos orgânicos, e sua labilidade é relacionada ao quanto este composto está suscetível à decomposição (mineralização do P_o) (Hedley; Stewart; Chauhan, 1982; Gatiboni *et al.*, 2007; Santos; Gatiboni; Kaminski, 2008). As formas de P são extraídas sequencialmente das de menor energia de ligação (lábeis) para as de maior energia de ligação (pouco lábeis ou de difícil dessorção), e assim é possível estudar as transformações, caminhos e a dinâmica deste elemento no solo.

Embora se conheça o caráter aniônico da superfície da MOS, o que em teoria promoveria um aumento da concentração de P na solução do solo, alguns mecanismos, como pontes de cátions na MOS (superfícies de carga negativa ligadas por cátions polivalentes) fazem com que o P da solução possa se ligar indiretamente à MOS (Villapando & Graez, 2001). Entretanto, a adição de compostos orgânicos ao solo é relatada aumentando os teores de P disponíveis em solução (Azevedo *et al.*, 2004). Alguns compostos da matéria orgânica do solo (MOS), como os ácidos orgânicos, apresentam grande potencial de competição com os sítios de adsorção de ânions do solo, e o potencial de competição depende do tamanho (número de grupos funcionais) e das cargas destes compostos (Andrade *et al.*, 2003). Quanto maiores forem estas duas variáveis, mais competitivo será o composto pelo sítio de ligação da MOS.

O P ainda pode ser precipitado quando ligado ao Al e Fe em condições ácidas, ou ao Ca²⁺ em condições básicas (Khasawneh & Doll, 1978), formando compostos pouco solúveis, que necessitam da ação de outros agentes para solubilizá-los. Esse mecanismo torna-se muito relevante nas camadas superficiais de solos agrícolas pela intensidade do processo durante a dissolução de grânulos de fertilizantes fosfatados. Vale destacar que apesar da condição ácida promover a adsorção do P no solo, fosfatos de Fe e Al são mais solúveis em meio ácido, enquanto fosfatos de Ca tem solubilidade aumentada em condições neutras a básicas (Khasawneh & Doll, 1978). Sendo assim, corrigir o pH dos solos é um requisito básico para a manutenção da produtividade, pois neutraliza as cargas do Al³⁺ reduzindo o efeito tóxico às raízes, os sítios de ligação da superfície dos colóides que poderiam adsorver íons fosfato, bem como reduz o potencial de precipitação do P (Novais; Smyth; Nunes, 2007).

Mesmo após a correção do pH do solo, favorecendo a disponibilidade de P_i em solução, formam-se ligações nessa fase inicial de solubilização e adsorção, que são seguidas de um longo processo de ligação quase irreversível do P (P-não lábil), definido pela ligação dupla de um fosfato à superfície, por exemplo, dos oxidróxidos (Figura 3) (Novais; Smyth; Nunes, 2007).

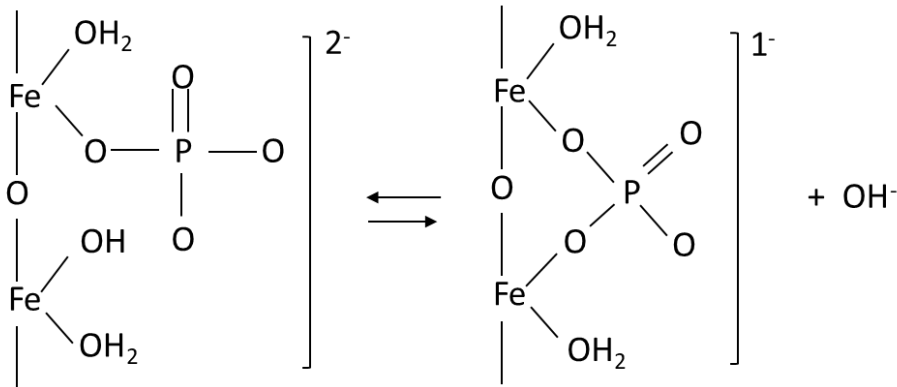


Figura 3. Esquema da adsorção do P por meio de ligações mono seguida de binucleadas. Fonte: Novais *et al.* (2007).

A proporção das frações areia, silte e argila do solo, é o fator que apresenta a maior influência na definição da área superficial específica (ASE) do solo e, conseqüentemente, na quantidade de potenciais sítios de ligação do solo (Machado & Souza, 2012). Solos mais argilosos apresentam ASE superior a solos mais arenosos, e demandam doses de corretivos e fertilizantes maiores para a manutenção da disponibilidade de P para as plantas (Novais; Smyth; Nunes, 2007), assim como apresentam correlações positivas com a concentração de MOS (Villapando & Graetz, 2001).

O P_i absorvido é exportado pelas culturas e precisa ser repostado para manter a produtividade dos ciclos de cultivo subsequentes. Para manter o equilíbrio entre as frações, o solo possui mecanismos que transformam as frações de P_o ou P_i menos lábeis para formas de maior labilidade (Cross & Schlesinger, 1995; Gatiboni *et al.*, 2007; Tiecher *et al.*, 2018). Porém, as frações mais representativas para essa reposição podem variar em função no manejo e características físicas e químicas de cada solo (Beck & Sanches, 1994; Tiecher *et al.*, 2018).

Sabe-se que em solos com maior movimentação, como no sistema de plantio convencional (SPC), as frações orgânicas de P do solo podem ter maior importância na

reposição do P_{i-RTA} por ser este um ambiente mais oxidativo. A movimentação causada por esse sistema de plantio expõe os resíduos orgânicos do solo promovendo a mineralização do P_o pela ação dos microrganismos que decompõem a matéria orgânica do solo (MOS) (Fink *et al.*, 2016), além de também expor os sítios de ligação como os óxido de Fe e Al que aumentam ainda mais o potencial de adsorção do P_i disponível, transformando-o em frações de P menos lábeis (Fink *et al.*, 2016).

Em solos mais conservados, como nos manejados no sistema de plantio direto (SPD), frações inorgânicas do P de alta e moderada labilidade têm mais relevância nas transformações e reposição do P_{i-RTA} do que é observado no SPC (Fink *et al.*, 2016). Apesar de haver mecanismos de equilíbrio de P entre as frações, os teores de P_i disponíveis no SPD são, em média, superiores à média observada no manejo de SPC (Tiecher *et al.*, 2018). Apesar disso, a fração P_o em SPD é superior ao SPC, pois o crescimento da biomassa microbiana é estimulado pelo acúmulo de material orgânico na superfície do solo e, conseqüentemente, ocorre aumento da fração P_o no solo (Conte; Anghinoni; Rheinheimer, 2002; Conte; Anghinoni; Rheinheimer, 2003).

3.2. Fertilização fosfatada

O fósforo (P) é um elemento essencial para o crescimento das plantas (Novais & Smyth, 1999), estando presente nas membranas celulares como elemento estrutural, nos ácidos nucleicos das fitas de DNA (ácido desoxirribonucleico), além de ser indispensável no processo fotossintético compondo as partículas de ATP (Adenosina Trifosfato). Quando disponível em baixas concentrações no solo, as plantas podem ter seu crescimento drasticamente limitado, o que na agricultura pode resultar na redução da produtividade das culturas (Barreto & Fernandes, 2002; Coelho, 2006). Para que se consiga atingir o rendimento esperado dos cultivos, são aplicadas anualmente grandes quantidades de fertilizantes fosfatados nas propriedades rurais e o volume de produtos aplicados varia em função da eficiência, da absorção pelas plantas, das características de cada produto, do sistema de plantio, do manejo das áreas e das espécies vegetais cultivadas (Chien & Menon, 1995).

Os fertilizantes fosfatados são obtidos por meio do processamento de rochas fosfáticas extraídas de diferentes origens (Brasil, 2016). Os principais países extratores de rochas fosfáticas são a China, os Estados Unidos e o Marrocos, que juntos são responsáveis por aproximadamente 73 % da extração mundial, sendo o Brasil responsável

por apenas 3 % desse total (Brasil, 2016). Apesar de possuir locais ricos em rochas fosfáticas, o Brasil não é autossuficiente na produção de adubos fosfatados e importa mais de 55 % da sua demanda interna desse material (Brasil, 2016). Entre os produtos importados estão o concentrado de rocha fosfática, o ácido fosfórico e produtos intermediários já processados (Brasil, 2016). As reservas mundiais de rochas fosfáticas são um recurso finito, e estima-se que nas próximas décadas a capacidade de exploração dessas reservas seja extrapolada (Cordell; Drangert; White, 2009). Entretanto, uma revisão recente sobre reservas mundiais de rochas fosfáticas, diverge dessa informação, estimando que em um cenário de demanda intermediária as reservas durem cerca de 350 anos (Argus Media Group, 2023). Independente das previsões mais ou menos otimistas, toda e qualquer atividade que promova o uso racional desse recurso deve ser incentivada.

A reposição de nutrientes via fertilização ainda é essencial para a manutenção da produtividade agrícola, pois apenas uma pequena parcela do P armazenado no solo fica disponível para as plantas, e grande parte do P absorvido é exportado pela retirada dos grãos do sistema agrícola. O P dos fertilizantes fosfatados adicionados ao solo se acumula principalmente em formas inorgânicas (Rheinheimer & Anghinoni, 2001) e é inicialmente adsorvido pelos sítios de maior energia de ligação (menos lábeis). Posteriormente, com a neutralização dessas cargas, o P é distribuído sequencialmente nas frações de média e alta labilidade (Rheinheimer & Anghinoni, 2001; Santos; Gatiboni; Kaminski, 2008), para então se encontrar na fração e concentração disponível para as plantas.

Apesar da importância da adubação fosfatada, a aplicação em excesso pode causar prejuízos ambientais (Zafar *et al.*, 2016). Por ter uma alta afinidade com os sítios de adsorção do solo, o P apresenta uma baixa mobilidade, fazendo com que a aplicação de fertilizantes fosfatados em excesso eleve as concentrações de P na camada superficial do solo (Daroub; Pierce; Ellis, 2000; Klein & Agne, 2012). Dessa forma, a erosão superficial das lavouras mal manejadas pode aumentar a concentração de P nos corpos hídricos, provocando a eutrofização desses ambientes.

O cenário de dependência da aplicação de adubos fosfatados deve ser solucionado com alternativas para manter a produtividade das culturas agrícolas a longo prazo e evitar que as práticas de manejo atuais continuem degradando os solos agrícolas.

Compreender a dinâmica do P nos diferentes tipos de solos auxilia na definição de práticas de manejo que podem reduzir a necessidade de fontes externas de P, melhorar as características físicas, químicas e biológicas do solo e garantir a máxima eficiência dos fertilizantes.

A aplicação de adubos fosfatados em suas mais diversas formulações, modificam a dinâmica de nutrientes do solo, bem como podem alterar características químicas como o pH, atividade enzimática, capacidade de troca de cátions (CTC) e o crescimento de microrganismos (Novais; Smyth; Nunes, 2007; Anghinoni, 2004). As fontes de P podem ser separadas em pelo menos dois grupos: com alta e baixa solubilidade. Entre as fontes de P com alta solubilidade estão o fosfato monoamônico (MAP) (10 % de N e 46 a 50 % de P_2O_5 com solubilidade próxima de 100 %), o fosfato diamônico (DAP) (16 % de N e 38 a 40 % de P_2O_5 com solubilidade próxima de 100 %), o superfosfato simples (aproximadamente 18 % de P_2O_5 , 20 % de Ca e 12 % S com solubilidade próxima de 85 %) e o superfosfato triplo (41 % de P_2O_5 e 12 % de Ca com solubilidade próxima de 87 %) (Alcarde, 2007). Dentre as fontes com baixa solubilidade em água podem ser citados os fosfatos naturais (16 % de P_2O_5), os nitrofosfatos e os termofosfatos (18 % de P_2O_5 , 7 % de Mg, de 16 a 20 % de Ca e 25 % de SiO_4).

Os fosfatos naturais de alta reatividade (FNR) são fonte de P às plantas, mesmo com baixa solubilidade em água e com média solubilidade em ácido cítrico (Santos & Kliemann, 2005). Em solos com alta disponibilidade natural de P, ou mais comumente, na adubação de manutenção, os FNR podem ser uma alternativa viável, pois a solubilização lenta do P promove uma ação prolongada desse elemento no meio (Santos & Kliemann, 2005).

Alguns adubos fosfatados possuem em sua formulação conteúdos significativos de outros nutrientes. Um bom exemplo é o superfosfato simples, que contém em torno de 12 % de enxofre (S) em sua formulação (SBCS, 2016). O S é um importante constituinte de processos metabólicos, como síntese de aminoácidos e vitaminas, ativação de enzimas, formação de lipídeos, entre outros (Marschner, 1995). Fatores como custo, disponibilidade, concentração de nutrientes nos adubos e no solo devem ser levados em consideração no momento de recomendar um ou outro adubo fosfatado. O investimento em fosfatos naturais deve ser inferior para que haja viabilidade em relação aos fosfatos

solúveis em água. Todos esses produtos podem ser utilizados isoladamente, na forma de fertilizantes simples, ou em formulações com outros elementos com nitrogênio e potássio.

3.3. Magnitude do efeito residual de fertilizantes

Considerando todas as variáveis discutidas em relação à disponibilidade de P frente às características químicas e físicas do solo, é essencial que sejam realizados testes e estudos para determinar a melhor escolha de fertilizantes, correção do pH do solo e as quantidades adequadas para cada propriedade, principalmente quando tratamos de solos com tanta diversidade de condições químicas e físicas como os Cambissolos (Santana & Azarias, 2021).

A interação de fertilizantes fosfatados com o solo é diferente entre fertilizantes com solubilidades diferentes. Os fertilizantes fosfatados de alta solubilidade como o MAP, DAP, superfosfato simples (SS) e superfosfato triplo (ST) (Alcarde, 2007) são comumente utilizados, mas os fosfatos naturais (FN) são uma alternativa para o cenário atual de custos elevados na agricultura por apresentarem custos mais acessíveis. Entretanto, os FN devem ser utilizados com técnica e estratégia, e não em qualquer situação. A menor solubilidade dos FN quando comparados aos fertilizantes de elevada solubilidade (MAP, DAP, SS, ST), precisam de condições favoráveis para ser solubilizados para as plantas.

A acidez é uma condição interessante para a solubilização dos FN (Khasawneh & Doll, 1978), sendo assim podem ser direcionados para áreas com pH mais ácidos, em cultivos de plantas mais tolerantes à acidez, plantas com maior capacidade de acidificar a rizosfera (efeito acidificante da rizosfera), fazendo uso de microrganismos solubilizadores de fosfatos ou ainda a combinação destas estratégias (Kothe & Turnau, 2018). Por outro lado, solos como maior acidez, como descrito anteriormente, tendem a reduzir a disponibilidade de P pela rápida adsorção, e por isso, os FN são mais interessantes em solos com teores mais elevados de P, fazendo com que a adubação de P via FN tenha como principal objetivo repor o P no decorrer dos ciclos. Nessas condições, o P é solubilizado lentamente, e o tempo de contato entre o P e os sítios de ligação é menor, evitando a formação de ligações binucleadas.

Não existem protocolos pré-definidos de como, quando e quanto de cada adubo fosfatado deve ser utilizado em cada condição ambiental, mas analisar o solo, traçar

estratégias de manejos com espécies e cultivares de plantas mais adaptadas, correção do pH do solo, fazer rotação de culturas e uso de microrganismos solubilizadores de fosfatos farão com que o(a) produtor(a) obtenha sucesso produtivo e financeiro em sua propriedade.

3.4. Milho (*Zea mays* L.) e práticas de cultivo

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família Poaceae, sendo uma planta monocotiledônea de ciclo anual, com um metabolismo fotossintético C4, de sistema radicular fasciculado, cultivado em regiões cuja precipitação varia de 300 a 5.000 mm anuais, absorvendo em média 600 mm de água durante seu ciclo (Coelho *et al.*, 2008). O cultivo do milho é em sua maioria destinado à produção de grãos e silagem para a alimentação animal, por esse motivo uma quantia significativa dos nutrientes é exportada da lavoura com a retirada da biomassa (Coelho *et al.*, 2008). Para uma produtividade de 8 t ha⁻¹, por exemplo, são necessários aproximadamente 33 kg de P ha⁻¹ (75,6 kg de P₂O₅), sendo que cerca de 80 % da quantidade absorvida é translocada para os grãos, ou seja, é retirada do sistema com a colheita (Coelho *et al.*, 2008).

A absorção e evapotranspiração são os processos que regulam o fluxo de água do solo para a planta, pois apenas 1 % do volume de água absorvido é retido em sua biomassa (Magalhães *et al.*, 2002), conseqüentemente, estes processos regulam o fluxo de vários nutrientes da solução do solo para o interior das células radiculares (transporte por fluxo de massa) (Magalhães *et al.*, 2002). Dessa forma, períodos de déficit hídrico podem limitar a nutrição, o metabolismo e o crescimento das plantas, culminando na redução do potencial produtivo. Estima-se que estresses hídricos em períodos como florescimento e enchimento de grãos possam reduzir até 50 % o potencial produtivo das plantas (Magalhães *et al.*, 2002), pois na ausência de água o P não é solubilizado e conseqüentemente não é absorvido pela planta (Novais; Smyth; Nunes, 2007).

Para amenizar os estresses bióticos e abióticos que podem atingir a lavoura durante o ciclo da cultura do milho, o melhoramento genético seleciona genótipos que possuam, por exemplo, sistema radicular mais extenso, cutícula foliar mais espessa, comportamento específicos de abertura e fechamento de estômatos, entre outras características. Porém, existem outros mecanismos que podem proteger ou auxiliar na resistência a estresses, como o manejo em sistema de plantio direto, e a associação com microrganismos simbiotes, a exemplo dos FMA.

O sistema de plantio direto (SPD) consiste em uma maneira conservacionista de manejar o solo e o cultivo de plantas agrícolas anuais. Neste sistema a movimentação do solo é mínima, e a superfície sempre está coberta com biomassa vegetal residual dos cultivos anteriores (Cruz *et al.*, 2008). A semeadura é feita com máquinas que realizam abertura no solo apenas para a deposição das sementes, sem grande movimentação no solo (Cruz *et al.*, 2008). A cobertura residual tem como finalidade proteger o solo do impacto das chuvas, bem como reduzir a erosão superficial do solo (Cruz *et al.*, 2008). Além disso, a biomassa superficial protege o solo da radiação solar, e conseqüentemente retém a umidade do solo, favorecendo o crescimento e estabelecimento de comunidades de microrganismos essenciais para a manutenção da ciclagem de nutrientes no solo.

Esta mesma comunidade de microrganismos é responsável pela decomposição e mineralização da matéria orgânica do solo (Alvarenga; Cruz; Viana, 2008), que tem grande parte da sua origem a biomassa vegetal depositada na superfície do solo no sistema de plantio direto. Com o propósito de manter o solo protegido, e produzir mais biomassa entre os ciclos produtivos, no SPD são realizadas semeaduras com plantas de cobertura, como aveia, trigo, azevém, braquiária, entre outros (Alvarenga; Cruz; Viana, 2008). Algumas observações devem ser feitas para escolher adequadamente as espécies vegetais para as plantas de cobertura, que vão definir a quantidade e a qualidade da palha sobre a superfície do solo.

Uma alternativa é promover a associação das plantas com FMA, cujas respostas à associação variam, respondendo diretamente com acréscimos de produtividade ou, indiretamente com benefícios relacionados à resistência a estresses hídricos, produção de hormônios e metabólitos secundários (Cavalcante; Goto; Maia, 2009). O milho é classificado como uma planta não dependente, mas de alta responsividade, pois cresce, produz e completa seu ciclo reprodutivo sem a associação com FMA. No entanto, melhores resultados são obtidos quando a espécie é associada à FMA (Cavalcante; Goto; Maia, 2009). Estes benefícios tornam-se mais atrativos quando abordamos a produção de grãos em regiões tropicais, tradicionalmente de solos com baixos teores de fósforo (P), onde os gastos com insumos, tais como fertilizantes minerais e pesticidas, são elevados (Sieverding, 1991).

3.5. Microrganismos e atividade enzimática do solo

Os microrganismos têm papel fundamental para a manutenção da vida, produzindo enzimas que participam da ciclagem de macro e micronutrientes, decompõem resíduos orgânicos, participam da formação de agregados das partículas do solo, produzem exsudatos que estimulam ou inibem o crescimento de macro e microrganismos, alteram o pH, entre outras muitas funções (Moreira & Siqueira, 2006).

A atividade dos microrganismos do solo há muito vem sendo discutida na literatura. Nessas discussões, algumas variáveis frequentemente são apresentadas como bioindicadores de qualidade do solo, como a respiração basal do solo, o carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana (CBN e NBM), a atividade das enzimas β -glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase (Araújo & Monteiro, 2007) que podem ser relacionadas à sanidade e produtividade das plantas.

No ciclo do P os três principais processos mediados pela ação de plantas e microrganismos são a mineralização por fosfatases ($P_o \rightarrow PO_4^{-3}$), a imobilização na biomassa vegetal e microbiana ($PO_4^{-3} \rightarrow P_o$) e a solubilização pela acidificação da rizosfera e produção de ácidos orgânicos ($P \text{ insolúvel} \rightarrow PO_4^{-3}$) (Moreira & Siqueira, 2006). Quando os processos bióticos e abióticos de transformação de P no solo estão em equilíbrio, o fluxo de energia entre estes processos promove a sustentabilidade do sistema.

As fosfatases produzidas por plantas e microrganismos são liberadas ao solo e catalisam a hidrólise de ésteres e anidridos do ácido fosfórico. Essa atividade aumenta a mineralização do P_o para fosfatos solúveis no solo, e estudos mostram a forte relação entre a demanda de P e a atividade enzimática das fosfatases (Adetunji *et al.*, 2017). Dessa forma, analisando cada situação, é possível utilizar a atividade das fosfatases do solo como um indicador da disponibilização de P para plantas e microrganismos.

O conceito de componente biológico é extensamente discutido por diversos grupos de pesquisa, entretanto a Embrapa Cerrados planejou e desenvolveu uma maneira de complementar os conceitos de componentes químicos e físicos do solo (Mendes *et al.*, 2009; Mendes; Sousa; Reis-Junior, 2015; Mendes *et al.*, 2018), até então muito bem estabelecidos na literatura. Nesses trabalhos sugere-se a inclusão de análises de bioindicadores de qualidade de solo, porém estes parâmetros historicamente têm esbarrado na dificuldade de interpretação dos resultados (Mendes *et al.*, 2009).

Após o desenvolvimento de tabelas de interpretação que relacionam a atividade das enzimas β -glicosidase e arilsulfatase ao rendimento de culturas agrícolas no decorrer de vários ciclos, os autores delimitaram faixas adequadas de valores da atividade de algumas enzimas para este fim (Mendes *et al.*, 2018). Acompanhando os resultados no decorrer dos ciclos, os autores identificaram um comportamento destes bioindicadores similar ao da MOS, claramente respondendo ao manejo e estado de degradação dos solos (Mendes *et al.*, 2018). Por fim, foi possível desenvolver e recomendar um método que utiliza a atividade dessas enzimas para interpretar esses resultados e auxiliar na recomendação de manejo de áreas afetadas (Mendes *et al.*, 2018). A enzima β -glicosidase atua na etapa final de decomposição da celulose (Adetunji *et al.*, 2017), enquanto a enzima arilsulfatase está relacionada ao ciclo do enxofre (Moreira & Siqueira, 2006).

A atividade da β -glicosidase catalisa a hidrólise da celulose, tendo como produto final a glicose, fonte de energia para o crescimento de microrganismos do solo (Adetunji *et al.*, 2017). A arilsulfatase participa do ciclo do S, hidrolisando ésteres de aril sulfato de compostos orgânicos, o que libera íons sulfato na solução do solo (Balota *et al.*, 2013). O S é um elemento muito importante para a manutenção do metabolismo e crescimento de plantas e bactérias do solo, e solos que apresentem deficiência deste nutriente podem provocar redução da produtividade das culturas agrícolas (Moreira & Siqueira, 2006). Dessa maneira, a atividade da β -glicosidase e da arilsulfatase se tornaram bons bioindicadores de qualidade do solo, pois aceleram a ciclagem de nutrientes no solo.

Com essas avaliações seria possível prever a degradação do solo e, assim, quando necessário propor práticas de manejo conservacionistas antes que o produtor perca a qualidade biológica do solo (Mendes *et al.*, 2018). Nos trabalhos também são fornecidas orientações de padronização de períodos e formas de coleta, além de como as amostras devem ser armazenadas até o envio ao laboratório (Mendes *et al.*, 2018).

3.6. Fungos micorrízicos arbusculares

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são um grupo de microrganismos pertencentes ao filo Glomeromycota e que estão intimamente inseridos no ciclo de P no solo (Smith & Read, 2008). Os FMA estão presentes em quase todos os continentes, e a diversidade de espécies de cada região é influenciada por fatores como pH, estrutura do solo, temperatura, umidade e a estrutura da comunidade de plantas (Hart *et al.*, 2017). A associação entre plantas e FMA se iniciou no período Devoniano, cerca de 475 milhões

de anos atrás (Bonfante & Genre, 2008; Brundrett *et al.*, 2018). Desde então o percentual de plantas associativas tem aumentado, atingindo mais de 80 % das espécies de plantas terrestres (Smith & Read, 2008).

Os esporos dos FMA presentes no solo germinam formando hifas germinativas que colonizam o córtex radicular que, em seguida, expandem seu crescimento para o solo, sendo capazes de absorver água e nutrientes como o P, o nitrogênio (N), o cobre e o zinco às plantas (Marschner 1995; Smith & Read, 2008). Dentro das células vegetais os FMA formam os arbúsculos, que são estruturas super-ramificadas das hifas onde ocorrem as trocas de nutrientes em uma interface das membranas celulares do FMA e da planta (Bonfante & Genre, 2010). As plantas em troca do fornecimento de água e nutrientes disponibilizam açúcares para os FMA, sendo esta a única fonte de carbono deles. Por essa razão, os FMA são classificados como microrganismos simbioses obrigatórios (Smith & Read 2008).

Apesar de necessitarem da associação com as plantas para crescer e completar seu ciclo de vida, os FMA produzem estruturas de resistência (esporos), a grande maioria nas extremidades das hifas extrarradiculares, capazes de permanecer no solo por longos períodos (Smith & Read, 2008). Excepcionalmente, a espécie *R. intraradices* é uma espécie que produz esporos dentro das raízes (INVAM, 2021). Estes esporos permanecem inertes até que recebam algum estímulo químico ou hormonal, como os flavonoides e estrigolactonas, para germinar e colonizar novas raízes (Smith & Read, 2008). Estes estímulos desencadeiam uma série de mudanças metabólicas que culminam na quebra do glicogênio interno para gerar energia necessária para a formação da hifa germinativa (Bago; Pfeffer; Shachar-Hill, 2000). No período de permanência no solo, os esporos estão suscetíveis às variações das condições ambientais que podem reduzir a sobrevivência dos propágulos.

A rede de hifas formada no solo pelo micélio dos FMA proporciona uma série de modificações químicas, físicas e biológicas que podem beneficiar o crescimento das plantas associadas (Smith & Read, 2008). Benefícios das micorrizas foram observados em condições de estresses ambientais (Munier-Lamy *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2009; Begun *et al.*, 2019), baixa disponibilidade de nutrientes (Marschner & Dell 1994), déficit hídrico (Ruiz Lozano, 2003), salinidade, acidez (Ruiz-Lozano, 2003; Folli-Pereira *et al.*,

2012) e sequestro de metais (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2004; Cornejo *et al.* 2008; Vodnik *et al.* 2008).

Os FMA também propiciam às plantas acesso ao P_o por meio da liberação de fosfatases ácidas no solo que mineralizam o P_o (Sato *et al.*, 2015). As enzimas produzidas pelos FMA também participam dos ciclos dos nutrientes, como por exemplo a fosfatase ácida, que aumenta a disponibilidade de P para as raízes (Marschner & Dell, 1994). A atividade de fosfatases ácidas é sensível ao decréscimo da disponibilidade de P do solo, que causa diminuição do P microbiano e aumento da atividade dessas enzimas (Gatiboni *et al.*, 2007). A produção de fosfatases pelos FMA auxilia na disponibilidade de P às plantas. As plantas também são capazes de produzir fosfatases como resultado da expressão gênica, desencadeada pela diminuição da disponibilidade de P do solo (Raghothama & Karthikeyan, 2005), mas a associação com FMA potencializa essa capacidade de absorção de P.

Além da atuação dos FMA nas modificações no ciclo dos nutrientes, estes fungos promovem a estabilidade dos agregados do solo por efeitos físicos do micélio envolvendo as partículas de solo, bem como biologicamente pela deposição de glomalina (Yang *et al.*, 2017; Bahadur *et al.*, 2019). Este efeito pode promover modificações a longo prazo no solo, uma vez que a algumas frações de glomalinas podem permanecer estáveis por décadas (Rillig, 2004; Matos *et al.*, 2021). A estabilidade dos agregados garante melhor infiltração de água, reduz o escoamento superficial e erosão do solo, reduzem as perdas de nutrientes e matéria orgânica e aumentam as trocas gasosas (Demenois *et al.*, 2018; Parihar *et al.*, 2020; Fall *et al.*, 2022). Existem ainda trabalhos mostrando o potencial do crescimento dos FMA no controle biológico de patógenos radiculares por modificarem o ambiente físico-químico da rizosfera pela produção de exsudatos e controlar interações microbianas do solo (Larimer *et al.*, 2014; Baltrus, 2017; Jacott *et al.*, 2017; Begum *et al.*, 2019; Alimi; Adaleke; Moteetee, 2021) e até mesmo resistência ao ataque de insetos herbívoros pela produção de terpenoides (Sharma; Anand; Kapoor, 2017).

No trabalho de Engelmoer; Behm; Toby-Kiers (2014) constatou-se competição intraradicular entre espécies de FMA associadas à raiz. Em uma ampla revisão, Jacott *et al.* (2017) mostram como as plantas associadas a FMA resistem ao ataque de doenças através de mecanismos como produção de ácido jasmônico, ácido salicílico, fenóis, y-

1,3-glucanase e enzimas quitinolíticas estimulados pela associação. No mesmo sentido, muitos trabalhos mostram como a associação com FMA pode promover a resistência à estresse hídricos por mecanismos morfológicos (maior biomassa e área foliar), fisiológicos (concentração de óleos essenciais, resistência e densidade estomática, potencial hídrico foliar e eficiência do uso da água) e bioquímicos (modificações na contrações de prolina, nas relações C:P e N:P, produção de hormônios como ácido absísico e indol acético, concentração de açúcares nos tecidos), entre outros (Bahadur *et al.*, 2019; Begum *et al.*, 2019; Santana *et al.*, 2023).

Os benefícios proporcionados pela interação entre plantas e FMA geram um crescente interesse da comunidade científica, com o objetivo de reduzir a necessidade de aplicação de fertilizantes, além de promover maior resistência de plantas por melhorar o estado nutricional das culturas sem comprometer a produtividade (Berruti *et al.*, 2016). Algumas estratégias promovem e protegem o crescimento das hifas dos FMA, como a adoção do SPD que não expõe e rompe as estruturas e a consorciação de espécies.

Além das culturas de grãos, são descritos benefícios dos FMA no crescimento de *Alliaceae*, *Fabaceae* e *Solanaceae* (Nogueira & Cardoso, 2007; Elbon & Whalen, 2015). Outros fatores devem ainda ser mais bem esclarecidos para entender o efeito da morfologia e fisiologia das raízes na interação com os FMA. Esses tópicos deveriam ser incorporados em programas de melhoramento de culturas para descrever o quanto essas características podem influenciar no efeito positivo da inoculação com FMA (Thirkell *et al.*, 2017), já que a eficiência de absorção de fósforo e produção de biomassa das plantas inoculadas com FMA podem diferir entre genótipos de plantas (Reis *et al.*, 2008)

Além da produção de enzimas, os FMA liberam no solo uma glicoproteína hidrofóbica chamada glomalina, que está positivamente correlacionada com a estabilidade dos agregados do solo (Rillig, 2004; Rillig & Mummey, 2006; Wright; Green; Cavigelli, 2007), reduzindo os riscos de erosão de grande parte dos tipos de solos mal estruturados (Wright & Upadhyaya, 1996; Wright; Starr; Paltineanu, 1999; Wright; Green; Cavigelli, 2007). Algumas metodologias de quantificação avaliam, além da glomalina, outras proteínas do solo relacionadas à glomalina (PSRG), sendo que o aumento da concentração das PSRG ocasiona uma série de modificações estruturais e bioquímicas no solo onde os resultados podem ser o estímulo das trocas gasosas, a facilitação à infiltração de água e o crescimento de raízes.

As PSRG são depositadas no solo pela degradação de hifas, já que estudos indicam que estão presentes principalmente nas hifas e esporos dos FMA e podem persistir por mais de 40 anos nos solos, apresentando efeitos duradouros (Rillig, 2004). As PSRG produzidas e liberadas no solo pelo micélio extrarradicular apresentam limitações metodológicas de estudo, mas existem métodos capazes de quantificar variáveis como a abundância de micélio extrarradicular, arquitetura, persistência, sazonalidade, produção de compostos bioquímicos, e as interações na cadeia alimentar do solo (Rillig, 2004). As PSRG podem reter metais pesados ligando-se a esses elementos, permanecendo no solo por anos, protegendo as plantas e microrganismos de possíveis efeitos tóxicos quando estes elementos estão em elevadas concentrações no solo (González-Chavéz *et al.*, 2004; Vodnik *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2012).

Existem mais de 350 espécies de FMA identificadas até o momento, dentre elas *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler, uma espécie amplamente testada em culturas de importância agrícola como soja, milho entre outras. A inoculação com *R. intraradices* em soja aumentou a tolerância das plantas simbiotes a estresses abióticos como a presença de arsênio (As) (Spagnoletti & Lavado, 2015). No trabalho de Meghvansi e Mahna (2009), a dupla inoculação de FMA e bactérias (*R. intraradices* e *Bradyrhizobium japonicum*) gerou melhorias nos índices de rendimento da soja. Já Bidondo *et al.* (2011) observaram resultados semelhantes com a inoculação mista de *Paenibacillus* e FMA. Por isso, deve-se avaliar de forma ampla cada situação de plantio, pois a resposta das plantas à presença dos FMA pode variar de mutualista a parasitária em função dos fatores que compõem a estrutura ambiental (Kiers & Van Der Heijden, 2006).

A indústria de bioinoculantes está muito bem estabelecida no mundo e apesar de não termos inúmeros exemplos de inoculantes comerciais à base de FMA, algumas formulações contendo propágulos de FMA estão entre os produtos comercializados no mundo (Hart *et al.*, 2017). No Brasil, o primeiro inoculante à base de FMA com registro junto ao MAPA é comercializado em larga escala de forma legal sob o nome comercial de Rootella BR (registrado sob nº 22902 10000-0). Este inoculante tem como base propágulos da espécie do FMA *R. intraradices*. Os testes a campo para comprovar a eficiência agrônômica do produto para as culturas de milho e soja foram realizados na safra 2016-17 em seis estados do Brasil, em uma parceria entre a empresa NovaTero de

Joinville-SC e o Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos da UFSC Florianópolis-SC, seguindo as instruções normativas definidas pelo MAPA.

Outros dois produtos foram lançados em 2022, o EndoMaxx® SC (22.500 propágulos g⁻¹) e o EndoFuse (22.500 propágulos mL⁻¹) da Sumitomo (Sumitomo, 2023), ambos contendo em suas formulações os FMA *Glomus mosseae*, *G. aggregatum*, *G. intraradices* e *G. etunicatum*, e há previsão de lançamento de um outro inoculante à base de FMA ainda em 2023 da Lallemand Plant Care (Notícias Agrícolas, 2023), o Lalrise Max, contendo 2.000 propágulos g⁻¹ de *Rhizophagus irregularis* (Lallemand Plant Care, 2023).

As recomendações destes e demais produtos biológicos em culturas agrícolas são embasadas em estudos científicos que comprovem seus benefícios, como os estudos de eficiência agrônômica dos inoculantes. Alternativas que proporcionem outros benefícios para a comunidade microbiana, estrutura do solo e sanidade das plantas sempre são bem-vindas, mas existem muitas perguntas que ainda não foram esclarecidas a respeito da interação FMA-plantas em sistemas agrícolas. Dessa forma, estudos para avaliar os modos de ação e a interação desses inoculantes combinados com adubos fosfatados de diferentes solubilidades em plantas agrícolas tornam-se muito importantes para que se compreenda o real potencial e a abrangência dessa interação.

3.7. Efeito da espécie *Rhizophagus intraradices* no desenvolvimento do milho

A alta resposta do milho à associação com FMA (Cavalcante; Goto; Maia, 2009) e a importância econômica desta cultura na economia mundial, geram interesse da comunidade científica em avaliar os efeitos da associação com FMA na nutrição, fisiologia, crescimento, produtividade de milho, bem como nas modificações químicas, físicas e biológicas do solo. *Rhizophagus intraradices* é uma espécie considerada modelo pela extensa lista de trabalhos avaliando genoma (Fontaine *et al.*, 2001; Fontaine; Grandmougin; Sancholle, 2001; Porcel *et al.*, 2006; Croll *et al.*, 2009; Estrada *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2021), efeitos no crescimento das plantas (Li *et al.*, 2013), germinação (Logi; Sbrana; Giovannetti, 1998; Juge *et al.*, 2002; Trépanier *et al.*, 2005; Crosino e Genre, 2022; Liang; Zheng; Wu, 2022), metabolismo em diferentes condições (Gachomo *et al.*, 2009) e *in vitro* (Fontaine *et al.*, 2001; Fontaine; Grandmougin; Sancholle, 2001; Porcel *et al.*, 2006). Em milho não é diferente, a inoculação de *R. intraradices* pode

interferir em diversos aspectos ambientais, desde a atividade enzimática e ciclagem de nutrientes no solo, até a produção de biomassa aérea da planta (Li *et al.*, 2013).

Adriano-Anaya *et al.* (2006), em milho coinoculado com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *R. intraradices*, observaram maior atividade de enzimas (endoglucanase, endopolimetilgalacturonase e endoxiloglucanase) o que pode auxiliar na penetração das hifas na raiz. No trabalho de Li *et al.* (2013) a inoculação de FMA e a presença de minhocas aumentou a biomassa da parte aérea e da raiz, a absorção de N e P, o rendimento do milho, bem como as atividades de fosfomonoesterase alcalina, carbono da biomassa microbiana do solo e nitrogênio. Além disso, a inoculação em campo com inóculos isolados não nativos de *R. intraradices* estimulou a colonização radicular e a produção de milho (Li *et al.*, 2013). O interessante do trabalho de Li *et al.* (2013) foi identificar que a adição de minhocas pode influenciar na comunidade nativa de FMA e gerar efeito benéfico para o crescimento do milho. Guo *et al.* (2013) mostraram que a colonização micorrízica promoveu o crescimento, absorção de N, P e K e reduziu o efeito tóxico de metais pesados de resíduos de minas de carvão. O aumento da produção de ácido indol-3-butírico (AIB) durante os estágios iniciais da infecção de *R. intraradices* em milho foi observada por Müller *et al.* (1997) e indícios de acréscimo da concentração de IAA nos esporos.

Estes são estudos que abordam os diversos aspectos da associação micorrízica arbuscular em cultivos agrícolas, especialmente no milho, e como o manejo e aplicação de fertilizantes fosfatados podem influenciar nos atributos de qualidade física, química e biológica. Expõem a importância de uma interpretação ampla do que é um sistema agrícola, e como as escolhas de insumos químicos e biológicos podem influenciar na produtividade e sustentabilidade agrícola brasileira.

3.8. Referências bibliográficas

Adetunji, A. T.; Lewu, F. B.; Mulidzi, R.; Ncube, B. (2017) The biological activities of β -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. J. Soil Sci. Plant Nutr. vol.17 no.3 Temuco.

Adriano-Anayab, M. L.; Salvador-Figueroab, M.; Ocampo, J. A.; Garcia-Romeraa, I. (2006) Hydrolytic enzyme activities in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) roots inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Glomus intraradices*. Soil Biology & Biochemistry 38, 879–886.

Alcarde, J. C. (2007) Fertilizantes. In: Novais, R. F.; Alvarez, V. V. H.; Barros, N. F.; Fontes, R. L. F.; Cantarutti, R. B.; Neves, J. C. L. Fertilidade do solo, 1017p. SBCS, Viçosa.

Alimi, A.; Adeleke, R.; Moteetee, A. (2021) Soil environmental factors shape the rhizosphere arbuscular mycorrhizal fungal communities in South African indigenous legumes (Fabaceae). *Biodivers. J. Biol. Divers.* 22, 2466–2476.

Alvarenga, R. C.; Cruz, J. C.; Viana, J. H. M. (2008) Cultivo do milho, manejo dos solos. Plantas de cobertura de solo. Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de Produção, 2.

Andrade, F. V.; Mendonça, E. S.; Alvarez, V. H.; Novais, R. F. (2003) Adição de ácidos orgânicos e húmicos em Latossolos e Adsorção de fosfato. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:1003-1011.

Anghinoni, I. (2004) Fatores que interferem na eficiência da adubação fosfatada. In: Yamada, T.; Abdala, S. R. S. Fósforo na agricultura brasileira. Anais do simpósio sobre fósforo na agricultura brasileira. POTAFOS, Piracicaba. 726p.

Araújo, A. S. F.; Monteiro, R. T. R. (2007) Indicadores biológicos de qualidade do solo. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75.

Ardakani, M. R.; Mazaheri, D.; Mafakheri, S.; Moghaddam, A. (2011) Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. *Physiol Mol Biol Plants*. 17(2):181–192.

Argus Media Group. (2023) Phosphate rock resources & reserves. argusmedia.com. Pg 45 of 47.

Azevedo, W. R.; Faquin, V.; Fernandes, L. A.; Oliveira Junior, A. C. (2004) Disponibilidade de fósforo para arroz inundado sob efeito residual de calcário, gesso e esterco de curral aplicados na cultura do feijão. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:995-1004.

Bago, B.; Pfeffer, P.; E.; Shachar-Hill, Y. (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* Vol. 124.

Bahadur, A.; Batoo, A.; Nasir, F.; Jiang, S.; Mingsen, Q.; Zhang, Q.; Pan, J.; Liu, Y.; Feng, H. (2019) Mechanistic insights into arbuscular mycorrhizal fungi-mediated drought stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4199.

Balota, E. L.; Nogueira, M. A.; Mendes, I. C.; Hungria, M.; Fagotti, D. S. L.; Melo, G. M. P.; Souza, R. C.; Melo, W. J. (2013) Enzimas e seu papel na qualidade do solo. *Tópicos Ci. Solo*, 8:221-278.

Baltrus, D. A. (2017). Adaptation, specialization, and coevolution within phytobiomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 109–116.

Barreto, A. C.; Fernandes, M. F. (2002) Produtividade e absorção de fósforo por plantas de milho em função de doses e modos de aplicação de adubo fosfatado em solo de tabuleiro costeiro. *R. Bras. Ci. Solo*, 26:151-156.

- Beck, M. A.; Sanchez, P. A. (1994) Soil phosphorus fraction dynamics during 18 years of cultivation on a Typic Paleudult. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 1424.
- Begum, N.; Qin, C.; Ahanger, M. A.; Raza, S.; Khan, M. I.; Ashraf, M.; Ahmed, N.; Zhang, L. (2019) Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 10:1068.
- Bernardes, A. D. (2018) Co-inoculação de rizóbios autóctones de área de restinga e fungo micorrízico arbuscular em *Mimosa bimucronata*. Trabalho de conclusão de curso do curso Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina.
- Berruti, A.; Lumini, E.; Balestrini, R.; Bianciotto, V. (2016) Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. *Frontiers in Microbiology* 6: 1-13.
- Bidondo, L. F.; Silvani, V.; Colombo, R.; Pérzola, M.; Bompadre, J.; Godeas, A. (2011) Pre-symbiotic and symbiotic interactions between *Glomus intraradices* and two *Paenibacillus* species isolated from AM propagules. In vitro and in vivo assays with soybean (AG043RG) as plant host. *Soil Biology & Biochemistry*.
- Bonfante, P.; Genre, A. (2008) Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: An evolutionary-developmental perspective. *Trends In Plant Science*, V. 13, N. 9, P. 492-8.
- Bonfante, P.; Genre, A. (2010) Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1, 48.
- Brasil. (2016) Departamento nacional de produção mineral. Sumário Mineral/Coordenadores: Lima, T. M.; Neves, C. A. R. Brasília: DNPM. 135 p.
- Brundrett; M. C.; Walker, C.; Harper, C. J.; Krings, M. (2018) Fossils of arbuscular mycorrhizal fungi give insights into the history of a successful partnership with plants. In: Krings, M.; Harper, C. J.; Cúneo, N. R.; Rothwell, G. W. *Transformative paleobotany*, academic press, Pages 461-480.
- Canei, A. D. (2014) Avaliação da diversidade de rizóbios de áreas de restinga da Unidade de Conservação Ambiental do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
- Canei, A. D. (2021) Coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies arbóreas em área de mineração de carvão em recuperação. Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
- Cavalcante, U. M. T.; Goto, B. T.; Maia, L. C. (2009) Aspectos da simbiose micorrízica arbuscular. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, V. 5, N. 6, P.180-208.
- Chien, S. H.; Menon, R. G. (1995) Factors affecting the agronomic effectiveness of phosphate rock for direct application. *Fertilizer Research* 41: 227-234.

- Coelho, A. C.; França, G. E.; Pitta, G. V. E.; Alves, V. M. C.; Hernani, L. C. (2008) Cultivo do milho. Embrapa Milho e Sorgo Sistemas de Produção, 2.
- Coelho, A. M. (2006) Nutrição e adubação do milho. Embrapa. Circular técnica 78.
- Conte, E.; Anghinoni, I.; Rheinheimer, D. S. (2002) Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácida após aplicação de fosfato em solo no sistema plantio direto. R. Bras. Ci. Solo, 26:925-930.
- Conte, E.; Anghinoni, I.; Rheinheimer, D. S. (2003) Frações de fósforo acumulada em latossolo argiloso pela aplicação de fosfato no sistema plantio direto. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.27, n.5, p.893-900.
- Control Bio. Soluciones agrobiológicas para el huerto y el jardín. (2018). Disponível em: <<http://controlbio.es/es/247-glomus-intraradices>> Acesso em: 26/10/18.
- Cordell, D.; Drangert, J. O.; White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. Glob. Environ. Chang. 19, 292–305.
- Cornejo, P.; Meier, S.; Borie, G.; Riiling, M. C.; Borie, F. (2008) Glomalin-related soil protein in a mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. Science of the Total Environment, v. 406, n. 1-2, p. 154-160.
- Croll, D.; Giovannetti, M.; Koch, A. M.; Sbrana, C.; Ehinger, M.; Lammers, P. J.; Sanders, I. R. (2009) Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. New Phytol 181:924–937.
- Crosino, A.; Genre, A. (2022) Peace talks: Symbiotic signaling molecules in arbuscular mycorrhizas and their potential application. Journal of Plant Interactions, vol. 17, No. 1, 824–839.
- Cross, A. F.; Schlesinger, W. H. (1995) A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. Geoderma, v.64, p.197-214.
- Cruz, J. C.; Viana, J. H. M.; Alvarenga, R. C.; Pereira Filho, I. A.; Santana, D. P.; Pereira, F. T. F.; Hernani, L. C. (2008) Cultivo do milho. Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de Produção, 2.
- Dalal, R. C. (1977) Soil organic phosphorus. Adv. Agron., 29:83-117.
- Daroub, S. H.; Pierce, F. J.; Ellis, B. G. (2000) Phosphorus fractions and fate of phosphorus-33 in soils under plowing and no-tillage. Soil Sci. Soc. Am. J., 64:170-176.
- Demenois, J.; Rey, F.; Ibanez, T.; Stokes, A.; Carriconde, F. (2018). Linkages between root traits, soil fungi and aggregate stability in tropical plant communities along a successional vegetation gradient. Plant Soil 424, 319–334.
- Elbon, A.; Whalen, J. K. (2015) Phosphorus supply to vegetable crops from arbuscular mycorrhizal fungi: a review. Biological Agriculture & Horticulture, 31, 73–90.

- Engelmoer, D. J. P.; Behm, J. E.; Toby Kiers, E. (2014) Intense competition between arbuscular mycorrhizal mutualists in an in vitro root microbiome negatively affects total fungal abundance. *Mol Ecol.* 23(6):1584-1593.
- Ernani, P. R.; Nascimento, J. A. L.; Campos, M. L.; Camilo, R. J. (2000) Influência da combinação de fósforo e calcário no rendimento de milho. *R. Bras. Ci. Solo*, 24:537-544.
- Estrada, B.; Barea, J. M.; Aroca, R.; Ruiz-Lozano, J. M. (2013) A native *Glomus intraradices* strain from a Mediterranean saline area exhibits salt tolerance and enhanced symbiotic efficiency with maize plants under salt stress conditions. *Plant Soil* 366:333–349.
- Fall, A. F.; Nakabonge, G.; Ssekandi, J.; Founoune-Mboup, H.; Apori, S. O.; Ndiaye, A.; Badji, A.; Ngom, K. (2022) Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on soil fertility: contribution in the improvement of physical, chemical, and biological properties of the soil. *Front. Fungal Biol.* v3.
- Ferreira, P. A. A.; Bomfeti, C. A.; Silva Júnior, R., Soares, B. L.; Soares, C. R. F. S.; Moreira, F. M. S. (2012) Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. *Pesq Agropec Bras.* 47:85-95.
- Ferrol, F.; Azcón-Aguilar, C.; Pérez-Tienda, J. (2018) Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. *Plant Science*, 280, pp. 441-447.
- Fink, J. R.; Inda, A. V.; Bavaresco, J.; Barrón, V.; Torrent, J.; Bayer, C. (2016) Adsorption and desorption of phosphorus in subtropical soils as affected by management system and mineralogy. *Soil Tillage Res.* 155, 62–68.
- Folli-Pereira, M. S.; Meira-Haddad, L. S.; Bazzolli, D. M. S.; Kasuya, M. C. M. (2012) Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*. vol.36 no.6 Viçosa.
- Fontaine, J.; Grandmougin, F. A.; Hartmann, M. A.; Sancholle, M. (2001) Sterol biosynthesis by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Lipids* 36:1357–1363.
- Fontaine, J.; Grandmougin, F. A.; Sancholle, M. (2001) Lipid metabolism of the endomycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *CR Acad Sci III-Vie* 324:847–853.
- Gachomo, E.; Allen, J. W.; Pfeffer, P. E.; Govindarajulu, M.; Douds, D. D.; Jin, H.; Nagahashi, G.; Lammers, P. J.; Shachar-Hill, Y.; Bücking, H. (2009) Germinating spores of *Glomus intraradices* can use internal and exogenous nitrogen sources for de novo biosynthesis of amino acids. *New Phytol* 184:399-411.
- Gatiboni, L. C.; Kaminski, J.; Rheinheimer, D. D.; Brunetto, G. (2008) Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatases ácidas durante a diminuição do fósforo disponível no solo. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.43, n.8, p.1085-1091.
- Gatiboni, L. C.; Kaminski, J.; Rheinheimer, D. S.; Flores, J. P. C. (2007) Biodisponibilidade de formas de fósforo acumuladas em solo sob sistema plantio direto. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 31, 691–699.

Giri, B.; Giang, P. H.; Kumari, R.; Prasad, R.; Sachdev, M.; Garg, A. P.; Oelmüller, R.; Varma, A. (2005) Mycorrhizosphere: Strategies and functions. In: Buscot, F.; Varma, A. Microorganisms in soils: Roles in genesis and functions. Soil Biology, Volume 3, Springer.

González-Chavéz, M. C.; Carrillogonzález, R.; Wright, S. F.; Nichols, K. A. (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. Environmental Pollution, v. 130, n. 3, p. 317- 323.

Guo, W.; Zhao, R.; Fu, R.; Bi, N.; Wang, L.; Zhao, W.; Guo, J.; Zhang, J. (2014) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the development of maize (*Zea mays* L.) grown in three types of coal mine spoils. Environ Sci Pollut Res 21:3592–3603.

Hart, M. M.; Antunes, P. M.; Chaudhary, V. B.; Abbott, L. K. (2017) Fungal inoculants in the field. Is the reward greater than the risk. Functional Ecology, 1–10.

Hedley, M. J.; Stewart, J. W. B.; Chauhan, B. S. (1982) Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. Soil Science Society of American Journal, v 46, p.970-976.

Hernández, A. G.; de Moura, G. D.; Binati, R. L.; Nascimento, F. X. I.; Londoño, D. M.; Mamede, A. C. P.; da Silva, E. P.; de Armas, R. D.; Giachini, A. J.; Rossi, M. J.; Soares, C. R. F. S. (2017) Selection and characterization of coal mine autochthonous rhizobia for the inoculation of herbaceous legumes. Arch Microbiol. Sep;199(7):991-1001.

Hernandez, A. G.; Morales-Londoño, D.; Silva, E. P.; Nascimento, F. X. I.; Souza, L. F.; Silva, B. G.; Canei, A. D.; Armas, R. D.; Giachini, A. J.; Soares, C. R. F. S. (2019) *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* strains obtained from coal-mining areas nodulate and promote the growth of *Calopogonium muconoides* plants used in the reclamation of degraded areas. Journal Of Applied Microbiology, v. 126, p. 523-533.

IBGE. (2023) Em abril, IBGE prevê safra de 302,1 milhões de toneladas para 2023. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/36842-em-abril-ibge-preve-safra-de-302-1-milhoes-de-toneladas-para-2023>> Acesso em: 03/05/2023.

INVAM. (2021) International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Rhizophagus intraradices* (reference accession UT126). Disponível em: <<http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/rhizophagus/intraradices.html>>. Acesso em: 15/02/2021

Jacott, C. N.; Murray, J. D.; Ridout, C. J. (2017) Trade-offs in arbuscular mycorrhizal symbiosis: Disease resistance, growth responses and perspectives for crop breeding. Agronomy, 7, 75.

Juge, C.; Samson, J.; Bastien, C.; Vierheilig, H.; Coughlan, A.; Piche, Y. (2002) Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. Mycorrhiza 12:37–42.

Khasawneh, F. E.; Doll, E. C. (1978) The use of phosphate rock for direct application to soils. Adv. Agron., 30:159-206.

Kiers, E. T.; Van Der Heijden, G. A. (2006) Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation. *Ecology*, 87:1627- 1636.

Klein, C.; Agne, S. A. A. (2012) Fósforo: de nutriente à poluente! *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. v(8), nº 8, p. 1713-1721.

Kothe, E.; Turnau, K. (2018) Mycorrhizosphere Communication: Mycorrhizal fungi and endofitic fungus-plant interactions. *Front. Microbiol.*, Volume 9, 3015.

Lallemand Plant Care (2023) Disponível em: <
<https://www.lallemandplantcare.com/en/usa/products/product-details/lalrise-max-wp/>>
Acesso em: 10/10/23.

Larimer, A. L.; Clay, K.; Bever, J. D. (2014). Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology* 95, 1045–1054.

Li, H.; Wang, C. Li, X.; Xiang, D. (2013) Inoculating maize fields with earthworms (*Aporrectodea trapezoides*) and an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) improves mycorrhizal community structure and increases plant nutrient uptake. *Biol Fertil Soils* 49:1167–1178.

Liang, S. M.; Zheng, F. L.; Wu, Q. S. (2022) Elucidating the dialogue between arbuscular mycorrhizal fungi and polyamines in plants. *World J Microbiol Biotechnol* 38, 159.

Logi, C.; Sbrana, C.; Giovannetti, M. (1998) Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Appl Environ Microbiol* 64:3473–3479.

Machado, V. J.; Souza, C. H. E. (2012) Disponibilidade de fósforo em solos com diferentes texturas após aplicação de doses crescentes de fosfato monoamônico de liberação lenta. *Biosci. J., Uberlândia*, v. 28, supplement 1, p. 1-7.

Magalhães, P. C.; Durães, F. O. M.; Carneiro, N. P.; Paiva, E. (2002) *Fisiologia do Milho*. Circular Técnica.

Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. 2.ed.London, Academic Press, 319p.

Marschner, H.; Dell, B. (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*. 159: 89– 102.

Matos, P. S.; Silva, C. F.; Damian, J. M.; Cerri, C. E. P.; Pereira, M. G.; Zonta, E. (2021) Beneficial services of glomalin and arbuscular mycorrhizal fungi in degraded soils in Brazil. *Sci. Agric*. v.79, n.5, e20210064.

Meghvansi, M. K.; Mahna, S. K. (2009) Evaluating the symbiotic potential of *Glomus intraradices* and *Bradyrhizobium japonicum* in vertisol with two soybean cultivars. *American-Eurasian Journal of Agronomy* 2 (1): 21-25.

Mendes, I. C.; Hungria, M.; Reis Júnior, F. B.; Fernandes, M. F. (2009) Bioindicadores para avaliação da qualidade dos solos tropicais. Utopia ou realidade? Embrapa Cerrados.

Mendes, I. C.; Sousa, D. M. G.; Reis Junior, F. B. Lopes, A. A. C. (2018) Bioanálise de solo: como acessar e interpretar a saúde do solo. Circular técnica 38.

Mendes, I. C.; Sousa, D. M. G.; Reis-Junior, F. B. (2015) Bioindicadores de qualidade de solo: os laboratórios de pesquisa para o campo. Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v. 32, n. 1/2, p. 191-209.

Meyer, E. (2022) Aplicação de inoculantes microbianos em espécies herbáceas empregadas na revegetação de áreas de mineração de carvão em recuperação. Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina.

Meyer, E.; Canei, A. D.; Armas, R. D.; Soares, C. R. F. S. (2015) Eficiência simbiótica de rizóbios isolados de áreas de restinga em *Phaseolus vulgaris* cv. Tangará. Trabalho de conclusão de curso submetido a Universidade Federal de Santa Catarina para o curso de Agronomia.

Meyer, E.; Londono, D. M. M.; Armas, R. D.; Giachini, A. J.; Rossi, M. J.; Stoffel, S. C. G.; Soares, C. R. F. S. (2016) Arbuscular mycorrhizal fungi in the growth and extraction of trace elements by *Chrysopogon zizanioides* (Vetiver) in a substrate containing coal mine wastes. Int J Phytoremediation, 19(2):113-120.

Moreira F. M. S.; Siqueira, J. O. (2006) Transformações bioquímicas e ciclos dos elementos no solo. In: Moreira F. M. S.; Siqueira, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Editora UFLA.

Moura, G. G. D.; Armas, R. D.; Meyer, E.; Giachini, A. J.; Rossi, M. J.; Soares, C. R. F. S. (2016) Rhizobia isolated from coal mining areas in the nodulation and growth of leguminous trees. Rev Bras Cienc Solo. v40:e0150091.

Müller, J. L.; Kaldorf, M.; Sutter, E. G.; Epstein, E. (1997) Indole-3-butyric acid (IBA) is enhanced in young maize (*Zea mays* L.) roots colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*.

Munier-Lamy, C.; Deneux-Mustin, S.; Mustin, C.; Merlet, D.; Berthelin, J.; Leyval, C. (2007) Selenium bioavailability and uptake as affected by four different plants in a loamy clay soil with particular attention to mycorrhizae inoculated ryegrass. J. Environ. Radioactiv., 97:148-158.

Nascimento, F. X.; Rossi, M. J.; Soares, C. R. F. S.; McConkey, B. J.; Glick, B. R. (2014) New insights into 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution, and ecological significance. Plos One, v. 9, p. e99168.

Neme, N. A.; Lovadini, L. A. C. (1967) Efeito de adubos fosfatados e calcário na produção de forragem de soja (*Glycine javanico* L.) perene em terra de cerrado. v.26. n.28. Campinas.

Nogueira, M. A.; Cardoso, E. J. B. N. (2007) Phosphorus availability changes the internal and external endomycorrhizal colonization and affects symbiotic effectiveness. *Sci. Agric.*, v.64, n.3, p.295-300.

Notícias Agrícolas. (2023). Disponível em: <<https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/agronegocio/321015-nova-biotecnologia-promete-reduzir-uso-de-fertilizantes-e-impactos-da-falta-dagua-na-agricultura.html#.Y8GK7nbMJD9>> acesso em: 10/10/23.

Novais, F. R.; Smyth, T. J. (1999) Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: UFV, 399p.

Novais, R. F.; Smyth, T. J.; Nunes, F. N. (2007) Fósforo. In: Novais, R. F.; Alvarez, V. V. H.; Barros, N. F.; Fontes, R. L. F.; Cantarutti, R. B.; Neves, J. C. L. Fertilidade do solo. SBCS, 1017p.

Parfitt, R. L. (1978) Anion adsorption by soils and soil materials. *Adv. Agron.*, 30:01-46.

Parihar, M.; Rakshit, A.; Meena, V. S.; Gupta, V. K.; Rana, K.; Choudhary, M.; Tiwari, G.; Mishra, P. K.; Pattanayak, A.; Bisht, J. K.; Jatav, S. S.; Khatri, P.; Jatav, H. S. (2020) The potential of arbuscular mycorrhizal fungi in C cycling: a review. *Arch. Microbiol.* 202, 581–1596.

Pavinato, P. S.; Cherubin, M. R.; Soltangheisi, A.; Rocha, G. C.; Chadwick, D. R.; Jones, D. L. (2020) Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. *Scientific Reports*, 10:15615.

Pinto, A. L. (2018) Influência de plantas de cobertura e de biocarvão na estrutura de comunidades microbianas do solo em áreas de mineração de carvão em recuperação. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina.

Porcel, R.; Aroca, R.; Cano, C.; Bago, A.; Ruiz-Lozano, J. M. (2006) Identification of a gene from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* encoding for a 14-3-3 protein that is upregulated by drought stress during the AM symbiosis. *Microb Ecol* 52:575–582.

Priyadharsini, P.; Rojamaala, K.; Koshila, R. R.; Muthuraja, R.; Nagaraj, K.; Muthukumar, T. (2017) Mycorrhizosphere: The extended rhizosphere and its significance. In: Choudhary, D.; Varma, A.; Tuteja, N. *Plant-Microbe Interaction: an approach to sustainable agriculture*. Springer, Singapore.

Raghothama, K. G.; Karthikeyan, A. S. (2005) Phosphate acquisition. *Plant and Soil*. Vol. 274, No. 1/2, *Root Physiology—from Gene to Function*, pp. 37-49.

Reis, E. F.; Carneiro, M. A. C.; Saggin-Júnior, O. J.; Rotta, D. A.; Sousa, M. Y. (2008) Phosphorus absorption in twelve corn genotypes inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus in Cerrado soil. *Ciência Rural*, v.38, n.9.

- Resende, A. V.; Furtini Neto, A. E.; Alves, V. M. C.; Muniz, J. A.; Curi, N.; Faquin, V.; Kimpara, D. I.; Santos, J. Z. L.; Carneiro, L. F. (2006) Fontes e modos de aplicação de fósforo para milho em solo cultivado da região do cerrado. R. Bras. Ci. Solo, 30:453-466.
- Rheinheimer, D. S. (1999) Fósforo orgânico do solo. In: Santos, G. A.; Camargo, F. A. O. (Eds). Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Gênese. p.139-157.
- Rheinheimer, D. S.; Anghinoni, I. (2001) Distribuição do fósforo inorgânico em sistemas de manejo de solo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.36, p.151-160.
- Rillig, M. C. (2004) Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. Can. J. Soil. Sci.
- Rillig, M. C.; Mummey, D. L. (2006) Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist, V. 171, P. 41-53.
- Ruiz-Lozano, J. M. (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. Mycorrhiza 13:309–317.
- Santana, L. R.; Silva, L. N.; Tavares, G. G.; Batista, P. F.; Cabral, J. R. S.; Souchie, E. L. (2023) Arbuscular mycorrhizal fungi associated with maize plants during hydric deficit. Scientific Reports, 13:1519.
- Santana, M.; Azarias, V. (2021) Solos do Brasil: Cambissolos.
- Santos, D. R.; Gatiboni, L. C.; Kaminski, J. (2008) Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.2, p.576-586.
- Santos, E. A.; Kliemann, H. J. (2005) Disponibilidade de fósforo de fosfatos naturais em solos de cerrado e sua avaliação por extratores químicos. Pesquisa Agropecuária Tropical, 35 (3): 139-146.
- Sato, T.; Ezawa, T.; Cheng, W.; Tawaraya, K. (2015) Release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. Soil Science and Plant Nutrition, 61, 269–274.
- SBCS. (2016) Sociedade Brasileira De Ciência Do Solo. Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 11.ed. 376 p.
- Scarsanella, J. A. (2022) Microrganismos promotores do crescimento vegetal em *Paspalum notatum* flügge cultivado em solo construído para reabilitação de áreas degradadas pela mineração de carvão. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina.
- Sena, J. O. A.; Stefanutti, R.; Donha, R. M. A.; Cardoso, E. J. B. N. (2014) Cinética de absorção com doses de fósforo e fungos micorrízicos arbusculares em *Nicotiana tabacum*. Científica, v.42, n.3, p.294-298.

Sharma, E.; Anand, G.; Kapoor, R. (2017). Terpenoids in plant and arbuscular mycorrhiza-reinforced defence against herbivorous insects. *Annals of Botany* 119: 791–801.

Sieverding, E. (1991) Vesicular–arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. *Eschborn. GTZ.* 371p.

Smith, S. E.; Read, D. J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, 605p.

Smith, S. E.; Read, D. J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edn. London: Academic.

Sousa, C. S.; Menezes, R. S. C.; Sampaio, E. V. S. B.; Lima, F. S. (2012) Glomalina: características, produção, limitações e contribuição nos solos. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 33, suplemento 1, p. 3033-3044.

Spagnoletti, F.; Lavado, R. S. (2015) The arbuscular mycorrhiza *Rhizophagus intraradices* reduces the negative effects of arsenic on soybean plants. *Agronomy*.

Stoffel, S. C. G. (2019) Inoculante micorrízico a base de *Rhizophagus intraradices* no crescimento e nutrição de culturas de importância agrícola. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina.

Stoffel, S. C. G.; Armas, R. D.; Giachini, A. J.; Rossi, M. J.; Gonzalez, D.; Meyer, E.; Nicolette, C. H.; Rocha-Nicolette, E.; Soares, C. R. F. S. (2016) Micorrizas arbusculares no crescimento de leguminosas arbóreas em substrato contendo rejeito de mineração de carvão. *CERNE*. v. 22 n. 2, p. 181-188.

Stoffel, S. C. G.; Soares, C. R. F. S.; Meyer, E.; Lovato, P. E. Giachini, A. J. (2020a) Yield increase of corn inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. *Ciência Rural*, v.50:7, e20200109

Stoffel, S. C. G.; Soares, C. R. F. S.; Meyer, E.; Lovato, P. E. Giachini, A. J. (2020b) Yield increase of soybean inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. *Afr. J. Agric. Res*, Vol. 16(5), pp. 702-713.

Sumitomo (2023) Disponível em: <https://www.sumitomochemical.com/asd/biologicos/>, acesso em: 10/10/23

Tang, M.; Chen, H.; Huang, J. C.; Tian, Z. Q. (2009) AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biol. Biochem.*, 41:936-940.

Thirkell, T. J.; Charters, M. D.; Elliott, A. J.; Sait, S. M.; Field, K. J. (2017) Are mycorrhizal fungi our sustainable saviors? Considerations for achieving food security. *Journal of Ecology*, 105, 921–929.

Tiecher, T.; Gomes, M. V.; Ambrosini, V. G.; Amorim, M. B.; Bayer, C. (2018) Assessing linkage between soil phosphorus forms in contrasting tillage. *Soil and Tillage Research* 175 (2018) 276–280.

Trépanier, M.; Bécard, G.; Moutoglis, P.; Willemot, C.; Gagné, S.; Avis, T. J.; Rioux, J. A. (2005) Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. *Appl Environ Microbiol.* Sep;71(9):5341-7.

Varma, A. (2008) *Mycorrhiza. State of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure, and systematics.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3 ed.

Vieira, A. S. (2022) Crescimento e colonização micorrízica de culturas de interesse agrícola após tratamento de sementes com inoculante a base de *Rhizophagus intraradices* e de agroquímicos. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina.

Vieira, A. S. (2022) Crescimento e colonização micorrízica de culturas de interesse agrícola após tratamento de sementes com inoculante a base de *Rhizophagus intraradices* e de agroquímicos. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina.

Villapando, R. R.; Graetz, D. A. (2001) Phosphorus sorption and desorption properties of the spodic horizon from selected Florida Spodosols. *Soil Sci. Soc. Am J.*, 65:331-339.

Vodnik, D.; Greman, H.; Macek, I.; Elteren Van, J. T.; Kovacenic, M. (2008) The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment*, v. 392, n. 1, p. 130-136.

Walker, C.; Schüßler, A.; Vincent, B.; Cranenbrouck, S.; Declerck, S. (2021) Anchoring the species *Rhizophagus intraradices* (formerly *Glomus intraradices*). *Fungal Systematics and Evolution* 8: 179–201.

Wright, S. F.; Green, V. S.; Cavigelli, M. A. (2007) Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. *Soil & Tillage Research, Netherlands*, v. 94, n. 2, p. 546-549.

Wright, S. F.; Starr, J. L.; Paltineanu, I. C. (1999) Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. *Soil Science Society of America Journal, Madison*, v. 63, n. 6, p. 1825-1829.

Wright, S.; Upadhyaya, A. A. (1996) Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science, Baltimore*, v. 161, p. 575-586.

Yang, Y.; He, C.; Huang, L.; Ban, Y.; Tang, M. (2017) The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on glomalin-related soil protein distribution, aggregate stability, and their relationships with soil properties at different soil depths in lead-zinc contaminated area. *PLoS One.* 12(8):e0182264.

Zafar, M.; Tiecher, T.; Castro Lima, J. A. M.; Schaefer, G. L.; Santanna, M. A.; Dos Santos, D. R. (2016) Phosphorus seasonal sorption-desorption kinetics in suspended sediment in response to land use and management in the Guaporé catchment, Southern Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 188, 643.

4. HIPÓTESES

- O inoculante à base do FMA *Rhizophagus intraradices* coloniza e forma arbúsculos no milho em poucos dias de contato dos propágulos com as raízes;
- A inoculação de milho com o FMA *R. intraradices* aumenta a produtividade pelo aumento da disponibilidade do P de fertilizantes fosfatados de diferentes solubilidades, bem como os teores de glomalina e a atividade das enzimas arilsulfatase e β -glucosidase;
- A produtividade do milho no segundo ano de cultivo, sob efeito residual da adubação de P, aumenta com a inoculação do FMA *R. intraradices*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Avaliar o estabelecimento da colonização micorrízica da espécie *Rhizophagus intraradices*, presente no inoculante à base do fungo micorrízico arbuscular (FMA) Rootella BR, e seus efeitos na absorção e disponibilização de P, no efeito residual de adubos fosfatados com diferentes solubilidades, nos atributos biológicos do solo e na produtividade do cultivo do milho.

5.2. Objetivos específicos

- Avaliar o percentual e velocidade do estabelecimento da colonização micorrízica nos estágios iniciais de desenvolvimento do milho;
- Avaliar o efeito da inoculação com FMA *R. intraradices* e de diferentes fontes de P sobre a produtividade de milho e os teores de glomalina, disponibilidade de P no solo e a atividade das enzimas arilsulfatase e β -glucosidase no solo;
- Avaliar o efeito residual a campo da adubação com diferentes fontes de fósforo sobre a produtividade do milho inoculado com o inoculante micorrízico à base de *R. intraradices*.

6. CAPÍTULO 1. Estabelecimento da colonização micorrízica de *Rhizophagus intraradices* em milho

6.1. Resumo

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam associações com mais de 80 % das espécies de plantas terrestres, chamada de micorriza arbuscular, com registros do estabelecimento há mais de 450 milhões de anos. Entre os benefícios estão a maior absorção de nutrientes e água, resistência a estresses ambientais e estímulo da atividade microbiológica do solo, decorrente do crescimento do micélio que se expande da raiz ao solo, atuando como uma extensão do sistema radicular. Inoculantes a base de FMA buscam unir em uma formulação isolados de FMA que entreguem aos produtores os benefícios da associação em formulações que viabilizam a prática de inoculação a campo. Conhecer o potencial infectivo e a velocidade do estabelecimento da colonização micorrízica destes inoculantes são informações importantes para definir estratégias de manejo que promovam a colonização, e estimulem os benefícios nos primeiros estágios de crescimento das plantas. O objetivo do estudo foi avaliar o percentual e a velocidade do estabelecimento da colonização micorrízica nos estágios iniciais de desenvolvimento do milho. O delineamento experimental contou com dois fatores: a inoculação ou não das sementes de milho (inoculante micorrízico arbuscular a base de *Rhizophagus intraradices*) e o fator tempo de crescimento (6, 9, 13, 18, 23 e 26 dias após a emergência – DAE). As sementes de milho foram semeadas e inoculadas em placas contendo solo estéril com baixo teor de P. Foram avaliadas a colonização micorrízica radicular, a matéria seca da parte aérea (MSPA), e a produção de proteínas relacionadas a glomalina total (GT) e facilmente extraível (GFE). Constatou-se que a colonização micorrízica inicia entre 9 e 13 DAE, período em que foram observadas estruturas como hifopódios e hifas intraradiculares iniciando a colonização. Aos 26 DAE a colonização média foi de 16,3 %. Não foram observados efeitos da inoculação nas variáveis MSPA, GT e GFE no período e condições avaliadas. O inoculante a base de *R. intraradices* apresenta potencial para rápido estabelecimento da colonização micorrízica, sendo as primeiras estruturas intraradiculares observadas aos 9 DAE.

6.2. Introdução

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são microrganismos simbiontes obrigatórios por depender da associação para completar seu ciclo de vida (Smith & Read, 2008). Há registros de que a parceria entre FMA e plantas data de mais de 450 milhões de anos, no período Devoniano (Bonfante & Genre, 2008; Maia; Silva; Goto, 2010; Brundrett *et al.*, 2018). Neste período, as plantas estavam iniciando a transição do ambiente aquático para o terrestre, ainda com um sistema radicular muito rudimentar, prioritariamente preparado para a sustentação (Bonfante & Genre, 2008). A associação com FMA proporcionou e propicia às plantas uma vantagem, onde os FMA atuam como uma extensão do sistema radicular, aumentando a absorção de nutrientes e água e a planta em troca fornece fotoassimilados ao FMA, sua única fonte de carbono (Marschner, 1995; Smith & Read, 2008).

Essa associação se inicia com a identificação de plantas por parte dos propágulos dos FMA (hifas, esporos e fragmentos de raízes colonizadas) que começam a formação de uma hifa pré-simbiótica (Giovannetti; Avio; Sbrana, 2010). Esta hifa forma-se a partir de um tubo germinativo com origens distintas entre as espécies de FMA, como da hifa de sustentação, septo basal da hifa de sustentação ou ainda através da parede do esporo (Maia; Silva; Goto, 2010). A germinação e crescimento dos FMA são influenciados por condições ambientais como umidade, pH, temperatura, concentração de CO₂, nutrientes de fonte mineral e orgânica, presença e interação com outros microrganismos (Hart *et al.*, 2017) e de moléculas sinalizadoras liberadas pelas plantas, como exsudatos radiculares, flavonoides, estrigolactonas, entre outros (Smith & Read 2008; Giovannetti; Avio; Sbrana, 2010; Lambais; Ramos, 2010; Crosino & Genre, 2022).

No trabalho de Juge *et al.* (2002), o armazenamento de esporos de *R. intraradices* a frio a 4 °C por mais de 14 dias aumentou a germinação dos esporos e reduziu a mortalidade, aumentando a formação de hifas longas. Este crescimento viabiliza o encontro das raízes com os propágulos de FMA e a colonização do sistema radicular pode ocorrer em poucos dias após a germinação e formação das raízes. Louis & Lim (1988) constataram que as hifas de *G. clarum* estenderam-se 8 mm após 10 dias de incubação, mas trabalhos mostram que determinadas condições ambientais estimulam o alongamento e ramificação destas hifas. Logi *et al.* (1998) constataram um crescimento médio de 30 a 50 mm do micélio de *G. caldonium* nos primeiros 10 a 15 dias após a

germinação, e que pode ser maior quando os esporos entram em contato com extratos celulares de *Daucus carota* L.

Após a germinação, os propágulos do FMA iniciam seu crescimento em direção às raízes, e ao entrar em contato com a superfície da raiz, a hifa expande formando uma estrutura chamada hifopódio (Bonfante & Genre, 2010; Giovannetti; Avio; Sbrana, 2010). Nesta estrutura são produzidas enzimas, como celulasas, que hidrolisarão a parede celular das células epidérmicas, facilitando a penetração da hifa no córtex radicular (Bonfante & Genre, 2010). Após iniciar o crescimento intercelular, as hifas crescem e se ramificam no espaço entre a parede e a membrana celular, formando os arbúsculos, a principal estrutura de troca entre planta e FMA (Genre & Bonfante, 2010). A membrana celular sofre algumas modificações, como por exemplo, um maior número de transportadores de P e se expande para envolver os arbúsculos, aumentando assim a superfície de contato entre eles, recebendo o nome de membrana periarbuscular (Corradi & Sanders, 2006).

O processo metabólico dos esporos durante a germinação e o efeito da presença de extratos celulares vegetais ainda precisam ser melhor esclarecidos, entretanto trabalhos apresentam cada vez mais informações sobre as etapas metabólicas deste processo. Os lipídios são a principal forma de armazenamento de carbono em esporos de FMA, e exsudatos radiculares têm um efeito na atividade da membrana dos esporos que podem promover o crescimento pré simbiótico, acelerando a germinação dos esporos, ramificação do tubo germinativo, estímulo da absorção e modificam o metabolismo (Bücking *et al.*, 2008). Se sabe que *R. intraradices* e *G. mosseae* sintetizam aminoácidos de reservas endógenas nessa etapa (Breuninger *et al.*, 2004; Gachomo *et al.*, 2009; Giovannetti; Avio; Sbrana, 2010) e que o ácido vanílico pode estimular o crescimento das hifas e a ramificação de *Gigaspora gigantea* e *G. margarita*, aumentando a probabilidade de contato entre o fungo e a raiz do hospedeiro (Douds; Nagahashi; Abney, 1996). No trabalho de Liang; Zheng; Wu (2022), pequenas quantidades de compostos como policatiônicos e alifáticos, poliaminas (PAs) (putrescina e espermidina) das plantas relacionados também a respostas ao estresse em esporos foram consideradas importantes para a colonização micorrízica, formação de apressórios (hifopódios), germinação de esporos e crescimento micelial.

Das mais de 80 % das espécies de plantas que formam associação com FMA (Smith & Read, 2008), economicamente o milho (*Zea mays*) é umas das mais importantes no mundo. Estima-se uma produção de 312,2 milhões de toneladas no Brasil no ano de 2023 (Conab, 2023). Estudos mostram que o milho é uma planta que responde à associação micorrízica arbuscular, sendo observados os mais diversos efeitos, como maiores teores de nutrientes (N, P, K e micronutrientes), produção de biomassa e principalmente produtividade. Entre as espécies candidatas à serem utilizadas em produtos comerciais está o *R. intraradices*, um FMA de rápido crescimento (INVAM, 2021), generalista e que se mostra eficiente em diversas culturas de importância agrícola como citrus (Liu *et al.*, 2022) tomate (Fracasso *et al.*, 2020), milho (Stoffel *et al.*, 2020a) e soja (Stoffel *et al.*, 2020b).

Bressan & Vasconcellos (2002) mostraram que o aumento do teor de P no solo diminui o percentual de colonização e efeitos da associação. Em milho não é diferente, a inoculação de *R. intraradices* pode interferir em diversos aspectos ambientais, desde a atividade enzimática e ciclagem de nutrientes no solo, até a produção de biomassa aérea do milho (Li *et al.*, 2013). Aguegue *et al.* (2017) identificaram maior crescimento e produtividade em plantas tratadas com *R. intraradices* (colonização de 32 %) e metade da adubação recomendada. Zhao *et al.* (2015) observaram que a inoculação colaborou com a resistência a estresse hídrico, e que após a seca, a reidratação é mais rápida no milho inoculado com *R. intraradices*.

Adriano-Anaya *et al.* (2006), em milho coinoculado com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *R. intraradices*, observaram maior atividade de enzimas (endoglucanase, endopolimetilgalacturonase e endoxiloglucanase) o que pode auxiliar na penetração na raiz. No trabalho de Li *et al.* (2013), a inoculação de FMA e a presença de minhocas aumentou a biomassa da parte aérea e da raiz, bem como a absorção de N e P, o rendimento do milho, e as atividades de fosfomonoesterase alcalina, carbono da biomassa microbiana do solo e nitrogênio. Além disso, a inoculação em campo com inóculos de isolados não nativos de *R. intraradices* parece ter estimulado a colonização radicular e a produção de milho (Li *et al.*, 2013). Guo *et al.* (2014) mostraram que a colonização micorrízica promoveu o crescimento, absorção de N, P e K, e reduziu o efeito tóxicos de metais pesados de resíduos de minas de carvão.

Os FMA ocorrem naturalmente em quase todos solos e condições do mundo, e se adaptam à estas diferentes condições ambientais. Essa adaptação ocorre mesmo entre

isolados da mesma espécie obtidos de diferentes condições. A capacidade de dois isolados (um de solo salino e outro de uma coleção) de *R. intraradices* em germinar e colonizar, tanto *in vitro* quanto na inoculação *in vivo* em milho foram testadas por Estrada *et al.* (2013). No trabalho, os autores mostraram que o isolado de solo salino se desenvolveu melhor *in vitro* e promoveu o crescimento de milho sob condições de maior salinidade do que o outro isolado. O mesmo pode ocorrer com isolados de *R. intraradices* obtidos de ambientes com elevadas concentrações de Pb, que crescem e se adaptam melhor às elevadas concentrações de Pb, indicando tolerância dos isolados de FMA que foram submetidos a estas condições anteriormente (Malcová *et al.*, 2003).

Inoculantes comerciais unem as vantagens promovidas por FMA e a praticidade de aplicação em produtos que prometem auxiliar às plantas na absorção de nutrientes e resistência á estresses (Hart; Vosátka; Gryndler, 2017). Entender as etapas de germinação até o início da colonização é essencial para compreender o potencial do estabelecimento da associação de isolados nativos ou comerciais. Quanto mais rápida for a colonização inicial dos inoculantes, antes eles podem colaborar com o crescimento das plantas associadas. Dessa forma, compreender os fatores que influenciam na velocidade de colonização das plantas inoculadas é importante para poder adaptar o manejo a fim de garantir um rápido estabelecimento da associação e garantir vantagens da associação neste período inicial onde as plântulas estão em rápido crescimento e sensíveis à estresses ambientais. Sendo assim, o objetivo foi identificar quando a colonização de um isolado da espécie *R. intraradices*, de um inoculante comercial, inicia e em que velocidade ela se estabelece em milho em ambiente controlado.

6.3. Material e Métodos

O experimento foi realizado no período de 21/10/2022 a 22/11/2022, contando com o preparo das sementes, pré-germinação, plantio e coletas. O delineamento foi com dois fatores: a inoculação ou não do inoculante comercial à base de *R. intraradices* Rootella BR (registrado sob nº 22902 10000-0) e seis datas de coleta distribuídas nos primeiros 26 dias após a emergência (DAE) das sementes de milho, com oito repetições. As sementes de milho da cultivar SHS SUPERR da marca Santa Helena (de ciclo precoce) foram pré-germinadas sob papel filtro umedecido com água destilada em placas de Petri no dia 21 de outubro de 2021, semeadas no dia 25, e a emergência das plântulas ocorreu

no dia 27 de outubro. As datas de coleta iniciaram aos 6 DAE, e continuaram aos 9, 13, 18, 23 e 26 DAE.

As sementes de milho foram pré-selecionadas padronizando o tamanho e formato, com o objetivo de fornecer às plântulas a mesma quantidade de reserva. As sementes padronizadas (Figura 1a) foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso dos produtos químicos do tratamento de sementes (ingredientes ativos: clorotraniliprole e clotianidina) para evitar qualquer incompatibilidade entre estes fungicidas e o FMA *R. intraradices*. Na sequência, as sementes foram higienizadas com álcool 70 ° GL durante 5 minutos, e por último lavadas três vezes em água destilada para a retirada do álcool. Após a higienização as sementes foram dispostas em placas de Petri com papel filtro esterilizado umedecido em água destilada (Figura 1b) para a pré-germinação. Quatro dias depois, 100 sementes no mesmo estágio de germinação foram igualmente distribuídas entre os tratamentos (NI e FMA) e datas de coleta, a fim de garantir que todas as plantas de uma mesma coleta estivessem no mesmo estágio de desenvolvimento inicial (Figura 1c). Em testes preliminares, a seleção de sementes em um mesmo estágio de germinação mostrou-se essencial para a padronização das plântulas, pois como apresentado na Figura 1e-g, um dia resultou em grandes diferenças de crescimento neste período. Todas as sementes foram inoculadas com o inoculante, entretanto, as sementes do tratamento não inoculado receberam o inóculo autoclavado (Figura 1d).



Figura 1. Sementes antes da higienização e limpeza do tratamento de sementes (a), sementes em placa de Petri com papel filtro umedecido com água destilada para germinação (b), inoculação com produto comercial a base de *R. intraradices* (c) com detalhe da inoculação (d) e sementes aos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias após a germinação (e-j).

Placas de Petri plásticas estéreis foram preenchidas com solo peneirado em trama de 2 mm e autoclavado duas vezes durante 1h à 121 °C. As características do solo eram: 270 mg dm³ de argila; pH 4,9; 4,9 mg dm³ de P; 34 mg dm³ de MO (Tabela 1). Aberturas de aproximadamente 3 cm de largura foram realizados na lateral de cada placa (Figura 2a) e seladas com plástico filme para evitar a perda de solo, água e saída de raízes. Todas as placas foram individualmente envolvidas com papel alumínio para evitar que a luz entrasse em contato com o sistema radicular (Figura 2b). Em seguida, as sementes foram semeadas à 2,0 cm de profundidade da abertura da placa de Petri (Figura 2c), todas organizadas na mesma posição, direcionadas igualmente para as laterais da placa. As plantas foram cultivadas sob condições de luz natural sem iluminação suplementar e irrigadas em função da necessidade, variando de 1 a 3 vezes ao dia com 5 mL por placa a cada vez.

Tabela 1. Análise do solo utilizado para a execução do experimento.

Argila%	pH H ₂ O	Índice SMP	P mg dm ⁻³	K mg dm ⁻³	MO %	AL	Ca cmol _c dm ⁻³	Mg cmol _c dm ⁻³
27	4,9	4,6	4,9	174,0	3,4	2,6	2,8	1,9
H+Al cmol _c dm ⁻³	CTC	Saturação Al	CTC V	Soma de bases S		Relações Ca/Mg Ca/K Mg/K		
22,5	27,6	33,8	18,6	5,15		1,5	6,3	4,23



Figura 2. Preparo das placas de Petri e semeadura do milho. Placas de Petri contendo solo autoclavado (a), envolvidas por papel alumínio (b) e semeadas com milho a dois centímetros de profundidade (c).

A biomassa aérea das plantas foi avaliada após a coleta e armazenagem em sacos de papal para secagem em estufa de circulação de ar a 60 °C até peso constante. Toda a biomassa das raízes foi coletada e armazenada em solução de formalina (50 mL), ácido acético glacial (50 mL) e álcool etílico 50 % (FAA) (Figura 3a) até o procedimento de coloração. As raízes passaram pelos processos de descoloração e coloração em banho maria a 90 °C com KOH 10 % (Figura 3b) e corante azul de tripan 0,5 %, seguindo a metodologia descrita por Koske e Gemma (1989). Após a coloração, as raízes foram dispostas em lâminas para microscopia (Figura 3c) e observadas em aumento de 200 x para identificação das estruturas dos fungos micorrízicos arbusculares (hifas, arbúsculos, esporos e vesículas), seguindo a metodologia descrita por McGonigle *et al.* (1990).

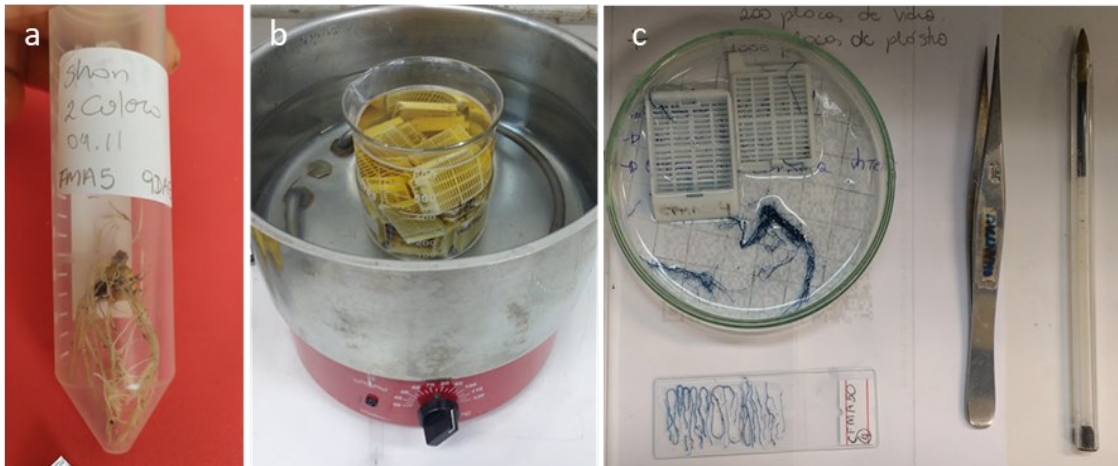


Figura 3. Etapas de coleta e armazenamento (a), processo de coloração (b) para observar as estruturas do *R. intraradices* nas raízes de milho em lâminas para microscopia (c).

Os teores de glomalina do solo facilmente extraível e de glomalina total foram determinados de acordo com Wright & Upadhyaya (1996) com extração em citrato de sódio em autoclave e determinados pelo método de Bradford (1976).

Os dados foram submetidos à análise de homogeneidade e variância, e submetidos ao teste de comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade utilizando o software R Core Team (2021).

6.4. Resultados

A aplicação do inoculante comercial à base de *R. intraradices* foi capaz de colonizar as plantas, nas quais foram identificadas estruturas de FMA como hifas e arbúsculos em algumas repetições a partir do 9 DAE (Figura 4a). Entretanto o estabelecimento da colonização micorrízica em todas as plantas só foi observado aos 13 DAE (Figura 4a). O percentual de colonização micorrízica das plantas inoculadas aos 9 DAE não ultrapassou 1 %, sendo em média 0,36 % chegando a 16,3 % ao final do experimento na coleta de 26 DAE (Figura 4b), onde todas as repetições de plantas inoculadas possuíam estruturas como hifas e arbúsculos nas raízes. Nenhuma das plantas não inoculadas apresentou estruturas de FMA durante todo o experimento.

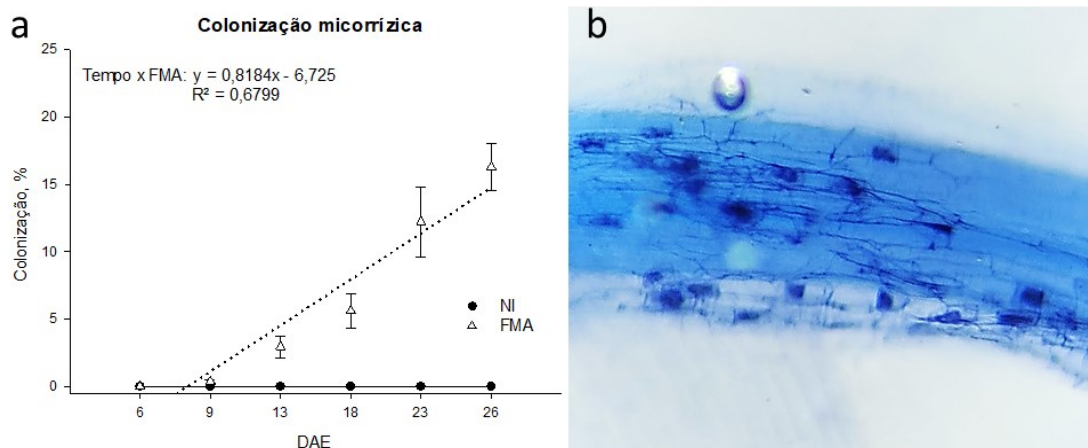


Figura 4. Percentual de colonização micorrízica de plântulas de milho inoculadas com *R. intraradices* e suas estruturas observadas aos 26 DAE. • - não inoculado; △ - inoculado com *R. intraradices*.

A média de MSPA das plantas aos 6 DAE foi de 25 mg e aos 26 DAE foi de 118 mg, no entanto não houve efeito da inoculação sobre o crescimento no período avaliado neste experimento (Figura 5a). Apesar do percentual de colonização micorrízica crescente observado nas raízes, a produção de proteínas do solo relacionadas a glomalina da fração facilmente extraível (GFE) não diferiu entre plantas inoculadas e não inoculadas (Figura 5b). A GFE média aos 6 DAE foi de 1,34 mg g⁻¹ solo e aos 26 DAE foi de 1,70 mg g⁻¹ de solo. Os teores de proteína do solo total relacionadas a glomalina (GT) não diferiram entre coletas e plantas inoculadas ou não com *R. intraradices*, sendo o teor médio de 4,51 mg g⁻¹ de solo.

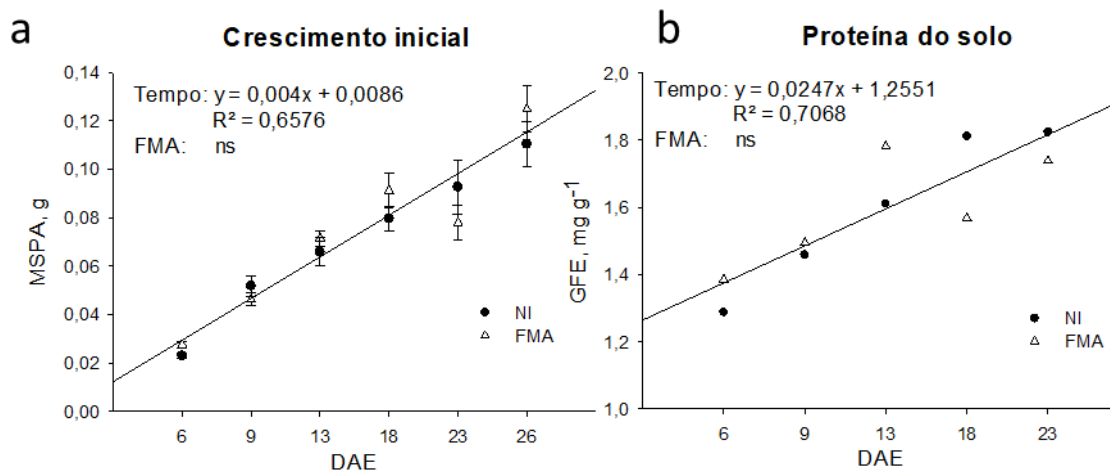


Figura 5. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) (a) e glomalina facilmente extraível (GFE) (b) de plântulas de milho inoculadas e não inoculadas com inoculante a base de *R. intraradices*. • - não inoculado; △ - inoculado com *R. intraradices*.

6.5. Discussão

O período entre a sementeira e a emergência das plantas é marcado pela grande dependência das plântulas à reserva energética das sementes, da disponibilidade de água

no solo, bem como temperatura e a profundidade da sementeira (Magalhães & Durães, 2002). Após a emergência, no estágio V2 (em média 7 DAE, quando as plantas estão com duas folhas expandidas completamente formadas), as plântulas deixam de ser heterotróficas e passam a ter seu metabolismo exclusivamente autotrófico, dependendo da captação de luz e absorção de água e nutrientes para realizar a fotossíntese (Sangoi & Silva, 2016). A partir deste momento, a associação com FMA pode auxiliar com a maior exploração do solo, uma vez que o sistema radicular adventício ainda está em formação e começa a substituir as raízes seminais (Sangoi & Silva, 2016) (Figura 6a-e). Para isso, é importante que os inoculantes comerciais consigam estabelecer a associação antes ou durante este período.

Neste trabalho, a inoculação foi realizada em contato direto com a radícula (Figura 1c-d), simulando a melhor localização que um propágulo de FMA poderia se posicionar após o tratamento de sementes. Nestas condições, as primeiras estruturas intraradiculares de FMA foram observadas aos 9 DAE (Figura 4a), coincidindo com o período de início do metabolismo autotrófico (Sangoi & Silva, 2016). Neste período foram observadas estruturas chamadas de hifopódios, ponto de entrada dos FMA no sistema radicular. Aos 13 DAE todas as plantas já possuíam pontos de colonização micorrízica (Figura 7), validando que apesar do baixo percentual de colonização (2,9 %), todas teriam entrado em contato com os propágulos (Figura 4a) e em condições ambientais adequadas o estabelecimento da colonização micorrízica do restante do sistema radicular seria possível.



Figura 6. Crescimento das plantas (a-e) e evolução da formação de raízes até os 23 dias após a emergência (DAE) (f-j) das sementes de milho semeadas em placas de Petri e em solo esterilizado.

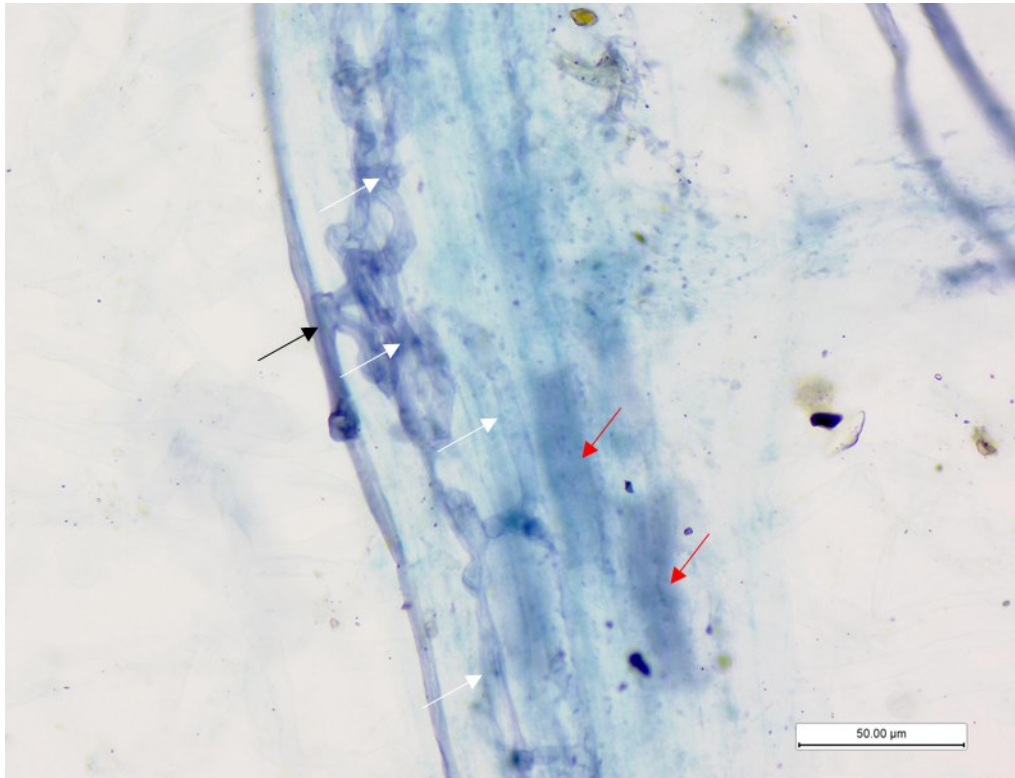


Figura 7. Detalhes de estruturas de FMA. Hifopódio (seta preta), hifas intraradiculares (setas brancas) e arbusculos (setas vermelhas) aos 26 DAE do FMA *R. intraradices* em raiz de milho.

Em estudo com milho e mesmo isolado de FMA, Stoffel (2019) observou um percentual médio de colonização micorrízica aos 30 dias de crescimento superior a 25% em solo não esterilizado. Aguegue *et al.* (2017) e Guo *et al.* (2014) observaram percentuais de colonização com outros isolados de *R. intraradices* de 20 a 35 % e superiores a 70 %, respectivamente, em 60 dias de crescimento. Nos trabalhos de Aguegue *et al.* (2017) e Guo *et al.* (2014) as plantas foram cultivadas a campo ou em vasos contendo um volume de solo muito maior a ser explorado. Este fator pode tanto inibir o crescimento das raízes, quando a colonização pelos FMA, sendo assim, o percentual de colonização observado neste trabalho, se enquadra com os valores e condições descritos na literatura.

As mesmas condições ambientais que interferem no crescimento das plântulas também podem interferir na germinação e início da colonização micorrízica, como por exemplo a disponibilidade de água, teores de nutrientes, pH e temperatura do solo (Clark, 1997). Nemeč (1987) identificou que temperaturas acima de 60 °C inviabilizaram os esporos de *R. intraradices*, enquanto Gavito *et al.* (2005) avaliando o crescimento de *R. intraradices* em temperaturas entre 6 e 30 °C observaram que entre 6 e 18 °C o crescimento do FMA é reduzido, e que o movimento de C da planta para o fungo está

envolvido nesta resposta. Em outro trabalho, um isolado de *R. intraradices* mostrou tolerância à 45 °C por até 24 h (Bendavid-Val *et al.*, 1997). Estes trabalhos mostram a capacidade dos propágulos de *R. intraradices* de germinarem e crescerem em uma ampla faixa de temperatura.

Outro fator é a disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente de P. Com o intuito de não inibir a associação, o solo selecionado possuía um teor de P classificado como muito baixo (SBCS, 2016), uma vez que o aumento dos teores de P geram efeitos diretos na germinação de esporos e no crescimento de hifas do FMA, diminuindo a germinação dos esporos e o crescimento das hifas (Miranda & Harris, 1994). Bem como o teor de P, o pH do solo pode influenciar na germinação e crescimento inicial dos FMA (Giovannetti, Avio; Sbrana, 2010). Algumas espécies de FMA são mais tolerantes à acidez do solo, como espécies do gênero *Acaulospora*, *Gigaspora* e até mesmo algumas do gênero *Glomus* como *G. manihotis* (Clark, 1997). Neste experimento, as plantas foram submetidas a um pH baixo (SBCS, 2016), indicando que o isolado de FMA *R. intraradices* do inoculante comercial é capaz de germinar e estabelecer uma associação com milho em pH de 4,9.

A ausência de efeito da inoculação na biomassa das plantas não surpreende nestas condições, mesmo havendo colonização micorrízica radicular significativa ao final do experimento. A inoculação pode modificar e aumentar o sistema radicular desde o começo da associação, aumentando o peso seco e número de raízes laterais primárias e secundárias (Bressan & Vasconcellos, 2002). O trabalho de Ludwig-Muller *et al.* (1997) mostra que a inoculação com *R. intraradices* aumentou o ácido indolbutírico (AIB) nos estádios iniciais do milho, uma auxina, que entre outras funções, estimula a formação de raízes adventícias pela ação sobre a divisão e alongamento celular (Fagan *et al.*, 2015), e o aumento de sua concentração estimulada pela colonização de FMA eleva o potencial de absorção de água e nutrientes das plantas ainda jovens.

O período de avaliação curto, bem como o espaço limitado para o crescimento das raízes dentro das placas de Petri podem ter interferido no crescimento das plantas. Neste estudo, os primeiros pontos de colonização micorrízica radicular foram observados apenas aos 9 DAE, e aos 13 DAE o percentual ainda era muito baixo (Figura 4), não havendo tempo para que os efeitos da simbiose interferissem no crescimento vegetal do hospedeiro dentro dos 26 DAE, tanto de biomassa aérea (Figura 5a), quanto de raízes.

Entretanto a avaliação de biomassa radicular não foi realizada porque todo o sistema radicular foi utilizado para avaliar os percentuais de colonização micorrízica.

Apesar disso, o crescimento de hifas e a formação de novos esporos extrarradiculares foram observados nas raízes de milho inoculadas até os 26 DAE (Figura 8a-d). A produção de hifas extrarradiculares estimulam a deposição de glomalina no solo, tanto pela exsudação quanto pela degradação das hifas que promovem a resistência física e química dos agregados do solo e estimulam a ação de outros microrganismos rizosféricos (Rillig & Mummey, 2006).

A inoculação em sementes tratadas também pode interferir na viabilidade e germinação dos propágulos, por isso as sementes foram lavadas para a retirada de todo o resíduo dos produtos do tratamento de sementes (TS) (Figura 1b). O TS viabiliza a inoculação em propriedades menos tecnificadas, entretanto é importante monitorar quais são os demais produtos aplicados na semente e a compatibilidade entre estes e o FMA utilizado. A aplicação via sulco de plantio é uma prática comum para inoculantes bacterianos, nutrientes em produtos líquidos e outras substâncias, pois muitos produtores não realizam nenhum tratamento de sementes na propriedade. Para ambas as formas de aplicação cuidados devem ser tomados, pois algumas moléculas fungicidas no TS reduzem a viabilidade de propágulos (Carrenho; Bononi; Graciolli, 2000; Campos *et al.*, 2015; Channabasaval; Lakshman; Jorquera, 2015; Cordeiro *et al.*, 2015; Cameron *et al.*, 2017) e a inoculação em tanque para sulco de plantio com coinoculação com outros microrganismos pode interferir no crescimento e produção de novos esporos de FMA (Calvet; Barea; Pera, 1992).

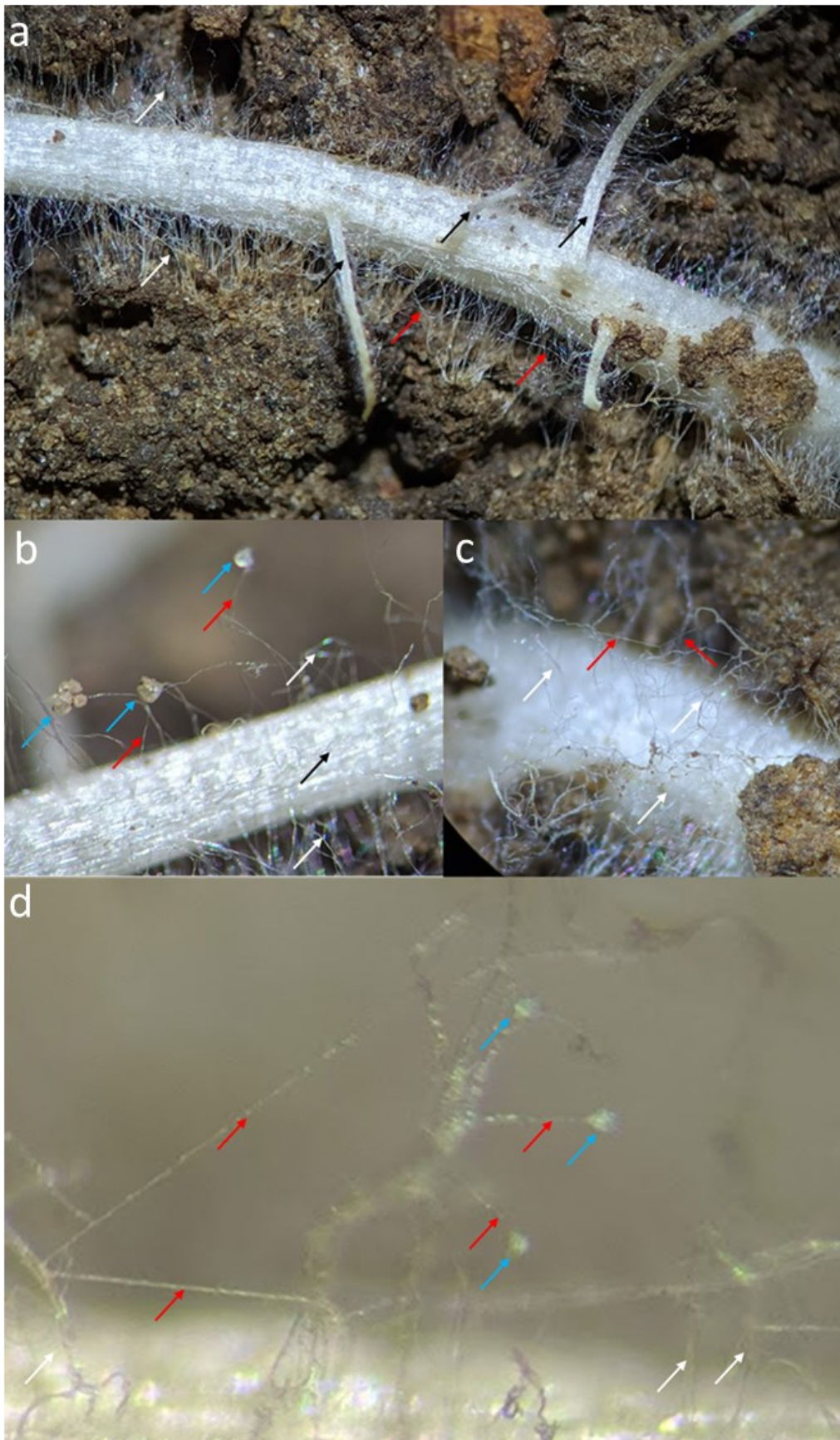


Figura 8. Raízes de milho inoculadas com produto comercial a base do FMA *R. intraradices* (a), detalhes do crescimento inicial de hifas em meio aos pelos radiculares e esporos em formação (b-d) aos 26 DAE. Setas indicam hifas extrarradiculares (vermelha), esporos (azul), raiz secundária (preta) e pelos radiculares (branca).

Neste trabalho as concentrações de proteínas do solo relacionadas a glomalina de fácil extração (GFE) aumentaram com o decorrer do tempo, mas não com a inoculação (Figura 5b). Isso pode ter ocorrido pela escolha do método utilizado de extração com citrato de sódio, onde são determinadas não só a glomalina depositada, mas todas as proteínas do solo de fácil extração (Sousa *et al.*, 2012), incluindo a biomassa de outros microrganismos do solo. A rizosfera é uma zona do solo em contato com a superfície das raízes onde a atividade e crescimento de microrganismos é estimulada pela deposição de substâncias pela raiz (York *et al.*, 2016). Apesar da esterilização do solo e do inoculante (nos tratamentos não inoculados) e da higienização das sementes, as plantas possuem microrganismos endofíticos que iniciam o processo de colonização da rizosfera (Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2014; Pal *et al.*, 2021). Estes microrganismos cooperam entre eles e favorecem o crescimento das plantas, principalmente quando as plantas estão submetidas a situações de estresse nutricional (Wu *et al.*, 2005). O crescimento destes microrganismos, promovidos pela deposição de açúcares e demais exsudatos radiculares na rizosfera, gera uma concentração maior de proteínas que podem ter colaborado com o aumento linear da GFE (Figura 5b). Quanto aos teores de GT que não se alteraram com a inoculação nem no decorrer das coletas, provavelmente não houve tempo hábil para aumentar a concentração de proteínas mais estáveis no solo pelo curto período de crescimento das plantas.

6.6. Conclusões

O inoculante à base de *R. intraradices* apresenta potencial para rápida colonização micorrízica, sendo as primeiras estruturas intraradiculares observadas aos 9 DAE e o estabelecimento em todas as plantas aos 26 DAE.

6.7. Referências bibliográficas

Adriano-Anaya, M. L.; Salvador-Figueroa, M.; Ocampo, J. A.; Garcia-Romera, I. (2006) Hydrolytic enzyme activities in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) roots inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Glomus intraradices*. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 879–886.

Aguegue, M. R.; Noumavo, P. A.; Dagbenonbakin, G.; Agbodjato, N. A.; Assogba, S.; Koda, A. D.; Adjanohoun, A.; Rivera, R.; Pons, B. N. M.; Baba-Moussa, L. (2017) Arbuscular Mycorrhizal Fertilization Of Corn (*Zea mays* L.) Cultivated on Ferrous Soil in Southern Benin. *Journal of Agricultural Studies*, ISSN 2166-0379, Vol. 5, No. 3.

Bendavid-Val, R.; Rabinowitch, H.D.; Katan, J.; Kapulnik, Y. (1997) Viability of VA-mycorrhizal fungi following soil solarization and fumigation. *Plant Soil* 195:185–193.

- Bonfante, P.; Genre, A. (2008) Plants and Arbuscular Mycorrhizal Fungi: An Evolutionary-Developmental Perspective. *Trends in Plant Science*, V. 13, N. 9, P. 492-8.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254.
- Bressan, W.; Vasconcellos, C. A. (2002) Alterações morfológicas no sistema radicular do milho induzidas por fungos micorrízicos e fósforo. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 37, n. 4, p. 509-517.
- Breuninger, M.; Trujillo, C. G.; Serrano, E.; Fischer, R.; Requena, N. (2004) Different nitrogen sources modulate activity but not expression of glutamine synthetase in arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Genet Biol* 41:542–552.
- Brundrett; M. C.; Walker, C.; Harper, C. J.; Krings, M. (2018) Fossils of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Give Insights Into the History of a Successful Partnership With Plants. In: Krings, M.; Harper, C. J.; Cúneo, N. R.; Rothwell, G. W. *Transformative Paleobotany*, Academic Press, Pages 461-480.
- Bücking, H.; Abubaker, J.; Govindarajulu. M.; Tala, M.; Pfeffer, P. E.; Nagahashi, G.; Lammers, P.; Shachar-Hill, Y. (2008) Root exudates stimulate the uptake and metabolism of organic carbon in germinating spores of *Glomus intraradices*. *New Phytol* 180:684–695.
- Calvet, C.; Barea, J. M.; Pera, J. (1992) *In vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. *Soil Biol Biochem* 24:775–780.
- Cameron, J. C.; Lehman, R. M.; P. Sexton.; Osborne, S. L. Taheri, W. I. (2017) Fungicidal Seed Coatings Exert Minor Effects on Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Nutrient Content. *Agronomy Journal*, v. 109, n. 3, p. 1005– 1012.
- Campos, A. A. B.; Scotton, J. C.; Costa, W. L. F.; Giassi, V.; Pinto, D. F. P. (2015) Seleção de fungicidas visando à preservação de fungos micorrízicos arbusculares nativos no cultivo do feijoeiro. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 19, n. 9, p. 898–902.
- Carrenho, R.; Bononi, V. L. R.; Graciolli, L. A. (2000) Effect of the fungicides Fosetyl Al and Metalaxyl on arbuscular mycorrhizal colonization of seedlings of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck grafted onto *C. limon* (L.) Burmf. *Acta Scientiarum*, v. 22, n. 2, p. 305-310.
- Channabasaval, A.; Lakshman, H. C.; Jorquera, M.A. (2015) Effect of fungicides on association of arbuscular mycorrhizafungus *Rhizophagus fasciculatus* and growth of Proso millet (*Panicum miliaceum* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 15, n. 1, p. 35-45.
- Clark, R. B. (1997) Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant Soil* 192:15–22.

Conab (2023) Conab prevê novo recorde na produção de grãos em 312,4 milhões de toneladas na safra 2022/23. Acesso: 15/01/23. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4774-conab-preve-novo-recorde-na-producao-de-graos-em-312-4-milhoes-de-toneladas-na-safra-2022-23>>

Cordeiro, M. A. S.; Ferreira, D. A.; Paulino H. B.; Souza, C. R. F. Siqueira, J. O.; Carneiro, M. A. C. (2015) Mycorrhization stimulant based in formononetin associated to fungicide and doses of phosphorus in soybean in the Cerrado. Biosci. J., Uberlândia, v. 31, n. 4, p. 1062-1070.

Corradi, N.; Sanders, I. R. (2006) Evolution of the P-type II ATPase gene family in the fungi and presence of structural genomic changes among isolates of *Glomus intraradices*. BMC Evol Biol 6:21.

Crosino, A.; Genre, A (2022) Peace talks: Symbiotic signaling molecules in arbuscular mycorrhizas and their potential application. Journal of Plant Interactions, vol. 17, No. 1, 824–839.

Douds, D. D.; Nagahashi, G.; Abney, G. D. (1996) The differential effects of cell wall associated phenolics, cell walls, and cytosolic phenolics of host and non-host roots on the growth of two species of AM fungi. New Phytol 133:289–294.

Estrada, B. Barea, J. M.; Aroca, R.; Ruiz-Lozano, J. M. (2013) A native *Glomus intraradices* strain from a Mediterranean saline area exhibits salt tolerance and enhanced symbiotic efficiency with maize plants under salt stress conditions. Plant Soil 366:333–349.

Fagan, E. B.; Ono, E. O.; Rodrigues, J. D.; Chalfun-junior, A.; Neto, D. D. (2015) Auxinas. In: Fagan, E. B.; Ono, E. O.; Rodrigues, J. D.; Chalfun-junior, A.; Neto, D. D. Fisiologia vegetal: Reguladores vegetais. Andrei, 61-94, 300p.

Fracasso, A.; Telò, L.; Lanfranco, L.; Bonfante, P.; Amaducci, S. (2020) Physiological Beneficial Effect of *Rhizophagus intraradices* Inoculation on Tomato Plant Yield under Water Deficit Conditions. Agronomy, 10, 71.

Gachomo, E.; Allen, J. W.; Pfeiffer, P. E.; Govindarajulu, M.; Douds, D. D.; Jin, H.; Nagahashi, G.; Lammers, P. J.; Shachar-Hill, Y.; Bücking, H. (2009) Germinating spores of *Glomus intraradices* can use internal and exogenous nitrogen sources for de novo biosynthesis of amino acids. New Phytol 184:399-411.

Gavito, M. E.; Olsson, P. A.; Rouhier, H.; Medina-Peñafiel, A.; Jakobsen, I.; Bago, A.; Azcón-Aguilar, C. (2005) Temperature constraints on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 168: 179–188.

Genre, A.; Bonfante, P. (2010) The Making of Symbiotic Cells in Arbuscular Mycorrhizal Roots. In: Koltai, H.; Kapulnik, Y. Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Wageningen: Springer. P. 3-32.

Giovannetti, M.; Avio, L.; Sbrana, C. (2010) Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth: physiological and genetic aspects. In: Koltai, H.; Kapulnik, Y. Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Wageningen: Springer. P. 3-32.

- Guo, W.; Zhao, R.; Fu, R.; Bi, N.; Wang, L.; Zhao, W.; Guo, J.; Zhang, J. (2014) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the development of maize (*Zea mays* L.) grown in three types of coal mine spoils. *Environ Sci Pollut Res* 21:3592–3603.
- Hart, M. M.; Antunes, P. M.; Chaudhary, V. B.; Abbott, L. K. (2017) Fungal inoculants in the field. Is the reward greater than the risk. *Functional Ecology*, 1–10.
- INVAM. (2021) International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Rhizophagus intraradices* (reference accession UT126). Disponível em: <<http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/rhizophagus/intraradices.html>>. Acesso em: 15/02/2021.
- Juge, C.; Samson, J.; Bastien, C.; Vierheilig, H.; Coughlan, A.; Piche, Y. (2002) Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. *Mycorrhiza* 12:37–42.
- Koske, R. E.; Gemma, J. N. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* 92(4):486-505.
- Lambais, M. R.; Ramos, A. C. (2010) Sinalização e transdução de sinais em micorrizas arbusculares. In: Siqueira, J. O.; Souza, F. A.; Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M. *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil*, Lavras: UFLA. P. 119-132.
- Li, H.; Wang, C.; Li, X.; Xiang, D. (2013) Inoculating maize fields with earthworms (*Aporrectodea trapezoides*) and an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) improves mycorrhizal community structure and increases plant nutrient uptake. *Biol Fertil Soils* 49:1167–1178.
- Liang, S. M.; Zheng, F. L.; Wu, Q. S. (2022) Elucidating the dialogue between arbuscular mycorrhizal fungi and polyamines in plants. *World J Microbiol Biotechnol* 38, 159.
- Liu, C. Y.; Guo, X. N.; Wu, X. L.; Dai, F. J. Wu, Q. S. (2022) The Comprehensive Effects of *Rhizophagus intraradices* and P on Root System Architecture and P Transportation in *Citrus limon* L.
- Logi, C.; Sbrana, C.; Giovannetti, M. (1998) Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Appl Environ Microbiol* 64:3473–3479.
- Louis, I.; Lim, G. (1988) Effect of storage of inoculum on spore germination of a tropical isolate of *Glomus clarum*. *Mycologia* 80:157–161.
- Ludwig-Müller, L.; Kaldorf, M.; Sutter, E. G.; Epstein, E. (1997) Indole- ‘3-butyric acid (IBA) is enhanced in young maize (*Zea mays* L.) roots colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Plant Science*. Volume 125, Issue 2, 30 June, Pages 153-162.
- Magalhães, P. C.; Durães, F. O. M. (2002) Cultivo do milho. Germinação e Emergência. Comunicado técnico, Embrapa, Sete Lagoas, MG. ISSN 1679-0162.

- Maia, L. C.; Silva, F. S. B.; Goto, B. T. (2010) Estrutura e germinação de glomerosporos. In: Siqueira, J. O.; Souza, F. A.; Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M. Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil. Editora UFLA. Lavras, 716 p.
- Malcová, R.; Vosátka, M.; Gryndler, M. (2003) Effects of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays* L. and *Agrostis capillaris* L. Applied Soil Ecology 23, 55–67.
- Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2.ed. London, Academic Press, 319p.
- McGonigle, T. P.; Millers, M. H.; Evansg, D. G.; Fairchild, L.; Swan, J. A. (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 115, 495.
- Miranda, J. C. C.; Harris, P. J. (1994) Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. New-Phytol, 128, 103-108.
- Nemec, S. (1987) Effect of storage temperature and moisture on *Glomus* species and their subsequent effect on *Citrus* rootstock seedling growth and mycorrhiza development. Trans Br Mycol Soc 89:205–212.
- Pal, G.; Kumar, K.; Verma, A.; Verma, S. K. (2021) Seed inhabiting bacterial endophytes of maize promote seedling establishment and provide protection against fungal disease. Microbiological Research 255, 126926.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rillig, M. C.; Mummey, D. L. (2006) Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist 171: 41–53.
- Sangoi, L.; Silva, P. R. F. (2016) Crescimento, desenvolvimento e épocas de semeadura. In: Filho, J. A. W.; Chiaradia, L. A. A cultura do milho em Santa Catarina. 3ed. Epagri, 400p.
- SBCS. (2016) Sociedade Brasileira De Ciência Do Solo. Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 11.ed. 376 p.
- Smith, S. E.; Read, D. J. (2008) Mycorrhizal Symbiosis, 3rd Edn. London: Academic.
- Sousa, C. S.; Menezes, R. S. C.; Sampaio, E. V. S. B.; Lima, F. S. (2012) Glomalina: características, produção, limitações e contribuição nos solos. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, suplemento 1, p. 3033-3044.
- Stoffel, S. C. G.; Soares, C. R. F. S.; Meyer, E.; Lovato, P. E. Giachini, A. J. (2020a) Yield increase of corn inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. Ciência Rural, v.50:7, e20200109.
- Stoffel, S. C. G.; Soares, C. R. F. S.; Meyer, E.; Lovato, P. E. Giachini, A. J. (2020b) Yield increase of soybean inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. Afr. J. Agric. Res, Vol. 16(5), pp. 702-713.

Szilagyi-Zecchin, V. J.; Ikeda, A. C.; Hungria, M.; Adamoski, D.; Kava-Cordeiro, V.; Glienke, C.; Galli-Terasawa, L. V. (2014) Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express*. 7; 4:26.

Wright, S.; Upadhyaya, A. A. (1996) Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, Baltimore, v. 161, p. 575-586.

Wu, S. C.; Cao, Z. H.; Li, Z. G.; Cheung, K. C.; Wong, M. H. (2005) Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125, 155–166.

York, L. M.; Carminati, A.; Mooney, S. J.; Ritz, K.; Bennett, M. J. (2016) The holistic rhizosphere: integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 67, No. 12 pp. 3629–3643.

Zhao, R.; Guo, W.; Bi, N.; Guo, J. Wang, L.; Zhao, J.; Zhang, J. (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi affect the growth, nutrient uptake and water status of maize (*Zea mays* L.) grown in two types of coal mine spoils under drought stress. *Applied Soil Ecology* 88, 41–49.

7. CAPÍTULO 2. Efeitos da aplicação do inoculante micorrízico à base de *Rhizophagus intraradices* e adubos fosfatados sobre a produtividade do milho e atributos biológicos do solo

Resumo

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) colonizam as raízes lançando suas hifas no solo, formando uma rede de micélio que atua como uma extensão do sistema radicular, absorvendo água e nutrientes para as plantas (notadamente P), modificando características físicas, químicas e biológicas do solo, em troca de carboidratos da fotossíntese. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de um inoculante comercial à base de *Rhizophagus intraradices* combinado com fontes de P de diferentes solubilidades, na produtividade de milho e seus efeitos na absorção e disponibilização de P, no efeito residual de P e atributos químicos e biológicos do solo. Os tratamentos de adubação testados foram: superfosfato simples (SS), superfosfato triplo (ST), fosfato natural (FN), e um tratamento sem adubação fosfatada (-P). Foram realizados dois ciclos de cultivo (19/20 e 20/21), nos quais o milho foi semeado em parcelas com sementes inoculadas (FMA) e não inoculadas (NI), e nas subparcelas foram aplicadas às diferentes fontes de P. No segundo ano, o milho foi semeado sobre as mesmas parcelas, não sendo realizadas novas adubações fosfatadas. O solo permaneceu em pousio entre os dois ciclos. As avaliações realizadas foram: rendimento de grãos, teor de P e N foliar e de grãos, teor de glomalina total e facilmente extraível, atividade das enzimas β -glucosidase e arilsulfatase, disponibilidade de P, pH do solo, carbono orgânico total, e parâmetro de fotossíntese. Os teores de P no solo variaram em função da inoculação e dos tratamentos de P no início do primeiro ciclo e ao final do segundo. A atividade da β -glucosidase variou em função da inoculação e do efeito residual dos adubos fosfatados ao final segundo ciclo. Não foram observados efeitos na atividade da enzima arilsulfatase no período e tratamentos avaliados. A produtividade das plantas apresentou acréscimo de 19 % quando inoculadas no primeiro ciclo de cultivo, independente da adubação fosfatada realizada. No segundo ciclo, as plantas inoculadas responderam em produtividade de maneira diferente ao efeito residual dos adubos fosfatados, com uma redução média de 35 % no FN e SS e aumento de 44 % no ST.

7.1. Introdução

O cultivo do milho (*Zea mays* L.) é destinado principalmente à produção de grãos e silagem e demanda em média 33 kg de P ha⁻¹ (75,6 kg de P₂O₅), sendo que em torno de 80 % do P é transcolado para os grãos e retirado do sistema com a colheita (Coelho *et al.*, 2008). O fósforo (P) é um elemento essencial para o crescimento das plantas (Novais & Smyth, 1999) e quando disponível em baixas concentrações no solo, podem ter seu crescimento limitado, o que gera perdas na agricultura (Barreto & Fernandes, 2002; Coelho, 2006). Por esse motivo, o sistema agrícola produtivo adotado no Brasil exige um grande aporte de fertilizantes fosfatados (Chien & Menon, 1995), recurso esse que além de ser finito (Cordell; Drangert; Whaite, 2009) o Brasil não é autossuficiente na produção (Brasil, 2016), ocupando uma parcela significativa dos custos da lavoura. Para manter a disponibilidade de P nos solos agrícolas, são utilizadas fontes de com alta solubilidade (fosfato monoamônico - MAP, fosfato diamônico - DAP, superfosfato simples - SS e superfosfato triplo - ST) (Alcarde, 2007) e com baixa solubilidade em água (fosfatos naturais, nitrofosfatos e termofosfatos) (Khasawneh & Doll, 1978). Cada um promove modificações diferentes no solo de acordo com suas características e condições ambientais.

O P é absorvido pelas raízes das plantas na forma inorgânica (P_i) H₂PO₄⁻ (ácido fosfórico ou ortofosfórico) que costuma ser a menor fração de P nos solos (Fink *et al.*, 2016). É uma molécula que pode facilmente se ligar às cargas do solo, como os óxidos de Fe, Al e Mn da superfície dos coloides (Dalal, 1977; Fink *et al.*, 2016), bem como aluminossilicatos, e na matéria orgânica do solo (MOS) (Novais; Smyth; Nunes, 2007). Existem metodologias que estimam as diferentes frações de P no solo. O P_i-resina trocadora de ânions (P_{i-RTA}) é apenas uma das frações de P, e é o resultado da interação e equilíbrio entre as frações de P_i e P orgânico (P_o) na solução do solo (Hedley; Stewart; Chauhan, 1982; Gatiboni; Kaminski; Santos, 2007; Santos; Gatiboni; Kaminski, 2008).

Para aumentar a eficiência do P no solo é possível fazer uso de microrganismos capazes de solubilizar, mineralizar e captar nutrientes do solo para as plantas como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Smith & Read, 1997). Os FMA são um grupo de microrganismos pertencentes ao filo Glomeromycota e que estão intimamente inseridos no ciclo de P no solo (Smith & Read, 2008). Nessa associação, os esporos dos FMA germinam e as hifas colonizam o córtex radicular, em seguida o micélio

extrarradicular (MER) cresce atuando como uma extensão das raízes, absorvendo água e nutrientes (notadamente P) para a planta (Marschner, 1995; Smith & Read, 2008). Em troca as plantas fornecem carboidratos da fotossíntese para os FMA pelos arbúsculos (Varma, 2008; Bonfante & Genre, 2010), a única fonte de carbono do FMA para sustentar seu crescimento.

O MER explora um volume maior de solo do que o potencial de exploração do sistema radicular, aumentando a eficiência dos nutrientes do solo (Smith & Smith, 2011). A degradação de suas hifas deposita no solo uma glicoproteína hidrofóbica chamada glomalina, que está positivamente correlacionada com a estabilidade dos agregados do solo (Rillig, 2004; Rillig & Mummey, 2006; Wright; Green; Cavigelli, 2007), reduzindo os riscos de erosão de grande parte dos solos mal estruturados (Wright & Upadhyaya, 1996; Wright; Starr; Paltineanu, 1999; Wright; Green; Cavigelli, 2007). Esta estabilidade dos agregados facilita as trocas gasosas, a infiltração de água e o crescimento de raízes. Além disso, o MER altera a dinâmica de nutrientes em toda sua superfície (micorrizosfera), podendo acidificar essa região próxima do micélio, aumentando a solubilidade de fosfatos inorgânicos (Moreira & Siqueira, 2006; Ferrol; Azcón-Aguilar; Pérez-Tienda, 2018).

A ação dos FMA pode estimular a atividade de outros microrganismos solubilizadores de fosfato da micorrizosfera (Giri *et al.*, 2005; Smith & Read, 2008; Tang *et al.*, 2009; Priyadharsini *et al.*, 2017; Thirkell *et al.*, 2017; Kothe & Turnau, 2018), bem como a associação com FMA pode potencializar a capacidade de absorção de P por meio da liberação de fosfatases ácidas no solo que mineralizam o P_o (Marschner & Dell, 1994; Conte; Anghinoni; Rheinheimer, 2003; Sato *et al.*, 2015; Adetunji *et al.*, 2017). A atividade de fosfatases ácidas é sensível ao decréscimo da disponibilidade de P do solo, que causa diminuição do P microbiano e aumento da atividade dessas enzimas (Gatiboni; Kaminski; Santos, 2007). Estes efeitos podem ser mais significativos quando as plantas estão submetidas a alguma condição estressante, como déficit hídrico e baixa fertilidade do solo (Ruiz Lozano, 2003; Nogueira & Cardoso, 2007), baixa disponibilidade de nutrientes (Marschner & Dell, 1994), salinidade, acidez (Ruiz-Lozano, 2003; Folli-Pereira *et al.*, 2012) e toxidez por metais (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2004; Cornejo *et al.*; 2008; Vodnik *et al.*, 2008).

Uma espécie de FMA frequentemente encontrada no mercado nacional e internacional é a *Rhizophagus intraradices* (*Glomus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler), comercializada tanto como organismo único em formulações comerciais quanto misturado a outros gêneros de FMA (Control Bio, 2018, NovaTero, 2022; Lallemand, 2023; Sumitomo, 2023). O FMA *R. intraradices* é uma espécie generalista de crescimento rápido, que produz grande quantidade de esporos (INVAM, 2021), portanto, ótimo candidato para a formulação de produtos comerciais. É uma espécie considerada modelo pela extensa lista de trabalhos avaliando genoma (Fontaine, *et al.*, 2021; Fontaine; Grandmougin; Sancholle, 2001; Porcel *et al.*, 2006; Croll *et al.*, 2009; Estrada *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2021), efeitos no crescimento das plantas (Li *et al.*, 2013), germinação (Logi; Sbrana; Giovannetti, 1998; Juge *et al.*, 2002; Trépanier *et al.*, 2005; Crosino & Genre, 2022; Liang; Zheng; Wu, 2022), em diferentes condições ambientais (Gachomo *et al.*, 2009) e *in vitro* (Fontaine, *et al.*, 2021; Fontaine; Grandmougin; Sancholle, 2001; Porcel *et al.*, 2006). Trabalhos com a inoculação de *R. intraradices* mostram o efeito da inoculação dessa espécie no crescimento de plantas como soja, trigo e tabaco em diferentes condições (Ardakani *et al.*, 2011; Bidondo *et al.*, 2011; Meghvansi & Mahna, 2009; Sena *et al.*, 2014; Spagnoletti & Lavado, 2015; Stoffel *et al.*, 2020a,b). Trabalhos mostram o efeito de *R. intraradices* no aumento da tolerância à estresses abióticos como a presença de arsênio (As) (Spagnoletti & Lavado, 2015), maior rendimento da soja coinoculada com *R. intraradices* e *Bradyrhizobium japonicum* (Meghvansi & Mahna, 2009) ou *Paenibacillus* (Bidondo *et al.*, 2011), estímulo da colonização micorrízica radicular e da produção de milho (Guo *et al.*, 2014).

Bioindicadores de qualidade do solo, como a respiração basal do solo, o carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana (CBM e NBM), a atividade das enzimas β -glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase (Araújo & Monteiro, 2007) podem ser relacionadas à sanidade e produtividade das plantas. A β -glucosidase catalisa a celulose, tendo como produto a glicose, fonte de energia para o crescimento de microrganismos do solo (Adetunji *et al.*, 2017). A arilsulfatase participa do ciclo do S, hidrolisando ésteres de aril sulfato de compostos orgânicos, o que libera íons sulfato na solução do solo (Balota *et al.*, 2013). Sendo assim, bioindicadores como a atividade da β -glucosidase e da arilsulfatase são ótimos para estimar a qualidade biológica do solo (Mendes *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2018) e entender como a inoculação de FMA interage com as variáveis

químicas, físicas e biológicas do solo quando expostas à adubos fosfatados mais ou menos solúveis.

Espera-se que os diferentes tratamentos de adubos apresentem teores de P no solo diferentes no decorrer dos ciclos em função da dinâmica de solubilização e do efeito residual de cada um. O estudo objetivou investigar a capacidade da associação de milho com um FMA oriundo de um inoculante comercial em alterar a absorção e disponibilização de P sob efeito da adubação de fertilizantes com diferentes solubilidades, bem como avaliar a melhoria das características químicas e biológicas do solo e o efeito residual dos adubos no decorrer de dois ciclos.

7.2. Material e Métodos

7.2.1. Área experimental

O experimento foi realizado em uma propriedade agrícola na comunidade Felipe Schimidt, no município de Canoinhas (SC) ($26^{\circ}11'32.7''S$ $50^{\circ}37'22.1''W$) (Figura 1). A área experimental possuía aproximadamente 2 mil m^2 , entretanto, alguns espaços laterais próximos a vegetação não foram utilizados em função de intenso sombreamento durante diferentes períodos do dia. Na classificação climática de Köppen-Geiger, a área experimental foi definida como Cfa (clima subtropical úmido com precipitação abundante e bem distribuída ao longo de todo o ano).



Figura 1. Localização da propriedade utilizada para a área experimental na comunidade Felipe Schimidt no município de Canoinhas (SC). <https://goo.gl/maps/UbAsbBN1fJmFqNpN7>

A área experimental estava localizada em uma região coberta por Mata Atlântica, com superfície plana e com histórico de pelo menos três anos de cultivo de soja

e milho em plantio convencional. Características físico-químicas antes do primeiro cultivo: 43 % de argila; pH = 6,06; MOS = 38,0 mg dm⁻³; P = 12,5 mg dm³ (Tabela 1). Temperatura média do primeiro e segundo ciclo foi de 19,8 e 20,64 °C, e a precipitação total foi de 297 e 725 mm, no primeiro e segundo ciclo, respectivamente (Figura 2).

Tabela 1. Análise de solo inicial da área experimental na comunidade Felipe Schimidt no município de Canoinhas (SC)

Argila%	pH H ₂ O	Índice SMP	P	K	MO	AL	Ca	Mg
			mg dm ⁻³			%	cmol _c dm ⁻³	
42	6,06	6,33	12,5	1,21	3,9	0,58	10,5	5,18
H+Al	CTC	Saturação	CTC			Relações		
cmol _c dm ⁻³		Al	V	S	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	
4,26	21,5	6,12	75,7	16,86	2,03	8,68	4,28	

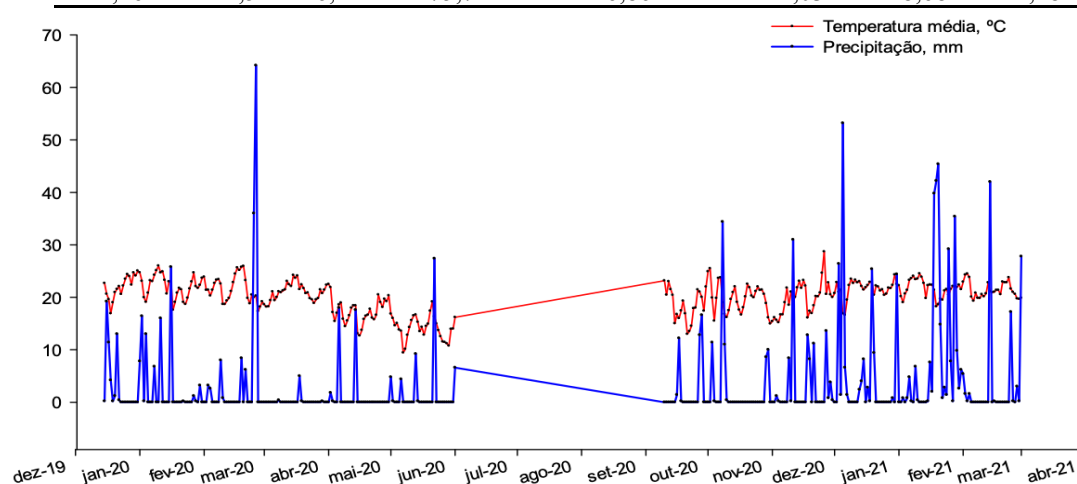


Figura 2. Temperatura média e precipitação durante os dois ciclos de cultivo de milho na região da área experimental na comunidade Felipe Schimidt no município de Canoinhas (SC). Fonte: Epagri (2021).

7.2.2. Delineamento experimental

O trabalho foi realizado em dois ciclos de cultivo, o primeiro no verão de 2019/2020 e o segundo no verão de 2020/2021. O experimento foi delineado em um esquema fatorial 4x2 com 4 repetições. Cada bloco continha duas parcelas (3,25 m x 30 m): uma inoculada e outra não inoculada com FMA. Cada parcela foi subdividida em quatro subparcelas, onde foram distribuídos aleatoriamente cada um dos quatro tratamentos de adubação: fosfato natural (FN), superfosfato simples (SS), superfosfato triplo (ST) e um controle negativo sem P (-P). Cada subparcela continha 10,7 m² de área útil (1,95 m x 5,5 m) (Figura 3).

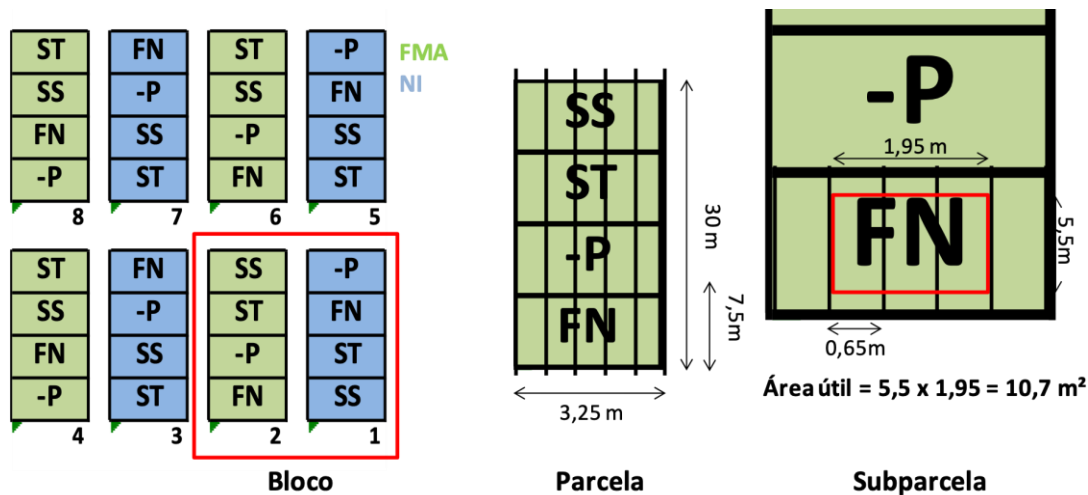


Figura 3. Desenho esquemático dos experimentos montados a campo com milho em parcelas subdivididas. Sem adubação fosfatada (-P); fosfato natural (FN); superfosfato simples (SS); superfosfato triplo (ST). Fator inoculação no milho: solo inoculado (FMA); solo não inoculado (NI).

No primeiro ano foi avaliada a interação da inoculação e as diferentes fontes de fósforo ao longo do ciclo do milho. No segundo ciclo as sementes de milho foram semeadas sobre as mesmas parcelas refazendo o procedimento de inoculação nas parcelas inoculadas e sem repetir a adubação fosfatada, para avaliar a interação do FMA e do efeito residual dos diferentes adubos fosfatados.

7.2.3. Insumos

As quantidades dos diferentes adubos equivalentes ao hectare aplicados a lanço nas subparcelas foram: FN = 362 kg ha⁻¹; SS = 656 kg ha⁻¹; ST = 243 kg ha⁻¹. O FN utilizado foi o fosfato natural reativo Bayovar (Perú) da Heringer. As doses foram definidas de acordo com os teores totais de P₂O₅ em cada um dos produtos (FN = 30 %; SS = 16 %; ST = 46 %) (Tabela 1), equivalendo a um total de 105 kg P₂O₅ ha⁻¹ aplicados em cada um dos tratamentos seguindo as recomendações do Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SBCS, 2016). Além da adubação fosfatada, todos os tratamentos, tanto no primeiro, quanto no segundo ciclo, receberam um adubo misto de ureia e cloreto de potássio (18-00-18) na semeadura no peso equivalente a 170 kg ha⁻¹, e o equivalente a 205 kg ha⁻¹ de ureia em superfície 30 dias após a semeadura.

Tabela 2. Teores de P₂O₅ com diferentes extratores e demais nutrientes dos adubos fosfatados. FN = fosfato natural; SS = superfosfato simples; ST = superfosfato triplo; - = dados não informados; CNA = citrato neutro de amônio.

Fertilizantes	Total	CNA+ H ₂ O	Ác. Cítrico	H ₂ O	Ca	S
FN	30,0	-	10,0	-	33,0	-
SS	-	19,0	-	15,0	20,0	9,0
ST	-	46,0	-	36,0	16,0	-

As sementes utilizadas para o primeiro cultivo foram da cultivar STATUS TG da Syngenta (de ciclo precoce), com altura média das plantas de 240 cm, inserção da espiga em 120 cm. No segundo cultivo a semente utilizada foi da cultivar SHS SUPERR da Santa Helena (de ciclo precoce), com altura média de 240 cm e inserção da espiga em 155 cm.

A inoculação do FMA foi realizada no tratamento de sementes utilizando o “método do saco” seguindo a recomendação de 120 g do produto em pó no volume de sementes recomendada para um hectare. No método do saco, as sementes dentro de um saco recebem a quantidade recomendada do inoculante e em seguida todo o material foi agitado repetidamente dentro do saco até que o produto fique aderido às sementes de forma homogênea (Figura 4). O inoculante à base do fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices*, de nome comercial Rootella BR (registrado sob nº 22902 10000-0), continha mais de 20.800 propágulos por grama de produto, em uma mistura de vermiculita, argila e partículas não identificadas (respectivamente 82, 6 e 12 %). As informações dos inoculantes utilizados são: primeiro cultivo - Lote de fabricação (LTF) 61497; data de fabricação 10/10/18 e validade até 11/10/20, e no segundo cultivo: LTF 62186; data de fabricação 20/05/19; e validade até 21/05/21.



Figura 4. Sementes de milho recebendo o inoculante micorrízico à base de *Rhizophagus intraradices* (a); Imagem do perfil do solo anexo a área experimental (b); área experimental no dia da semeadura do primeiro cultivo (c).

7.2.4. Avaliações

Foram realizadas coletas de folhas, raízes, grãos e solo durante os dois cultivos em diferentes estágios de crescimento do milho (Tabela 2) para avaliar o estado nutricional das plantas, a produtividade, além de identificar alterações químicas e microbiológicas no solo. Os estágios de crescimento avaliados foram no dia do plantio (V0), estágio vegetativo com cinco folhas expandidas completamente formadas (V5) (apresentando colar, lígula e aurícula visíveis), reprodutivo com grãos em forma de bolha (R2) e no estágio reprodutivo da maturação fisiológica dos grãos com seu máximo peso seco (R6) (Sangoi & Silva, 2016). A semeadura do primeiro ciclo foi realizada dia 19/12/19, e a colheita 21/05/20. Já a do segundo ciclo foi feita no dia 20/09/20 e a colheita em 20/02/21.

Tabela 3. Cronograma das amostragens e coletas realizadas durante os dois cultivos de milho.

Amostra	1º cultivo			2º cultivo		
	V5 21/01/20	R2 07/03/20	R6 21/05/20	V0 20/09/20	R2 02/01/21	R6 20/02/21
Solo		X	X	X		X
Folhas	X	X			X	
Raiz			X			X
Grãos			X			X

Uma amostra de solo composta de quatro pontos nas linhas de plantio dentro de cada subparcela foi realizada na camada de 0 a 10 cm do solo. Durante o 1º cultivo foram

realizadas três coletas de solo (V0, R2 e R6), e mais duas no 2º cultivo (V0 e R6). Das amostras de solo foram realizadas avaliações químicas como o pH do solo em água, teor de P no solo pelos métodos de resina trocadora de cátions e ânions, Mehlich 1, Mehlich 3, e fósforo remanescente (Tedesco; Gianello; Bissani, 1995), além da matéria orgânica do solo pelo método de determinação do carbono orgânico total multiplicado pelo fator 1,724 (Mendonça & Matos, 2017).

Outra parte das amostras foi destinada para as avaliações relacionadas à atividade biológica do solo. A avaliação do teor de glomalina total e facilmente extraível do solo foi feita por meio da extração pelo método de Wright e Upadhyaya (1996) e determinação pelo método de Bradford (1976). A atividade das enzimas β -glucosidase e arilsulfatase seguiram a metodologia proposta por Tabatabai (1994).

Cada amostra foi composta por quatro plantas dentro da área útil das subparcelas. As folhas selecionadas variaram de acordo com o estágio de crescimento das plantas, sendo que no estágio V5, a folha selecionada foi a terceira completamente aberta, enquanto no estágio R2, a folha coletada foi sempre a posicionada logo abaixo da espiga. Amostras de tecido vegetal foram destinadas para a determinação dos teores de pigmentos seguindo a metodologia de Wellburn (1994), utilizando o composto dimetilsulfóxido (DMSO) por 24h com posterior leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm. Estas avaliações têm por intuito determinar os teores de carotenoides, clorofila *a* e *b*, expressos em mg cm^{-2} . Juntamente, foram realizadas leituras com SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) para determinar o índice SPAD nestes mesmos estágios.

Amostras de folhas (junto à determinação de clorofila) foram coletadas e secas em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C. Na sequência, 0,2 g de biomassa seca (BS) foram submetidos à digestão sulfúrica para determinação dos teores de P e N por espectrofotometria (Tedesco; Gianello; Bissani, 1995), expressos em g de P kg BS^{-1} .

Amostras de raízes de aproximadamente 2,0 g foram coletadas das plantas espontâneas (majoritariamente centeio) que emergiram após o primeiro ciclo de cultivo, e no estágio R6 do milho no segundo ciclo. As raízes foram submetidas à clarificação e coloração com azul de tripan (Koske & Gemma, 1989) para avaliação da colonização micorrízica seguindo o método de McGonigle *et al.* (1990). Esta determinação foi

realizada pela visualização de hifas, arbúsculos e vesículas em microscópio óptico em aumento de 200x.

7.2.5. Tratamento estatístico e análise dos resultados

Os dados foram submetidos à análise de homogeneidade e variância, e submetidos ao teste de comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade utilizando o software R Core Team (2021).

7.3. Resultados

O teor médio de P no solo das quatro coletas extraído pelo método de resina trocadora de ânions foi de 7,40 mg P dm⁻³, variando de 3,09 a 13,65 mg P dm⁻³. Houve efeito da interação dos fatores na primeira e última coleta, onde vale destacar os elevados teores de P com a adubação com SS (13,65 mg P dm⁻³) e ST (9,58 mg P dm⁻³) na coleta R2 do primeiro cultivo quando não inoculado, e no tratamento inoculado e não adubado na coleta R6 do segundo cultivo (11,48 mg P dm⁻³), onde a inoculação promoveu acréscimo de 80 % no P disponível (Figura 5).

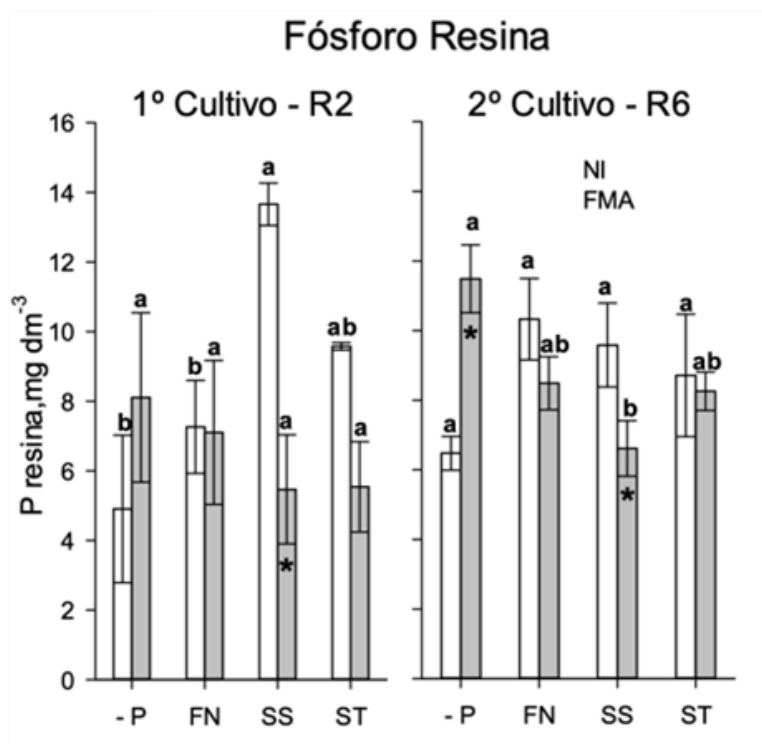


Figura 5. Teores de fósforo resina nos diferentes estágios de crescimento do 1º e 2º cultivo de milho. Ns = não significativo; -P = sem adubo fosfatado; FN = fosfato natural; SS = superfosfato simples; ST = superfosfato triplo; * efeito significativo da inoculação dentro do mesmo fator “adubação”; letras minúsculas diferentes indicam efeito significativo do fator “adubação” dentro do mesmo fator “inoculação”.

A colonização micorrízica total média das plantas espontâneas que germinaram após o 1º cultivo do milho foi 37,7 % menor nas parcelas inoculadas (Figura 6a). No milho do segundo cultivo, a colonização das plantas inoculadas foi 301 % maior no tratamento que não recebeu adubo fosfatado (Figura 6b).

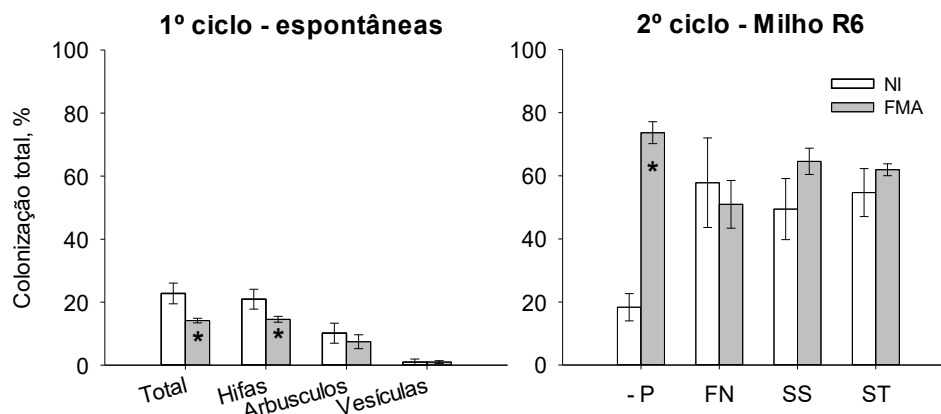


Figura 6. Colonização micorrízica das plantas espontâneas entre os dois ciclos de cultivo (a), colonização total(b), por hifas (c), arbúsculos (d) e vesículas(e) do milho diferentes estágios de crescimento do 1º e 2º cultivo de milho. ns = não significativo; -P = sem adubo fosfatado; FN = fosfato natural; SS = superfosfato simples; ST = superfosfato triplo; * efeito significativo da inoculação dentro do mesmo fator “adubação”; letras minúsculas diferentes indicam efeito significativo do fator “adubação” dentro do mesmo fator “inoculação”.

A média da matéria orgânica do solo (MOS) calculada sobre a determinação do carbono orgânico total (COT) foi de 4,13 % (23,94 mg g⁻¹ de COT) nos dois cultivos, variando de 3,7 a 4,9 %. Apesar da MOS ter se apresentado menor nos tratamentos inoculados (R6 do primeiro cultivo: NI = 4,22 %; FMA = 4,05 % e R6 do segundo cultivo: NI = 4,29 %; FMA = 4,07 %), houve pouco efeito dos tratamentos sobre a concentração de MOS, permanecendo dentro da faixa de teor de MOS classificada como médio (2,6-5,0 %) (SBCS, 2016). Quanto às concentrações de proteínas do solo relacionadas a glomalina, não houve efeito dos tratamentos, tanto na facilmente extraível (GFE), quanto na total (GT). As médias das quatro coletas de GFE e GT foram de 0,73 e 1,77 mg g solo⁻¹, respectivamente.

O efeito dos tratamentos sobre a atividade enzimática do solo foi observado na resposta da atividade da β -glucosidase ao final do segundo cultivo (R6) (Figura 7a). Em média, a atividade da β -glucosidase foi 53,14 e 58,24 μ g de *p*-nitrofenol kg⁻¹ solo h⁻¹ ao final do primeiro e segundo ciclo, respectivamente. Ao final do segundo ciclo, a inoculação com FMA reduziu 15 % a atividade da β -glucosidase, enquanto a adubação com ST promoveu acréscimo médio de 25 % sobre os tratamentos -P e SS (Figura 7a). A média da atividade enzimática da arilsulfatase em ambos os cultivos foi de 290,84 μ g de *p*-nitrofenol kg⁻¹ solo h⁻¹ (Figura 7b).

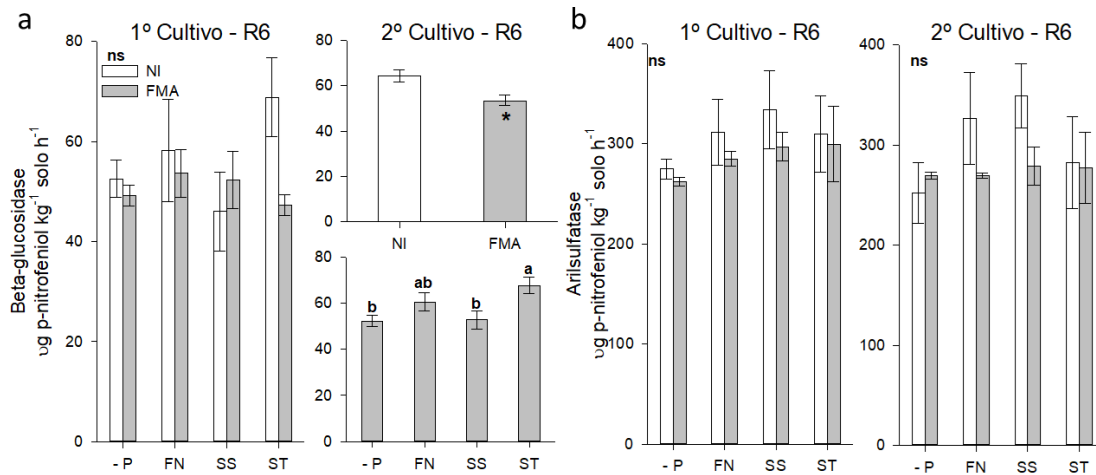


Figura 7. Atividade das enzimas β -glucosidase (a) e arilsulfatase (b) nos diferentes estágios de crescimento do 1 e 2 cultivo de milho. ns = não significativo; -P = sem adubo fosfatado; FN = fosfato natural; SS = superfosfato simples; ST = superfosfato triplo; * efeito significativo da inoculação dentro do mesmo fator “adubação”; letras minúsculas diferentes indicam efeito significativo do fator “adubação” dentro do mesmo fator “inoculação”.

A produtividade respondeu aos tratamentos nos dois cultivos, sendo que no primeiro ano de cultivo a inoculação promoveu 19 % de acréscimo sobre as plantas não inoculadas, independente do adubo fosfatado utilizado (Figura 8). No segundo cultivo houve interação entre os fatores adubação fosfatada e inoculação com FMA. Entre as plantas inoculadas no segundo cultivo, a maior produtividade média foi obtida no tratamento que recebeu adubação com ST (64 % superior aos demais tratamentos inoculados). Entretanto, as plantas não inoculadas não apresentaram diferença entre si (Figura 8). A inoculação com FMA promoveu acréscimo de 44 % no tratamento adubado com ST, e reduziu a produtividade em 39 e 38 % nos tratamentos adubados com FN e SS, respectivamente.

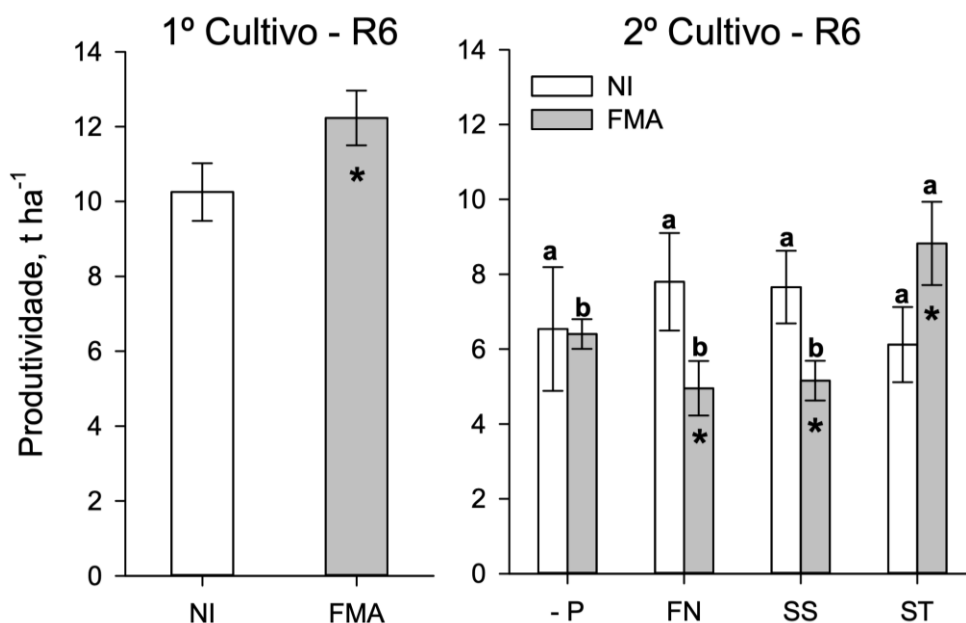


Figura 8. Produtividade no 1º e 2º cultivo de milho. ns = não significativo; -P = sem adubo fosfatado; FN = fosfato natural; SS = superfosfato simples; ST = superfosfato triplo; * efeito significativo da inoculação dentro do mesmo fator “adubação”; letras minúsculas diferentes indicam efeito significativo do fator “adubação” dentro do mesmo fator “inoculação”.

A Análise de Componentes Principais (PCA - Principal Component Analysis) (Figura 9) identificou uma relação da resposta de produtividade com fatores relacionados à disponibilidade de P no solo, como pH e P remanescente, bem como a atividade da enzima arilsulfatase ao final do segundo ciclo de cultivo (Figura 10b). Ela também mostra uma relação entre o aumento da atividade da enzima β -glucosidase e os teores de P nos grãos em ambos os cultivos (Figura 9).

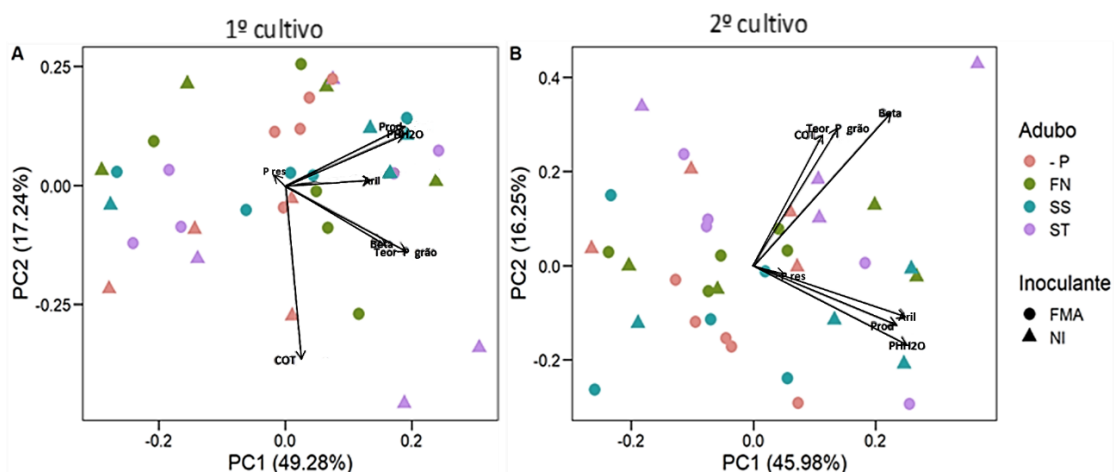


Figura 9. Análise de Componentes Principais do 1º (a) e 2º (b) cultivo de milho relacionando as principais variáveis do experimento. -P = sem adubo fosfatado; FN = fosfato natural; SS = superfosfato simples; ST = superfosfato triplo. COT = Carbono orgânico total; Beta = β -glucosidase; Aril = arilsulfatase; Prod. = produtividade; $\text{PH}_{\text{H}_2\text{O}}$ = pH avaliado em H_2O ; P res = P disponível extraído em resina trocadora de ânions.

7.4. Discussão

A reposição de P com adubos minerais nos solos é uma prática que pode ser considerada essencial para a manutenção da produtividade das propriedades agrícolas no Brasil, uma vez que em sua grande maioria os solos brasileiros são caracterizados como solos ácidos e conseqüentemente com potencial de adsorver o P e reduzir sua disponibilidade natural (Pavinato *et al.*, 2020). No entanto, as recomendações de doses, quais e quando os adubos fosfatados devem ser aplicados são muito individuais, pois dependem de fatores como qual cultura foi e será implementada, das características físicas, químicas e biológicas do solo (como os teores de P, de argila, o pH e atividade enzimática do solo), o custo do adubo que será utilizado e a previsão de retorno financeiro ao final do cultivo.

Os FMA são capazes de colaborar com a nutrição das plantas e os tratamentos de inoculação combinados com as fontes de P aplicadas neste experimento promoveram modificações nas avaliações em todas as coletas, não havendo um padrão tanto em estágio de crescimento, quanto das variáveis que responderam aos tratamentos (Figura 10). *Rhizophagus intraradices* é uma espécie de FMA que apresenta rápido estabelecimento da colonização micorrízica (capítulo 1) e rápida multiplicação de propágulos (INVAM, 2021). A aplicação de inoculante comercial com elevada concentração de propágulos e potencial infectivo (ver capítulo 1), aumentou a competitividade com os FMA nativos, em milho, e os efeitos observados no capítulo 2 (Figura 10) se mostram ser em virtude da associação do milho com *R. intraradices* do inoculante comercial. Entretanto, a associação apresentou interação com os adubos fosfatados com diferentes solubilidades, e esta interação deve ser considerada na interpretação dos resultados.

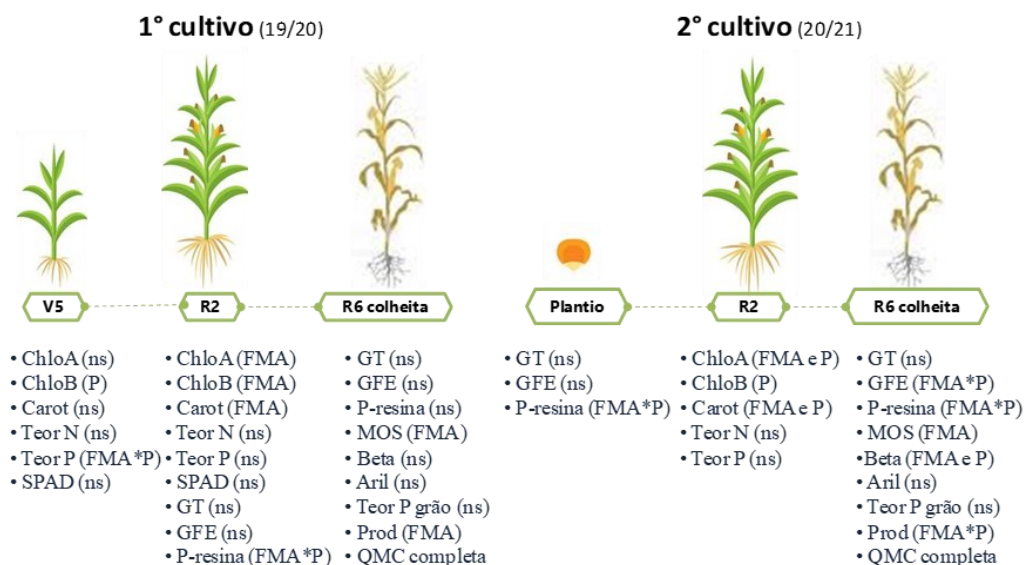


Figura 10. Compilado das avaliações nos diferentes estágios de crescimento do 1º e 2º cultivo e efeitos significativos ou não de cada fator (FMA e adubos). ns = não significativo; P = efeito significativo do fator “adubação”; FMA = efeito significativo do fator “inoculação”; FMA*P = interação significativa dos fatores “inoculação” e “adubação”.

Houve efeito na interação da colonização com os adubos fosfatados no segundo ciclo (Figura 6), apesar disso, a colonização das plantas espontâneas no primeiro ciclo não respondeu, expondo um possível efeito inibitório por parte das plantas espontâneas frente ao inoculante comercial. Diversos fatores podem interferir na dinâmica de populações de FMA associados as plantas, como condições ambientais de disponibilidade de nutrientes (Pearson; Abbott; Jasper, 1994; Van Diepen *et al.*, 2011), níveis de CO₂ (Carney *et al.*, 2007) e manejo e estratégias de crescimento indicando uma seletividade por parte das plantas (Bever *et al.*, 2009; Verbruggen *et al.*, 2012).

A seletividade dos simbiontes por parte das plantas tem sido investigada, e ainda não há um consenso sobre o assunto. No trabalho de Morales-Londoño (2016) não houve diferença na composição da comunidade de FMA entre os genótipos de milho testados. Entretanto, no trabalho de Reis *et al.* (2008) a micorrização alterou a classificação dos genótipos quanto à produção de matéria seca de parte aérea sob baixo P e à resposta ao aumento do suprimento de P. Nos trabalhos de Aquino *et al.* (2015) e Oliveira *et al.* (2008) diferentes genótipos de milho expostos a mesma comunidade de FMA apresentaram percentuais de colonização radicular diferentes, correlacionados com a eficiência de conversão de nutrientes resultando em maior crescimento, o que sugere que as plantas podem selecionar seus simbiontes micorrízicos.

Considerando todas as variáveis, compreender os fatores ambientais exige que sejam utilizadas metodologias adequadas para cada objetivo de avaliação e interpretação dos teores de P no solo. Sendo assim, diferentes extratores podem ser utilizados para avaliar a dinâmica de P originada da aplicação de cada um dos adubos fosfatados. O extrator Mehlich 3 extrai com maior eficiência o P ligado aos óxidos de Fe e Al, enquanto o extrator Mehlich 1 apresenta também potencial para extrair o P ligado ao Ca (P-Ca) (Goedert, Rein; Souza, 1990; Novais; Smyth; Nunes, 2007). O P-Ca é uma fração importante de P dos fosfatos naturais, mas que demandam a acidificação para serem solubilizados no decorrer do tempo. Além disso, esse processo ocorre lentamente, promovendo um efeito residual da aplicação de FN (Novais; Smyth; Nunes, 2007), diferente dos adubos SS e ST de maior solubilidade, que tem efeito mais imediato na disponibilidade de P para plantas e microrganismos (Novais; Smyth; Nunes, 2007).

Essa diferença de solubilidade dos adubos fosfatados (Raghothama & Karthikeyan, 2005) ficou clara observando os teores de P utilizando o extrator Mehlich 3 ao final do primeiro ciclo (R6) (Figura S1b), onde os teores de P extraídos por Mehlich 3 foram diferentes entre a média de onde havia menor (-P e FN) e maior concentração de P solúvel nos adubos (SS e ST). Utilizando o extrator Mehlich 1, foi possível observar maior média do teor de P extraído no tratamento FN ao final do segundo cultivo (R6) (Figura S1a), mostrando um possível efeito residual ao utilizar FN como fonte de P no sistema.

A presença e a disponibilidade de água são fatores determinantes no processo de disponibilização do P de adubos fosfatados, pois é na presença de água e de cargas positivas que são solubilizados liberando o P solúvel (Novais; Smyth; Nunes, 2007). Entre os dois ciclos de cultivo a disponibilidade de água variou consideravelmente, sendo registrados 297 e 725 mm, no primeiro e segundo ciclo, respectivamente (Epagri, 2021). As diferenças entre os tratamentos com menor solubilidade (-P e FN) e maior solubilidade (SS e ST) nos valores de P extraídos por Mehlich 3 no primeiro ciclo (Figura S1b) podem estar relacionadas ao fator disponibilidade de água, uma vez que os maiores teores foram observados nos tratamentos com maior solubilidade no primeiro ciclo, enquanto no segundo ciclo, com registro de 725 mm, houve grande variação nos valores de P independente do tratamento de adubação fosfatada (Figuras S1). Em relação ao P resina (Figura 5) o efeito da disponibilidade de água pode ser observado na menor média de P

disponível entre o primeiro e segundo ciclo, mesmo sabendo que no segundo ano o P disponível no solo era de efeito residual das aplicações do ano anterior.

O método de determinação de P com resina trocadora de ânions (P_{i-RTA}) extrai o P em solução, apresentando o status momentâneo de P disponível na solução do solo (Novais; Smyth; Nunes, 2007). Entretanto, não necessariamente corresponde ao P-lábil, pois a ação de plantas e microrganismos pode tanto solubilizar P_i quanto mineralizar o P_o da biomassa vegetal e microbiana de frações de P que no momento da avaliação não estavam em formas solúveis (Tabatabai, 1994; Souchie *et al.*, 2006; Balota *et al.*, 2013; Zhang; Feng; Declerck, 2018). A dinâmica das transformações de P entre frações orgânicas e inorgânicas promovidas por características químicas e físicas do solo, bem como pela atividade biológica, explica o porquê dos teores de P_{i-RTA} nos tratamentos não inoculados com P mais solúvel (SS e ST) terem apresentado médias superiores do que os demais tratamentos não inoculados no estágio R2 do primeiro cultivo (Figura 5).

A adubação com fertilizantes de maior solubilidade tende a aumentar os teores de P_{i-RTA} , entretanto a inoculação com FMA quando bem estabelecida, promove o aumento da eficiência de absorção do P que passa a ser imobilizado como P_o na biomassa dos FMA e das plantas inoculadas, reduzindo os teores de P_{i-RTA} nos tratamentos inoculados, uma vez que atuam como uma extensão do sistema radicular (Xu *et al.*, 2007). Sendo assim, um dos mecanismos diretos mais relevantes na promoção de crescimento e produtividade de plantas (Thirkel *et al.*, 2017) é aumentar a eficiência e o aproveitamento da absorção de P solúvel, mas que por limitações físicas ou de crescimento radicular (como a diferença expressiva de área superficial de raízes e micélio dos FMA) as plantas não absorvem.

Como os FMA apresentam mecanismos de absorção de P muito similares aos do sistema radicular, porém em proporções muito maiores, também sofrem influência direta de todas as alterações apresentadas. Em condições de pH ácido, além da maior concentração de Al^{3+} que pode reduzir o crescimento radicular, portanto também o volume de raízes que podem ser colonizadas, algumas espécies de FMA são mais sensíveis a diferenças de pH do solo, podendo também reduzir o seu crescimento.

O pH do solo é um fator que interfere diretamente na solubilização dos fosfatos, pois essa solubilização dos fosfatos inorgânicos é realizada pela acidificação do meio

(Santos; Gatiboni; Kaminski, 2008; Zoz *et al.*, 2009). Porém, o pH também influencia na dinâmica de adsorção do P, pois em solos ácidos a adsorção do P aos óxidos de Fe e Al é acelerada (Pavinato *et al.*, 2020). O pH da área experimental se manteve próximo de 6,0 durante os dois ciclos de cultivo, o que pode ter tornado mais lento o processo de solubilização do P do FN, mas proporcionou um ambiente favorável para a manutenção do P solúvel em frações lábeis, evitando acelerar o processo de adsorção do P no solo. O pH do solo, como discutido anteriormente, é um fator essencial para a manutenção do P em frações lábeis, e conseqüentemente aumentar a absorção pelas plantas. Como evidenciado na PCA, esse comportamento se repetiu, mostrando uma correlação positiva entre pH, disponibilidade de P e produtividade (Figura 9).

O crescimento dos FMA estimula a atividade enzimática de fosfatases (Gatiboni; Kaminski, J.; Santos, 2007; Ferrol; Azcón-Aguilar; Pérez-Tienda, 2018; Zhang; Feng; Declerck, 2018), a deposição de ácidos orgânicos e a liberação de prótons no solo por plantas e microrganismos, o que pode ter colaborado para esse acréscimo dos teores de P_{i-RTA} no tratamento inoculado, mesmo sem a adição de adubos fosfatados ao final do segundo ciclo (R6) (Figura 5). O teor de P_{i-RTA} variou entre os tratamentos na primeira e última coleta, com destaque a permanência reduzida dos teores de P no tratamento NI - P durante os dois ciclos, e a maior disponibilidade de P no tratamento FMA -P ao final do 2º ciclo (Figura 5), evidenciando o potencial da ação de microrganismos no aumento da disponibilidade de P no solo via solubilização de P_i (Figura 11 - solubilização de P_i).

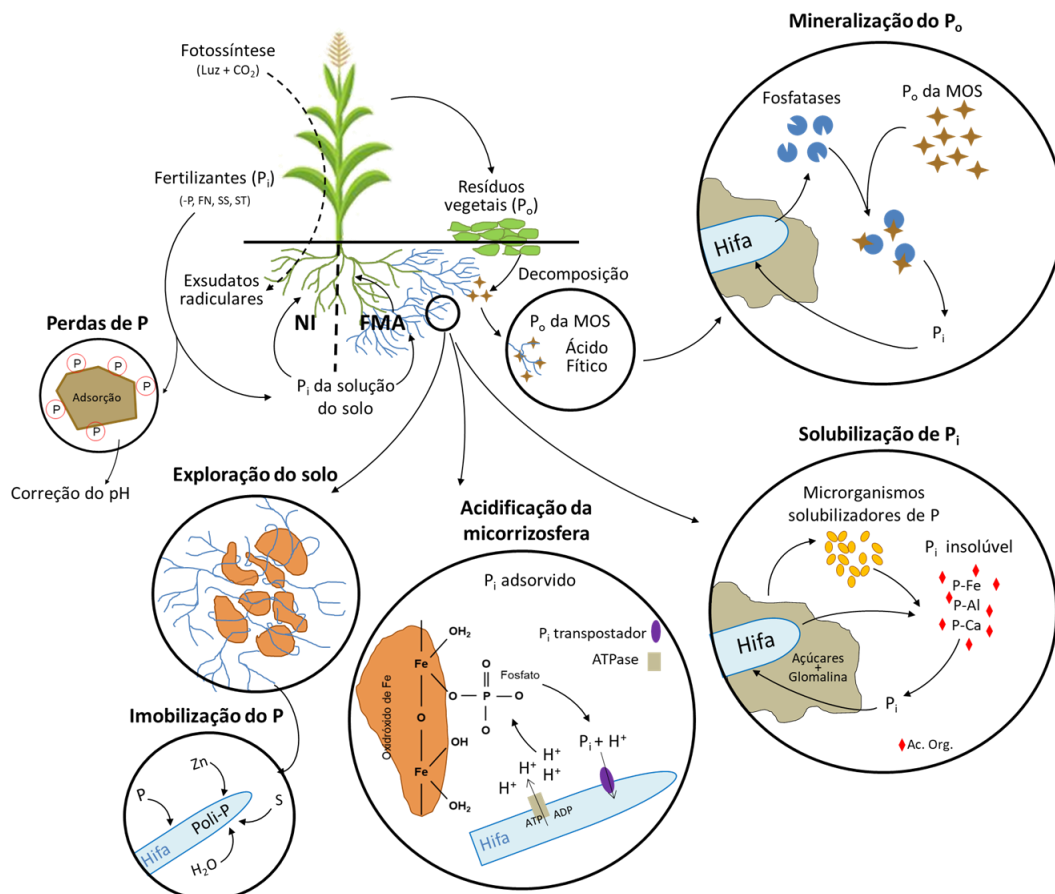


Figura 11. Diagrama representando os mecanismos de transformação e absorção de fósforo através do crescimento e associação das plantas com fungos micorrízicos arbusculares.

A associação do milho com FMA e o crescimento do micélio extrarradicular (MER) podem interferir na dinâmica do P de maneira direta e indireta. O MER colabora ativamente na absorção do P disponível da solução do solo para as plantas, além de atingir regiões do solo e espaços entre agregados que as raízes não conseguiriam atingir na mesma proporção (Figura 11 – exploração do solo) (Sieverding, 1991). O maior comprimento de micélio e menor diâmetro resultam em maior área superficial nesta associação. Deve-se destacar o processo de imobilização do P na biomassa de plantas e microrganismos (P_0), que ocorre de maneira simultânea às demais transformações (mineralização, solubilização, adsorção e dessorção). Os FMA após a absorção, transformam o P em polifosfatos que são armazenados e transportados pela rede de hifas (Figura 11 – Imobilização do P) (Tiecher *et al.*, 2018), e que esse P_0 não é determinado na maioria das extrações comuns de P do solo.

Outro aspecto importante é o fato que o MER, além de liberar enzimas e ácidos orgânicos que irão disponibilizar P de diferentes frações, libera também substâncias que podem estimular a atividade da microbiota do solo, promovendo o crescimento de grupos

de microrganismos como bactérias solubilizadoras de fosfato, entre outros (Figura 11 - solubilização de P_i) (Fink *et al.*, 2016; Balota, 2018). A produção e exsudação de ácidos orgânicos (como por exemplo o malato e citrato), no solo mobilizam os fosfatos por meio troca aniônica dos sítios de ligação e quelando íons metálicos que mobilizam P no solo (Sas; Rengel; Tang, 2001). Entretanto, avaliar a capacidade de produção de ácidos orgânicos pelos FMA é um processo complexo por questões metodológicas de comprovação da origem dos ácidos orgânicos produzidos.

Em trabalho recente, Andrino *et al.* (2021) buscaram comprovar a liberação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular pelo FMA *Rhizophagus irregularis*. Em sua metodologia, avaliaram a concentração de diversos ácidos orgânicos em um compartimento lateral às raízes separado por uma malha de abertura suficiente apenas para a passagem e crescimento do micélio. Outros trabalhos apresentaram dificuldade em determinar se a maior concentração de ácidos orgânicos nos tratamentos inoculados com FMA em decorrência da possibilidade de exsudação pelo micélio micorrízico ou de bactérias solubilizadoras de fosfatos associadas aos FMA e colonizadoras da micorrizosfera (Tawaraya; Naito; Wagatsuma, 2006; Toljander *et al.*, 2007; Bharadwaj; Alström; Lundquist, 2012; Batini *et al.*, 2016). Indiretamente, a formação do micélio extrarradicular dos FMA pode estimular o crescimento e a diversidade de outros microrganismos micorrizosféricos (Figura 11 – Solubilização de P_i) que são beneficiados por compostos depositados no solo por plantas e FMA (Zhang *et al.*, 2014; Manchanda *et al.*, 2017). Sendo assim, plantas associadas à FMA possuem um arsenal de microrganismos com grande capacidade de produção e imobilização de P em sua biomassa, produção de fosfatases e conseqüentemente a mineralização do P_o , bem como de solubilização de P_i pela produção de ácidos orgânicos (Figura 11).

Apesar dos teores de P no solo determinados por diferentes extratores não serem iguais, variando de classificações de baixo a alto (Mehlich 1: 6,0 à 15,9 mg dm^{-3} para a classe textural 2) (SBCS, 2016), pouco efeito foi observado nos teores de P nas folhas e grãos, e de N foliar (Figura S2abc). Sabe-se que quando há disponibilidade de nutrientes, não necessariamente os teores nutricionais na biomassa serão mais elevados, sendo o efeito dos tratamentos muitas vezes observado na maior produção de biomassa, produtividade, concentração de pigmentos fotossintéticos, entre outros (Lichtenthaler, 1987; Wolff *et al.*, 2013). Neste experimento, foi possível observar as diferenças dos tratamentos de adubação e inoculação nos teores de pigmentos foliares (Figura S3). Pouco

efeito dos tratamentos foi observado no estágio V5 do primeiro cultivo, mas a inoculação favoreceu a produção dos pigmentos no estágio R2 do primeiro cultivo, enquanto que no segundo ciclo, a resposta à inoculação foi de redução dos teores de clorofila e carotenoides (Figura S3ab).

A disponibilidade de nutrientes interfere diretamente na capacidade fotossintética das plantas (Bang *et al.*, 2021). Sendo assim, a contribuição tanto na absorção de nutrientes, quanto de água, pode ter favorecido a formação destes pigmentos no primeiro cultivo (Figura S3), promovendo folhas com maior potencial fotossintético que as do tratamento não inoculados. Plantas com maior potencial fotossintético convertem mais energia e nutrientes em fotossintatos, que são distribuídos por todo o sistema (na biomassa aérea, na biomassa radicular, para os microrganismos endofíticos, além da deposição na rizosfera) (Varma, 2008; Püschel *et al.*, 2017), resultando muitas vezes em maior atividade biológica do solo e produtividade.

Os resíduos animais e vegetais, a biomassa microbiana e húmus (compostos orgânicos em estágio avançado de decomposição), bem como todos os compostos depositados pelos microrganismos, compõem a matéria orgânica do solo (MOS) e podem ser fonte de nutrientes armazenados para suprir a demanda do metabolismo do solo (Bayer & Mielnickuk, 2008). A redução da MOS em ambos os cultivos pode indicar o processo de estímulo da mineralização da MOS quando na presença e crescimento dos FMA (Fink *et al.*, 2016) (Figura 11). Por um lado, este potencial é interessante para a manutenção da produtividade em situações em que há redução do P em solução. Entretanto, é importante que o manejo estimule a reposição da MOS via reposição de nutrientes no sistema, para a manutenção da produção de biomassa uma vez que a produção de grãos exporta nutrientes em grande quantidade, evitando prejudicar os cultivos subsequentes (Coelho, 2006; Coelho *et al.*, 2008).

A glicoproteína produzida pelos FMA denominada glomalina pode representar uma importante fração da MOS, pois colabora com o estímulo da atividade biológica e com a resistência física e química dos agregados do solo (Rillig & Mummey, 2006). Entretanto, há dificuldade metodológica no processo de determinação dessa fração pelo método de extração com citrato de sódio determinado pelo método de Bradford, pois quantifica não apenas a glomalina, mas sim uma ampla gama de proteínas do solo (Wright & Upadhyaya, 1996; Sousa *et al.*, 2012). Sendo assim, apesar do crescimento e efeito da

inoculação com FMA ser observado em algumas variáveis, os teores de glomalina determinados neste experimento podem não ter variado significativamente ou apenas terem sido mascarados pela fração proteica da biomassa microbiana e MOS da área experimental, que se manteve próxima dos 4,0 % durante os dois ciclos.

A atividade das enzimas β -glucosidase e arilsulfatase podem variar muito em decorrência de condições ambientais como a cobertura do solo, temperatura, disponibilidade de água, teores de MOS entre outros fatores, como a diversidade de microrganismos e a espécie de planta cultivada (Tabatabai, 1994; Mendes *et al.*, 2009; Balota, 2013; Mendes *et al.*, 2018). O tempo de resposta da atividade enzimática às modificações no manejo pode ser prolongado, e levar mais de um ciclo para promover mudanças detectáveis, podendo ser esta a explicação do porquê não foram observados efeitos na atividade da β -glucosidase no primeiro ciclo e da arilsulfatase nos dois ciclos (Figura 7ab). Por este motivo, a recomendação da Embrapa é realizar a coleta do solo para bioanálise (BioAs) apenas dos 10 primeiros centímetros do solo e anualmente, junto com a amostragem para a análise química do solo, logo após a colheita (Mendes *et al.*, 2018).

Antes do desenvolvimento da BioAs pela Embrapa, a atividade enzimática do solo normalmente era comparada à tratamentos ou áreas controle em cada situação. Porém, a tecnologia da BioAs permite que os valores sejam comparados às tabelas de referência que estão sendo calibradas para diferentes biomas do Brasil (Mendes *et al.*, 2018). Dessa forma, a ausência de efeito na atividade enzimática no primeiro cultivo não determina que os tratamentos não tenham modificado de alguma maneira a dinâmica da atividade enzimática do solo, tanto que a atividade da β -glucosidase ao final do segundo cultivo respondeu à inoculação com FMA e às diferentes fontes de P via adubação fosfatada (Figura 7a).

O processo de mineralização da MOS pode em alguns casos ser observado com a maior atividade enzimática da enzima β -glucosidase. Entretanto, a redução dos teores de MOS não se correlacionaram com o aumento da atividade de β -glucosidase no segundo ciclo (Figura 7a). A mineralização é o processo de transformação de nutrientes da fração orgânica para a fração inorgânica, que podem ser absorvidos e imobilizados novamente por plantas e microrganismos (Figura 11 – mineralização do P_o) (Alvarenga, Cruz; Viana, 2008). Como a adubação fosfatada não foi realizada no segundo ano de cultivo é aceitável

considerar que tenha ocorrido uma extração de nutrientes no primeiro ciclo reduzindo o potencial da atividade enzimática do solo, tanto que no tratamento com a adubação com ST a atividade enzimática do solo ao final do segundo ciclo foi maior do que o controle não adubado (-P) (Figura 7).

Considerando as tabelas da atividade enzimática do solo calibradas para a região do cerrado desenvolvidas pela Embrapa, os valores foram consideravelmente baixos durante o experimento (Mendes *et al.*, 2018), o que pode ter dificultado a sensibilidade da resposta aos tratamentos. Entretanto, a atividade enzimática está relacionada a uma infinidade de fatores, tanto que o cálculo do Índice de Qualidade do Solo (IQS) considera muitas outras variáveis em sua fórmula. Sendo assim, as faixas ideais de atividade enzimática da região avaliada provavelmente são muito diferentes do padrão ideal estabelecido até o momento para a região do cerrado. Trabalhos futuros correlacionando atividade biológica do solo, IQS e produtividade devem ser desenvolvidos para formular tabelas de fácil interpretação.

A produtividade é ainda a variável que mais influencia na tomada de decisão dos produtores agrícolas na hora de determinar quais produtos e práticas de manejo serão implementadas em sua propriedade. Por isso é tão importante relacioná-la com as demais avaliações buscando definir o melhor caminho para a manutenção da produtividade e da sustentabilidade do sistema. No primeiro ano de cultivo, onde o teor de P no solo foi classificado como alto, a produtividade respondeu positivamente à inoculação (Figura 8). Dessa forma e nestas condições ambientais foi possível aumentar a produtividade mesmo não realizando adubação fosfatada nesta propriedade. Entretanto, a exportação de nutrientes pela produção de grãos do primeiro ciclo, a não realização da adubação de reposição e a dinâmica de solubilização dos diferentes adubos, proporcionou condições diferentes no segundo ciclo, fazendo com que houvesse uma interação entre os fatores adubação e inoculação sobre a produtividade (Figura 8).

As condições hídricas contrastantes entre os dois ciclos de cultivo também podem ter contribuído para a ausência de efeito do fator adubação na produtividade das plantas no primeiro ano cultivo devido ao déficit hídrico apresentado neste período (Figura 8), sendo a inoculação a única a promover aumento da produtividade. Segundo Coelho *et al.* (2008) em média o milho absorve 600 mm de água durante seu ciclo, sendo que no primeiro ciclo de cultivo o total de água acumulada foi de 297 mm. Dessa forma,

no primeiro ano, o crescimento do micélio externo do FMA promoveu maior acesso das plantas a um volume do solo e conseqüentemente à mais água, proporcionando melhores condições de crescimento em um cultivo com disponibilidade hídrica menor do que a considerada ideal (Coelho *et al.*, 2008).

Em média, a produtividade no segundo ciclo foi menor se comparado ao primeiro, evidenciando a importância da adubação de reposição considerando os nutrientes que foram exportados pela colheita de grãos e as análises de solo interpretadas com base nos manuais de cada região (Figura 8) (Coelho, 2006; Resende *et al.*, 2006). Entretanto, deve-se considerar as variações de cultivares e climáticas de cada um dos anos de cultivo. O efeito dos tratamentos fica ainda mais claro quando a produtividade de plantas inoculadas sem adubação e sob efeito residual da adubação de FN e SS foram menores do que as plantas inoculadas e adubadas com ST (Figura 8). Vale destacar que o tratamento ST inoculado no segundo cultivo (o de maior produtividade) (Figura 8) foi também o tratamento que apresentou maior atividade da enzima β -glucosidase no segundo ciclo (Figura 7a), resultado compatível com as descobertas e correlações utilizadas para avaliar o IQS na BioAs da Embrapa (Mendes *et al.*, 2018).

Os resultados evidenciam que os FMA são capazes de alterar a dinâmica de absorção de nutrientes quando expostos à diferentes fontes de P com concentrações e características químicas de solubilidade distintas. Entretanto, compreender a dinâmica das transformações do fósforo entre frações orgânicas e inorgânicas, mais e menos lábeis, é essencial para definir estratégias de manejo, uma vez que não é de fácil elucidação em decorrências das transformações simultâneas que ocorrem no sistema. Fatores como a exportação e reposição de nutrientes, bem como o efeito residual de cada fertilizante e a inoculação com FMA, alteram a atividade biológica do solo e interferem na sustentabilidade do sistema. Estas outras variáveis devem receber atenção igual ou superior ao da resposta em produtividade.

7.5. Conclusões

A inoculação aumentou a produtividade das plantas no primeiro ano de cultivo, independente da adubação fosfatada utilizada.

No segundo ciclo a produtividade variou em função da inoculação e do efeito residual dos diferentes adubos utilizados no primeiro ciclo, verificando-se redução com

o fosfato natural e super-simples e aumento com o superfosfato triplo. Entretanto não houve relação da produtividade do milho com a disponibilidade de P no solo nos dois ciclos.

A inoculação não alterou a atividade da enzima β -glucosidase ao final do primeiro ciclo. Entretanto, a resposta variou em função da inoculação e do efeito residual dos adubos fosfatados ao final segundo ciclo. Não foram observados efeitos na atividade da enzima arilsulfatase no período e tratamentos avaliados.

7.6. Referências bibliográficas

Adetunji, A. T.; Lewu, F. B.; Mulidzi, R.; Ncube, B. (2017) The biological activities of β -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. J. Soil Sci. Plant Nutr. vol.17 no.3 Temuco.

Alcarde, J. C. (2007) Fertilizantes. In: Novais, R. F.; Alvarez, V. V. H.; Barros, N. F.; Fontes, R. L. F.; Cantarutti, R. B.; Neves, J. C. L. Fertilidade do solo, 1017p. SBCS, Viçosa.

Alvarenga, R. C.; Cruz, J. C.; Viana, J. H. M. (2008) Cultivo do milho, manejo dos solos. Plantas de cobertura de solo. Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de Produção, 2.

Andrino, A.; Guggenberger, G.; Kernchen, S.; Mikutta, R.; Sauheitl, L.; Boy, J. (2021) Production of Organic Acids by Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Contribution in the Mobilization of Phosphorus Bound to Iron Oxides. Front. Plant Sci., Sec. Plant Symbiotic Interactions.

Aquino, S. S.; Scabora, M. H.; Andrade, J. A. C.; Costa, S. M. G.; Maltoni, K. L.; Cassiolato, A. M. R. (2015) Mycorrhizal colonization and diversity and corn genotype yield in soils of the Cerrado region, Brazil. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 36, n. 6, suplemento 2, p. 4107-4118.

Araújo, A. S. F.; Monteiro, R. T. R. (2007) Indicadores biológicos de qualidade do solo. Biosci. J., Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75.

Ardakani, M. R.; Mazaheri, D.; Mafakheri, S.; Moghaddam, A. (2011) Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. Physiol Mol Biol Plants. 17(2):181–192.

Balota, B. (2018) Manejo e Qualidade Biológica do solo. Midiograf, 280p.

Balota, E. L.; Nogueira, M. A.; Mendes, I. C.; Hungria, M.; Fagotti, D. S. L.; Melo, G. M. P.; Souza, R. C.; Melo, W. J. (2013) Enzimas e seu papel na qualidade do solo. Tópicos Ci. Solo, 8:221-278.

Bang, T. C.; Husted, S.; Laursen, H.; Persson, D. P.; Schjoerring, J. K. (2021) The molecular physiological functions of mineral macronutrients and their consequences for deficiency symptoms in plants. *New Phytologist*, 229: 2446–2469.

Barreto, A. C.; Fernandes, M. F. (2002) Produtividade e absorção de fósforo por plantas de milho em função de doses e modos de aplicação de adubo fosfatado em solo de tabuleiro costeiro. *R. Bras. Ci. Solo*, 26:151-156.

Battini, F.; Cristani, C.; Giovannetti, M.; Agnolucci, M. (2016). Multifunctionality and diversity of culturable bacterial communities strictly associated with spores of the plant beneficial symbiont *Rhizophagus intraradices*. *Microbiol. Res.* 183, 68–79.

Bayer, C.; Mielniczuk, J. (2008) Dinâmica e função da matéria orgânica. In: Santos, G. A.; Silva, L. S.; Canellas, L. P.; Camargo, F. A. O. (Eds.). *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Metrópole. Cap. 2, p. 7-16.

Bever, J. D.; Richardson, S. C.; Lawrence, B. M.; Holmes, J.; Watson, M. (2009) Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology letters*, 12, 13– 21.

Bharadwaj, D. P.; Alström, S.; Lundquist, P. O. O. (2012). Interactions among *Glomus irregulare*, arbuscular mycorrhizal spore-associated bacteria, and plant pathogens under in vitro conditions. *Mycorrhiza* 22, 437–447.

Bidondo, L. F.; Silvani, V.; Colombo, R.; Pérgola, M.; Bompadre, J.; Godeas, A. (2011) Pre-symbiotic and symbiotic interactions between *Glomus intraradices* and two *Paenibacillus* species isolated from AM propagules. In vitro and in vivo assays with soybean (AG043RG) as plant host. *Soil Biology & Biochemistry*.

Bonfante, P.; Genre, A. (2010) Mechanisms Underlying Beneficial Plant-Fungus Interactions in Mycorrhizal Symbiosis. *Nature Communications*, 1, 48.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254.

Brasil. (2016) Departamento Nacional de Produção Mineral. Sumário Mineral / Coordenadores Thiers Muniz Lima, Carlos Augusto Ramos Neves Brasília: DNPM. 135 p.

Carney, K. M.; Hungate, B. A.; Drake, B. G.; Megonigal, J. P. (2007) Altered soil microbial community at elevated CO₂ leads to loss of soil carbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 4990– 4995.

Chien, S. H.; Menon, R. G. (1995) Factors affecting the agronomic effectiveness of phosphate rock for direct application. *Fertilizer Research* 41: 227-234.

Coelho, A. C.; França, G. E.; Pitta, G. V. E.; Alves, V. M. C.; Hernani, L. C. (2008) *Cultivo do Milho. Embrapa Milho e Sorgo Sistemas de Produção*, 2.

Coelho, A. M. (2006) *Nutrição e Adubação do Milho. Embrapa. Circular técnica* 78.

Conte, E.; Anghinoni, I.; Rheinheimer, D. S. (2003) Frações de fósforo acumulada em latossolo argiloso pela aplicação de fosfato no sistema plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.27, n.5, p.893-900.

Control Bio. Soluciones agrobiológicas para el huerto y el jardín. (2018). Disponível em: <<http://controlbio.es/es/247-glomus-intraradices>> Acesso em: 26/10/18.

Cordell, D.; Drangert, J. O.; White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Glob. Environ. Chang.* 19, 292–305.

Cornejo, P.; Meier, S.; Borie, G.; Riiling, M. C.; Borie, F. (2008) Glomalina-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Science of the Total Environment*, v. 406, n. 1-2, p. 154-160.

Croll, D.; Giovannetti, M. Koch, A. M.; Sbrana, C.; Ehinger, M.; Lammers, P. J.; Sanders, I. R. (2009) Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol* 181:924–937.

Crosino, A.; Genre, A (2022) Peace talks: Symbiotic signaling molecules in arbuscular mycorrhizas and their potential application. *Journal of Plant Interactions*, vol. 17, No. 1, 824–839.

Dalal, R. C. (1977) Soil organic phosphorus. *Adv. Agron.*, 29:83-117.

Epagri- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. (2021) Banco de dados de variáveis ambientais de Santa Catarina. Florianópolis: Epagri. 20p. (Epagri, Documentos, 310) - ISSN 2674-9521 (On-line).

Estrada, B.; Barea, J. M; Aroca, R.; Ruiz-Lozano, J. M. (2013) A native *Glomus intraradices* strain from a Mediterranean saline area exhibits salt tolerance and enhanced symbiotic efficiency with maize plants under salt stress conditions. *Plant Soil* 366:333–349.

Ferrol, F.; Azcón-Aguilar, C.; Pérez-Tienda, J. (2018) Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. *Plant Science*, 280, pp. 441-447.

Fink, J. R.; Inda, A. V.; Bavaresco, J.; Barrón, V.; Torrent, J.; Bayer, C. (2016) Adsorption and desorption of phosphorus in subtropical soils as affected by management system and mineralogy. *Soil Tillage Res.* 155, 62–68.

Folli-Pereirai, M. S.; Meira-Haddad, L. S.; Bazzolli, D. M. S.; Kasuya, M. C. M. (2012) Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*. vol.36 no.6 Viçosa.

Fontaine, J.; Grandmougin, F. A.; Hartmann, M. A.; Sancholle, M. (2001) Sterol biosynthesis by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Lipids* 36:1357–1363.

Fontaine, J.; Grandmougin, F. A.; Sancholle, M. (2001) Lipid metabolism of the endomycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *CR Acad Sci III-Vie* 324:847–853.

Gachomo, E.; Allen, J. W.; Pfeffer, P. E.; Govindarajulu, M.; Douds, D. D.; Jin, H.; Nagahashi, G.; Lammers, P. J.; Shachar-Hill, Y.; Bücking, H. (2009) Germinating spores of *Glomus intraradices* can use internal and exogenous nitrogen sources for de novo biosynthesis of amino acids. *New Phytol* 184:399-411.

Gatiboni, L. C.; Kaminski, J.; Santos, D. (2007) Biodisponibilidade de formas de fósforo acumuladas em solo sob sistema plantio direto. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 31, 691–699.

Giri, B.; Giang, P. H.; Kumari, R.; Prasad, R.; Sachdev, M.; Garg, A. P.; Oelmüller, R.; Varma, A. (2005) Mycorrhizosphere: Strategies and Functions. In: Buscot, F.; Varma, A. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions. Soil Biology, Volume 3*, Springer.

Goedert, W. J.; Rein, T. A.; Souza, D. M. G. (1990) Eficiência agrônômica de fosfatos naturais, fosfatos parcialmente acidulados e termofosfatos em solos do Cerrado. *Pesq. Agropcc. Bras., Brasília*, 25(4):521-530.

González-Chavéz, M. C.; Carrillogonzález, R.; Wright, S. F.; Nichols, K. A. (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, v. 130, n. 3, p. 317- 323.

Guo, W.; Zhao, R.; Fu, R.; Bi, N.; Wang, L.; Zhao, W.; Guo, J.; Zhang, J. (2014) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the development of maize (*Zea mays* L.) grown in three types of coal mine spoils. *Environ Sci Pollut Res* 21:3592–3603.

Hedley, M. J.; Stewart, J. W. B.; Chauhan, B. S. (1982) Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Science Society of American Journal*, v 46, p.970-976.

INVAM. (2021) International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Rhizophagus intraradices* (reference accession UT126). Disponível em: <<http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/rhizophagus/intradices.html>>. Acesso em: 15/02/2021.

Juge, C.; Samson, J.; Bastien, C.; Vierheilig, H.; Coughlan, A.; Piche, Y. (2002) Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. *Mycorrhiza* 12:37–42.

Khasawneh, F. E.; Doll, E. C. (1978) The use of phosphate rock for direct application to soils. *Adv. Agron.*, 30:159-206.

Koske, R. E.; Gemma, J. N. (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhiza. *Mycological Research*, v. 92, p. 486-505.

Kothe, E.; Turnau, K. (2018) Editorial: Mycorrhizosphere Communication: Mycorrhizal Fungi and Endophytic Fungus-Plant Interactions. *Front. Microbiol.*, Volume 9, 3015.

Lallemand Plant Care (2023) Disponível em: <<https://www.lallemandplantcare.com/en/usa/products/product-details/lalrise-max-wp/>> Acesso em: 10/10/23.

- Li, H.; Wang, C. Li, X.; Xiang, D. (2013) Inoculating maize fields with earthworms (*Aporrectodea trapezoides*) and an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) improves mycorrhizal community structure and increases plant nutrient uptake. *Biol Fertil Soils* 49:1167–1178.
- Liang, S. M.; Zheng, F. L.; Wu, Q. S. (2022) Elucidating the dialogue between arbuscular mycorrhizal fungi and polyamines in plants. *World J Microbiol Biotechnol* 38, 159.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:350-382.
- Logi, C.; Sbrana, C.; Giovannetti, M. (1998) Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Appl Environ Microbiol* 64:3473–3479.
- Manchanda, G., Singh, R. P.; Li, Z. F.; Zhang, J. J. (2017). “Mycorrhiza: creating good spaces for interactions,” in *Mycorrhiza - Function, Diversity, State of the Art*, eds A. Varma, R. Prasad, and N. Tuteja (Cham: Springer International Publishing), 39–60.
- Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. 2.ed. London, Academic Press, 319p.
- Marschner, H.; Dell, B. (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*. 159: 89– 102.
- McGonigle, T. P.; Millers, M. H.; Evansg, D. G.; Fairchild, L.; Swan, J. A. (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115, 495.
- Meghvansi, M. K.; Mahna, S. K. (2009) Evaluating the Symbiotic Potential of *Glomus intraradices* and *Bradyrhizobium japonicum* in Vertisol with Two Soybean Cultivars. *American-Eurasian Journal of Agronomy* 2 (1): 21-25.
- Mendes, I. C.; Hungria, M.; Reis Júnior, F. B.; Fernandes, M. F. (2009) Bioindicadores para avaliação da qualidade dos solos tropicais. *Utopia ou realidade? Embrapa Cerrados*.
- Mendes, I. C.; Sousa, D. M. G.; Reis Junior, F. B. Lopes, A. A. C. (2018) Bioanálise de solo: como acessar e interpretar a saúde do solo. *Circular técnica* 38.
- Mendonça, E, S.; Matos, E. S. (2017) *Matéria orgânica do solo. Métodos de análises*. 2ªEd. Viçosa, MG: UFV-Gefert, 221p.
- Morales-Londoño, D. M. (2016) Efeitos do milho transgênico sobre aspectos morfofisiológicos da associação micorrízica e sobre a diversidade dos fungos micorrízicos arbusculares. Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina.
- Moreira F. M. S.; Siqueira, J. O. (2006) Transformações Bioquímicas e ciclos dos elementos no solo. In: *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2.ed. Editora UFLA.

- Nogueira, M. A.; Cardoso, E. J. B. N. (2007) Phosphorus availability changes the internal and external endomycorrhizal colonization and affects symbiotic effectiveness. *Sci. Agric.*, v.64, n.3, p.295-300.
- Novais, F. R.; Smyth, T. J. (1999) Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: UFV, 399p.
- Novais, R. F.; Smyth, T. J.; Nunes, F. N. (2007) Fósforo. In: Novais, R. F.; Alvarez, V. V. H.; Barros, N. F.; Fontes, R. L. F.; Cantarutti, R. B.; Neves, J. C. L. Fertilidade do solo. SBCS, 1017p.
- NovaTero (2022). NovaTero Bio.Ag. Disponível em: <www.rootellabr.com.br>. Acesso em: 23/08/22.
- Oliveira, C. A.; As, N. M. H.; Gomes, E. A.; Marriel, I. E.; Scotti, M. R.; Guimarães, C. T.; Schaffert, R. E.; Alves, V. M. C. (2008) Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *applied soil ecology* 41, 249-258.
- Pavinato, P. S.; Cherubin, M. R.; Soltangheisi, A.; Rocha, G.; Chafwic, D. R.; Jones, D. L. (2020) Revealing Soil Legacy Phosphorus to Promote Sustainable Agriculture in Brazil. *Scientific Reports*, 10:15615.
- Pearson, J. N.; Abbott, L. K.; Jasper, D. A. (1994) Phosphorus, soluble carbohydrates and the competition between two arbuscular mycorrhizal fungi colonizing subterranean clover. *New Phytologist*, 127, 101– 106.
- Porcel, R.; Aroca, R.; Cano, C.; Bago, A.; Ruiz-Lozano, J. M. (2006) Identification of a gene from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* encoding for a 14-3-3 protein that is upregulated by drought stress during the AM symbiosis. *Microb Ecol* 52:575–582.
- Priyadharsini, P.; Rojamaala, K.; Koshila, R. R.; Muthuraja, R.; Nagaraj, K.; Muthukumar, T. (2017) Mycorrhizosphere: The Extended Rhizosphere and its Significance. In: Choudhary, D.; Varma, A.; Tuteja, N. *Plant-Microbe Interaction: an Approach to Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore.
- Püschel, D.; Janoušková, M.; Vorišková, A.; Gryndlerová, H.; Vosátka, M.; Jansa, J. (2017) Arbuscular Mycorrhiza Stimulates Biological Nitrogen Fixation in Two *Medicago* spp. through Improved Phosphorus Acquisition. *Plant Sci*. 8:390.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raghothama, K. G.; Karthikeyan, A. S. (2005) Phosphate Acquisition. *Plant and Soil*. Vol. 274, No. 1/2, Root Physiology—from Gene to Function, pp. 37-49.
- Reis, E. F.; Carneiro, M. A. C.; Saggin-Júnior, O. J.; Rotta, D. A.; Sousa, M. Y. (2008) Absorção de fósforo em doze genótipos de milho inoculados com fungo micorrízico arbuscular em solo de cerrado. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.9, p.2441-2447.

- Resende, A. V.; Furtini Neto, A. E.; Alves, V. M. C.; Muniz, J. A.; Curi, N. Faquin, V.; Kimpara, D. I.; Santos, J. Z. L.; Carneiro, L. F. (2006) Fontes e modos de aplicação de fósforo para milho em solo cultivado da região do cerrado. R. Bras. Ci. Solo, 30:453-466.
- Rillig, M. C. (2004) Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. Can. J. Soil. Sci.
- Rillig, M. C.; Mummey, D. L. (2006) Mycorrhizas and Soil Structure. New Phytologist, V. 171, P. 41-53.
- Ruiz-Lozano, J. M. (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. Mycorrhiza 13:309–317.
- Sangoi, L.; Silva, P. R. F. (2016) Crescimento, desenvolvimento e épocas de semeadura. In: Filho, J. A. W.; Chiaradia, L. A. A cultura do milho em Santa Catarina. 3ed. Epagri, 400p.
- Santos, D. R.; Gatiboni, L. C.; Kaminski, J. (2008) Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.2, p.576-586.
- Sas, L.; Rengel, Z.; Tang, C. (2001) Excess cation uptake and extrusion of proton and organic acid anion in *Lupinus albus* under P deficiency. Plant. Sci.; 160(6):1191-8.
- Sato, T.; Ezawa, T.; Cheng, W.; Tawaraya, K. (2015) Release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. Soil Science and Plant Nutrition, 61, 269–274.
- SBCS. (2016) Sociedade Brasileira De Ciência Do Solo. Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 11.ed. 376 p.
- Sena, J. O. A.; Stefanutti, R.; Donha, R. M. A.; Cardoso, E. J. B. N. (2014) Cinética de absorção com doses de fósforo e fungos micorrízicos arbusculares em *Nicotiana tabacum*. Científica, v.42, n.3, p.294-298.
- Sieverding, E. (1991) Vesicular–arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Eschborn. GTZ. 371p.
- Smith, S. E.; Read, D. J. (1997) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, 605p.
- Smith, S. E.; Read, D. J. (2008) Mycorrhizal Symbiosis, 3rd Edn. London: Academic.
- Smith, S. E.; Smith, F. A. (2011) Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. Annu. Rev. Plant Biol. 62:227–50.
- Souchie, E. L.; Azcón, R.; Barea, J. M.; Saggin-Júnior, O. J. (2006) Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.41, n.9, p.1405-1411.

Sousa, C. S.; Menezes, R. S. C.; Sampaio, E. V. S. B.; Lima, F. S. (2012) Glomalina: características, produção, limitações e contribuição nos solos. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, suplemento 1, p. 3033-3044.

Spagnoletti, F.; Lavado, R. S. (2015) The Arbuscular Mycorrhiza *Rhizophagus intraradices* Reduces the Negative Effects of Arsenic on Soybean Plants. Agronomy.

Stoffel, S. C. G.; Soares, C. R. F. S.; Meyer, E.; Lovato, P. E. Giachini, A. J. (2020a) Yield increase of corn inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. Ciência Rural, v.50:7, e20200109.

Stoffel, S. C. G.; Soares, C. R. F. S.; Meyer, E.; Lovato, P. E. Giachini, A. J. (2020b) Yield increase of soybean inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. Afr. J. Agric. Res, Vol. 16(5), pp. 702-713.

Sumitomo (2023) Disponível em: <<https://www.sumitomochemical.com/asd/biologicos/>>, acesso em: 10/10/23

Tabatabai, M. A. (1994) Soil Enzymes. In: Weaver, R. W.; Scott, A.; Bottomeley, P. J. Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties. Madison, Soil Science Society of America. P.778-835.

Tang, M.; Chen, H.; Huang, J. C.; Tian, Z. Q. (2009) AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. Soil Biol. Biochem., 41:936-940.

Tawaraya, K.; Naito, M.; Wagatsuma, T. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. J. Plant Nutr. 29, 657–665.

Tedesco, M. J.; Gianello, C.; Bissani, C. A. (1995) Análise de solos, plantas e outros materiais. Boletim Técnico de Solos, 5. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174p.

Thirkell, T. J.; Charters, M. D.; Elliott, A. J.; Sait, S. M.; Field, K. J. (2017) Are mycorrhizal fungi our sustainable saviors? Considerations for achieving food security. Journal of Ecology, 105, 921–929.

Tiecher, T.; Gomes, M. V.; Ambrosini, V. G.; Amorim, M. B.; Bayer, C. (2018) Assessing linkage between soil phosphorus forms in contrasting tillage. Soil and Tillage Research 175 (2018) 276–280.

Toljander, J. F.; Lindahl, B. D.; Paul, L. R.; Elfstrand, M.; Finlay, R. D. (2007) Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. FEMS Microbiol. Ecol. 61, 295–304.

Trépanier, M.; Bécard, G.; Moutoglis, P.; Willemot, C.; Gagné, S.; Avis, T. J.; Rioux, J. A. (2005) Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. Appl Environ Microbiol. Sep;71(9):5341-7.

Van Diepen, L. T. A.; Lilleskov, E. A.; Pregitzer, K. S. (2011) Simulated nitrogen deposition affects community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in northern hardwood forests. Molecular ecology, 20, 799– 811.

Varma, A. (2008) Mycorrhiza. State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3 ed.

Verbruggen, E.; Mouden, C. E.; Jansa, J.; Akkermans, G.; Bücking, H.; West, S. A.; Kiers, T. (2012) Spatial structure and interspecific cooperation: theory and an empirical test using the mycorrhizal mutualism. *The American naturalist*, 179, E133–E146.

Vodnik, D.; Grčman, H.; Macek, I.; Elteren Van, J. T.; Kovacenic, M. (2008) The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment*, v. 392, n. 1, p. 130-136.

Walker, C.; Schüßler, A.; Vincent, B.; Cranenbrouck, S.; Declerck, S. (2021). Anchoring the species *Rhizophagus intraradices* (formerly *Glomus intraradices*). *Fungal Systematics and Evolution* 8: 179–201.

Wellburn, A. R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-313.

Wolff, S. A.; Coelho, L. H.; Zabrodina, M.; Brinckmann, E.; Kittang, A. I. (2013) Plant mineral nutrition, gas exchange and photosynthesis in space: A review. *Advances in Space Research* 51, 465–475.

Wright, S. F.; Green, V. S.; Cavigelli, M. A. (2007) Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. *Soil & Tillage Research, Netherlands*, v. 94, n. 2, p. 546-549.

Wright, S. F.; Starr, J. L.; Paltineanu, I. C. (1999) Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. *Soil Science Society of America Journal, Madison*, v. 63, n. 6, p. 1825-1829.

Wright, S.; Upadhyaya, A. A. (1996) Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science, Baltimore*, v. 161, p. 575-586.

Xu, G. H.; Chague, V.; Melamed-Bessudo, C.; Kapulnik, Y.; Jain, A.; Raghothama, K. G.; Levy, A. A.; Silber, A. (2007). Functional characterization of LePT4: a phosphate transporter in tomato with mycorrhiza-enhanced expression. *J. Exp. Bot.* 58, 2491–2501.

Zhang, L.; Fan, J.; Ding, X.; He, X.; Zhang, F.; Feng, G. (2014). Hyphosphere interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate solubilizing bacterium promote phytate mineralization in soil. *Soil Biol. Biochem.* 74, 177–183.

Zhang, L.; Feng, G.; Declerck, S. (2018) Signal beyond nutrient, fructose, exuded by an arbuscular mycorrhizal fungus triggers phytate mineralization by a phosphate solubilizing bacterium. *The ISME Journal*, 12:2339–2351.

Zoz, T.; Lana, M. C.; Steiner, F.; Frandoloso, J. F.; Fey, R. (2009) Influência do pH do solo e de fertilizantes fosfatados sobre a adsorção de fósforo em latossolo vermelho. *Synergismus scyentifica UTFPR, Pato Branco*, 04 (1).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho evidenciam o potencial infectivo e a capacidade de um inoculante comercial a base de fungo micorrízica arbuscular de alterar a dinâmica de nutrientes no solo quando expostos à fertilizantes fosfatados com características químicas de solubilidade diferentes. Entretanto, sugere-se que para compreender a dinâmica das transformações do fósforo entre frações orgânicas e inorgânicas, mais e menos lábeis, seria interessante realizar avaliações do fracionamento de P. Estas informações adicionais auxiliariam na interpretação dos resultados obtidos neste estudo, uma vez que as transformações do P no solo não são de fácil elucidação em decorrência das transformações simultâneas que ocorrem no sistema. Fatores como a exportação e reposição de nutrientes, bem como o efeito residual de cada fertilizante, e como a inoculação com FMA podem alterar a atividade biológica do solo merecem atenção dos grupos de pesquisa.

9. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

O uso de inoculantes micorrízicos arbusculares tem conquistado espaço no mercado agrícola brasileiro de insumos biológicos em virtude dos conhecidos e muito bem descritos benefícios da associação. A principal barreira enfrentada até o momento sempre foi a produção de um inoculante que ao mesmo tempo fosse eficiente, apresentasse facilidade prática na inoculação a campo e com um custo viável ao produtor. Muitos trabalhos comprovam a viabilidade de redução da adubação fosfatada em cultivos associados à inoculantes micorrízicos arbusculares eficientes. Entretanto a combinação da inoculação com o uso de adubos fosfatados que produzem efeitos residuais diferentes no decorrer dos ciclos ainda é um assunto a ser explorado para determinar opções de manejo de fertilizantes mais eficientes.

Sugere-se ainda que trabalhos de longa duração sejam realizados explorando a disponibilidade de P, a interação a longo prazo com diferentes fontes de P e FMA, e o efeito sobre os indicadores biológicos do solo, como estoques de carbono, atividade enzimática e respiração. Para esclarecer melhor a interação dos fertilizantes e o efeito nos atributos do solo, pode-se realizar estudos de fracionamento de P que poderão indicar quais transformações são mais significativas quando a associação com FMA é estimulada.

Técnicas moleculares para avaliação de colonização micorrízica a campo podem ser utilizadas para determinar a comunidade de microrganismos associados as plantas, tanto de forma endofítica quanto na rizosfera. Estes estudos podem esclarecer a dinâmica da comunidade de microrganismos sob efeito da inoculação com produtos comerciais à base de FMA. Fatores como diferentes solos, teores de argila, interações com outros produtos biológicos e outros fertilizantes podem e devem ser considerados na estruturação de novos projetos.

10. MATERIAL SUPLEMENTAR

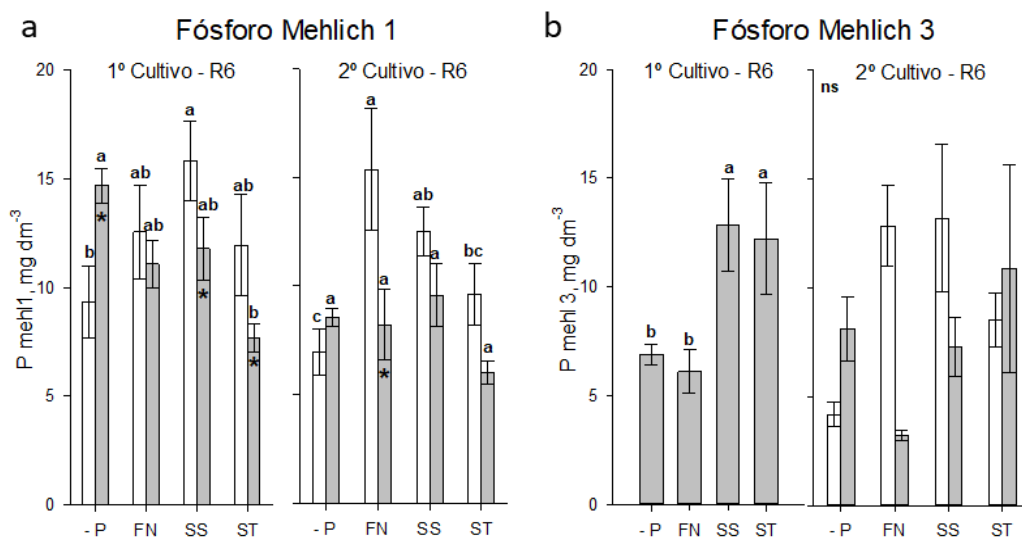


Figura S1. Teores de fósforo Mehlich 1 e 3 nos diferentes estágios de crescimento do 1º e 2º cultivo de milho. ns = não significativo; -P = sem adubo fosfatado; FN = fosfato natural; SS = superfosfato simples; ST = superfosfato triplo; * efeito significativo da inoculação dentro do mesmo fator “adubação”; letras minúsculas diferentes indicam efeito significativo do fator “adubação” dentro do mesmo fator “inoculação”.

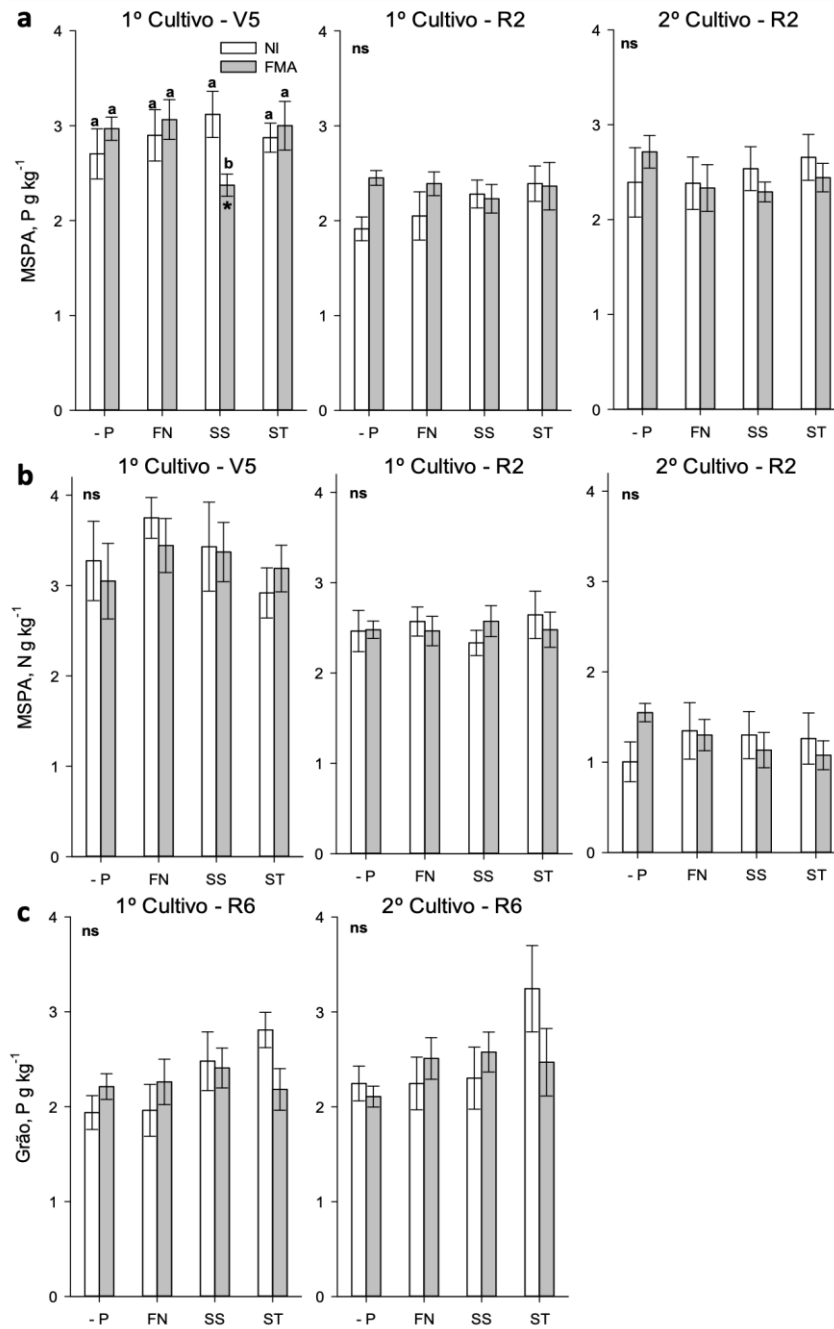


Figura S2. Teores de P (a) e N (b) na matéria seca da parte aérea (MSPA) e grãos (c) nos diferentes estágios de crescimento do 1º e 2º cultivo de milho. ns = não significativo; -P = sem adubo fosfatado; FN = fosfato natural; SS = superfosfato simples; ST = superfosfato triplo; * efeito significativo da inoculação dentro do mesmo fator “adubação”; letras minúsculas diferentes indicam efeito significativo do fator “adubação” dentro do mesmo fator “inoculação”.

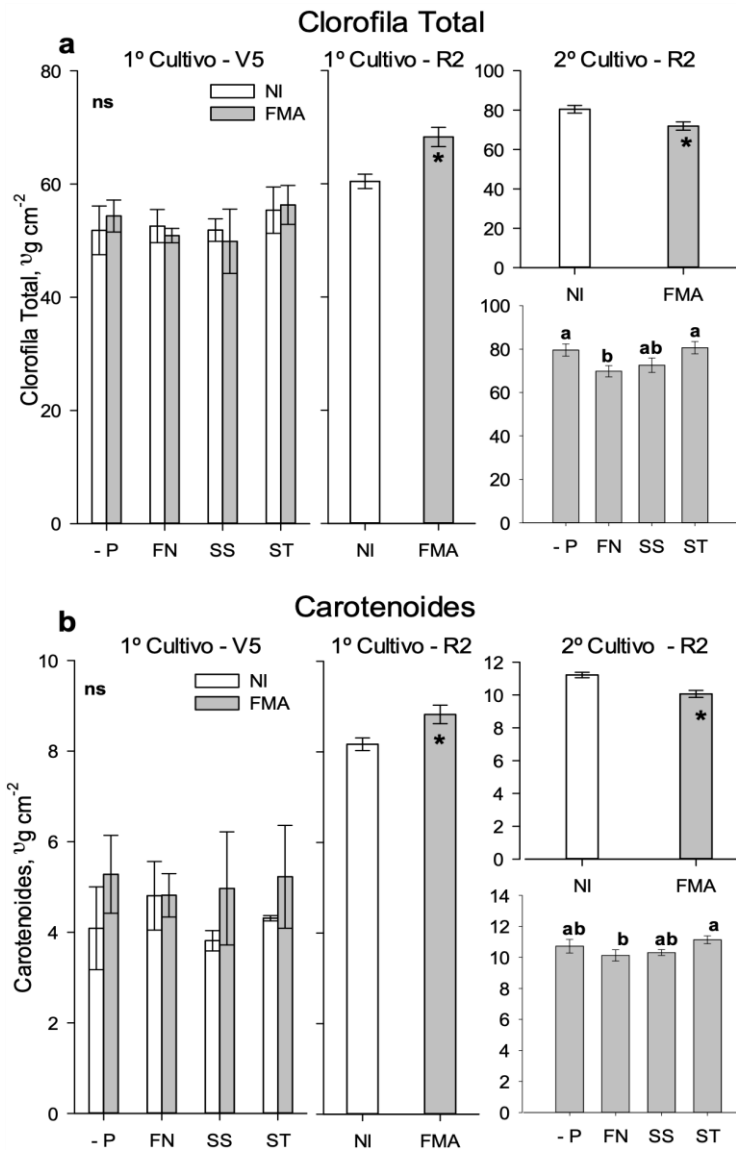


Figura S3. Teores de clorofila total e carotenoides nos diferentes estágios de crescimento do 1º e 2º cultivo de milho. ns = não significativo; -P = sem adubo fosfatado; FN = fosfato natural; SS = superfosfato simples; ST = superfosfato triplo; * efeito significativo da inoculação dentro do mesmo fator “adubação”; letras minúsculas diferentes indicam efeito significativo do fator “adubação” dentro do mesmo fator “inoculação”.