



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS PROFESSORA CINOBELINA ELVAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

HELANE CRISTINA DE ANDRADE RODRIGUES SEVERO

COINOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E *Bacillus subtilis* NO CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO DO MILHO SOB NÍVEIS DE FÓSFORO

Bom Jesus - PI

2024

HELANE CRISTINA DE ANDRADE RODRIGUES SEVERO

COINOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E *Bacillus subtilis* NO CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO DO MILHO SOB NÍVEIS DE FÓSFORO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - PPGCA, Campus Professora Cinobelina Elvas - CPCE, da Universidade Federal do Piauí - UFPI, na área de concentração Ciência do Solo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientadora: Dra. Elaine Martins da Costa.

Coorientadora: Dra. Adriana Miranda de Santana Arauco.

Bom Jesus - PI

2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Campus Professora Cinobelina Elvas
Serviço de Processamento Técnico

S498c Severo, Helane Cristina de Andrade Rodrigues.
Coinoculação de fungos micorrízicos arbusculares e
Bacillus subtilis no crescimento e nutrição do milho sob
níveis de fósforo./ Helane Cristina de Andrade Rodrigues
Severo. – 2024.
68 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí,
Campus Professora Cinobelina Elvas, Programa de Pós-
graduação em Ciências Agrárias, Bom Jesus-PI, 2024.
Orientação: “Profa. Dra. Elaine Martins da Costa”.

1. Milho-nutrição. 2. Biofertilizante. 3. Adubação
fosfatada. 4. Zea mays L. Severo, Helane Cristina de
A. Rodrigues. II. Costa, Elaine Martins da. III. Título.

CDD 633.15

Elaborado por Sérvulo Fernandes da Silva Neto – CRB-15/603

HELANE CRISTINA DE ANDRADE RODRIGUES SEVERO

COINOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E *Bacillus subtilis* NO CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO DO MILHO SOB NÍVEIS DE FÓSFORO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, do Campus Professora Cinobelina Elvas, da Universidade Federal do Piauí, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de Concentração: Ciência do Solo.

Linha de Pesquisa: Fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas.

Orientadora: Dra. Elaine Martins da Costa.

Aprovada em 29 de julho de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elaine Martins da Costa (UFPI)
Orientadora

Profa. Dra. Adriana Miranda Santana Arauco (UFPI)
Coorientadora

Profa. Dra. Meire Aparecida Silvestrini Cordeiro (UFMS)
Examinadora externa ao Programa

Prof. Dr. Rafael de Souza Miranda (UFPI)
Examinador interno ao Programa

Dedico esta dissertação à minha família, em especial à minha mãe, Cecília Maria de Andrade Rodrigues, por ser um exemplo constante de resiliência e fé. Sua dedicação e sacrifício, sempre me colocando em primeiro lugar, foram fundamentais para a minha chegada até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por suas bênçãos e por me capacitar a alcançar esta posição. Apesar dos momentos árduos, parte do ciclo natural da vida, sua proteção nunca me permitiu desistir.

À minha Família: minha mãe Cecília Maria de Andrade Rodrigues, meu padrasto Raimundo Nonato Ferro e Silva, meu pai Pedro Wilson Severo, minha irmã Élide Andressa de Andrade Rodrigues Severo e as minhas queridas sobrinhas, Ana Clarice Severo do Nascimento e Lorena Sousa Andrade Severo. Sem a contribuição de vocês nada disso teria sido possível.

À minha melhor amiga e companheira de vida, Adriele de Castro Ferreira, que muito contribuiu para realização deste trabalho. Desde sua chegada em minha vida em 2019, tenho me tornado uma pessoa melhor. Minha eterna gratidão.

Agradeço a minha professora e orientadora, Elaine Martins da Costa, pela oportunidade, confiança e dedicação em contribuir para o meu desenvolvimento. Sua disponibilidade constante é verdadeiramente digna de reconhecimento.

À minha coorientadora, Adriana Miranda de Santana Arauco, por sua contribuição inestimável para que esta pesquisa se concretizasse.

A toda a equipe do Laboratório de Análise de Solos (LAS), em especial à Allana Pereira Moura da Silva, pelo apoio nas análises realizadas e pela amizade incrível que construímos.

Aos amigos, a quem amo e considero minha segunda família: Saiwry Gomes, Marcelo Augusto, Franklyn Erikson, José Neto, Wanderllon Sousa e Adilson Barbosa. A presença de cada um de vocês tem sido fundamental na minha jornada.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias (PPGCA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, com recursos e bolsa de financiamento.

“Não importa o quão poderoso você se torne, nunca tente fazer tudo sozinho, caso contrário, você irá falhar.”

Steve Jobs

RESUMO

Uma alternativa para aumentar a disponibilidade do fósforo (P) no solo para as plantas é o uso de microrganismos capazes de atuar como facilitadores na utilização de fertilizantes fosfatados e/ou na solubilização do P residual. Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência de três FMAs, em combinação ou não com *Bacillus subtilis*, na arquitetura radicular, promoção do crescimento, pigmentos fotossintéticos e acúmulo de nutrientes em plantas de milho cultivadas sob níveis de P. O experimento foi realizado em condições de estufa, com delineamento em blocos casualizados e os tratamentos arranjados em esquema fatorial 8×3 . Inoculações individuais de *Bacillus subtilis* (IPACC26), *Rhizophagus clarus* (RJN102A), *Claroideoglomus etunicatum* (SCT101A), um inoculante comercial de *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR ULTRA) foram testadas, além de três coinoculações (IPACC26 com cada fungo) e um controle sem microrganismos. Esses tratamentos foram combinados com três níveis de adubação fosfatada: 0, 50 e 100% da dose recomendada de P_2O_5 para o milho. De modo geral, a colonização micorrízica beneficiou as plantas de milho através do aumento do teor de glomalina no solo, melhoria da arquitetura radicular, aumento de pigmentos fotossintéticos, acúmulo de P e outros nutrientes, tanto na parte aérea quanto na raiz, resultando em melhor crescimento e produção de biomassa, nos níveis de 0 e 50% de P. Esses efeitos foram potencializados pelas inoculações com *R. clarus* e *C. etunicatum*, isolados ou em combinação com *B. subtilis*, especialmente sob condições de nível moderado (50% de P). Conclui-se que as estirpes de *R. clarus* e *C. etunicatum* co-inoculadas com *B. subtilis* apresentam grande potencial de uso como inoculantes na cultura do milho, contribuindo para redução do uso de fertilizantes fosfatados.

Palavras-chave: Biofertilizante. Adubação fosfatada. Simbiose. *Zea mays*.

ABSTRACT

An alternative to increase phosphorus (P) availability in soil for plants is the use of microorganisms capable of facilitating the use of phosphate fertilizers and/or solubilizing residual P. In this context, the objective of this research was to evaluate the influence of three arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), either alone or in combination with *Bacillus subtilis*, on root architecture, growth promotion, photosynthetic pigments, and nutrient accumulation in corn plants grown under varying P levels. The experiment was conducted under greenhouse conditions, with a randomized block design and treatments arranged in an 8 × 3 factorial scheme. Individual inoculations of *Bacillus subtilis* (IPACC26), *Rhizophagus clarus* (RJN102A), *Claroideoglomus etunicatum* (SCT101A), and a commercial inoculant of *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR ULTRA) were tested, along with three coinoculations (IPACC26 with each fungus) and a control without microorganisms. These treatments were combined with three levels of phosphate fertilization: 0, 50, and 100% of the recommended dose of P₂O₅ for corn. Overall, mycorrhizal colonization benefited corn plants by increasing soil glomalin content, improving root architecture, increasing photosynthetic pigments, and enhancing P and other nutrient accumulation in both aerial and root parts, resulting in better growth and biomass production at 0 and 50% P levels. These effects were further enhanced by inoculations with *R. clarus* and *C. etunicatum*, either alone or in combination with *B. subtilis*, especially under moderate P levels (50% P). It is concluded that the strains of *R. clarus* and *C. etunicatum* co-inoculated with *B. subtilis* show great potential as inoculants for corn cultivation, contributing to the reduction of phosphate fertilizer use.

Keywords: Biofertilizer. Phosphate fertilization. Symbioses. *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de colonização micorrízica em plantas: (1) desenvolvimento da simbiose com liberação de exsudatos e atração de FMAs, (2) colonização das células radiculares por FMAs, formando vesículas e arbúsculos, (3) benefícios observados, como maior crescimento radicular e melhor absorção de nutrientes.....	19
Figura 2 – Umidade relativa do ar e temperatura média do ar dentro da estufa durante o período experimental.	26
Figura 3 – Colonização por micorrizas, hifas, arbúsculos e por vesículas observadas em raízes de plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação.....	32
Figura 4 – Microscopia das raízes de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação	33
Figura 5 – Concentração da proteína do solo relacionada à glomalina facilmente extraível (PSRG-FE) de plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação	34
Figura 6 – Comprimento da raiz, diâmetro médio da raiz, número médio de ramificações, área de superfície de raiz e massa de matéria seca da raiz de plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação.....	36
Figura 7 – Morfologia das raízes de plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação	37
Figura 8 – Clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total e carotenoides de plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação.....	38
Figura 9 – Temperatura foliar de plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação.....	39
Figura 10 – Acúmulo de fósforo na parte aérea, raiz, total e eficiência de utilização de fósforo de plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação.....	41
Figura 11 – Comprimento da planta, número de folhas, diâmetro basal do colmo e massa de matéria seca parte aérea de plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação.	43
Figura 12 – Plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e	

coinoculação.	44
Figura 13 – Folhas representativas de cada nível de P avaliado, evidenciado a deficiência de P apresentado nos tratamentos com 0 e 50% da adubação fosfatada.	45
Figura 14 – Índice de resposta a inoculação na massa seca da parte aérea e no acúmulo total de fósforo de plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação.	46
Figura 15 – Análise de componentes principais e dendrograma de grupos para variáveis de fósforo total, fósforo na parte aérea, fósforo na raiz, massa seca da parte aérea, comprimento de planta, comprimento da raiz, massa seca da raiz, diâmetro médio da raiz, número médio de ramificações (NMR), área de superfície específica da raiz, diâmetro basal do colmo, clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total, carotenoides, temperatura foliar e proteína do solo relacionada à glomalina facilmente extraível (PSRG-FE) de plantas de milho submetidas aos diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atributos químicos e textural do solo utilizado no experimento.....	25
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1	Impactos da utilização de fertilizantes fosfatados na produção agrícola	16
2.2	Formas e dinâmica do fósforo no sistema solo-planta	17
2.3	Fungos micorrízicos arbusculares.....	18
2.4	Bactérias promotoras do crescimento de plantas e o gênero <i>Bacillus</i>	21
2.5	Inoculação com FMAs e BPCPs no milho para otimizar o uso dos fertilizantes fosfatados	22
3	METODOLOGIA.....	24
3.1	Local de condução do experimento	24
3.2	Delineamento experimental	24
3.3	Preparo do solo e montagem do experimento	24
3.4	Avaliações morfológicas da parte aérea e raízes e produção de biomassa.....	27
3.5	Taxa de colonização micorrízica	27
3.6	Extração e quantificação da proteína do solo relacionada à glomalina facilmente extraível (PSRG-FE)	28
3.7	Acúmulo de fósforo e outros nutrientes nas plantas	28
3.8	Taxa de resposta à inoculação (IR)	29
3.9	Eficiência de utilização de fósforo pelas plantas.....	29
3.10	Pigmentos fotossintéticos e temperatura foliar.....	29
3.11	Análise estatística.....	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Taxa de colonização micorrízica	31
4.2	Concentração da proteína do solo relacionada à glomalina facilmente extraível (PSRG-FE).....	34
4.3	Características morfológicas e produção de biomassa da raiz.....	35
4.4	Pigmentos fotossintéticos e temperatura foliar.....	38
4.5	Acúmulo de P e outros nutrientes e eficiência de utilização do P pelas plantas	40
4.6	Parâmetros morfológicos e produção de biomassa da parte aérea.....	42
4.7	Índice de resposta à inoculação (IR)	45
4.8	Dendrograma dos grupos e PCA.....	46

5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da população global e da exploração dos recursos naturais, a produção de alimentos por meio de técnicas sustentáveis é considerada como emergente no século atual. Dessa forma, os sistemas de produção agrícola são os mais instigados a contribuir com políticas que surgem como alternativas a agricultura convencional por meio de práticas de conservação do solo e do meio ambiente. Embora a utilização de insumos agrícolas apresente benefícios, como aumento da produtividade das culturas, aplicações intensivas de fertilizantes químicos, principalmente, aqueles contendo nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) podem implicar na redução da qualidade da água e na diminuição da fertilidade biológica do solo (Song *et al.*, 2021).

Dentre esses fertilizantes, os fosfatados se destacam pois são aplicados em grandes quantidades em função da sua dinâmica no solo, principalmente nos solos tropicais, onde sua disponibilidade pode ser reduzida devido a fatores como a forte adsorção do P com óxidos de ferro e alumínio e/ou precipitação com íons de alumínio e ferro, favorecendo a formação de compostos mineralogicamente estáveis (P fixado) (Paiva *et al.*, 2022; Szerlag *et al.*, 2022; Bedassa, 2023). Essa particularidade do P, além de colaborar no surgimento de problemas ambientais, provoca aumento de custo nos sistemas de produção agrícola (Gatiboni *et al.*, 2020; Mardamootoo; Preez; Bernard, 2021).

Outro fator acerca do P é a possibilidade de esgotamento dos fertilizantes químicos fosfatados, pois, são extraídos de jazidas de rochas fosfáticas finitas, havendo preocupação global sobre esse assunto. Logo, estratégias de manejo são necessárias para otimizar seu uso, e consequentemente minimizar danos ambientais provocados pelo uso intensivo deste fertilizante. Nesse sentido, a proposta de explorar o potencial intrínseco das interações planta-microrganismo para acessar o P residual do solo por meio da biotecnologia de inoculação das plantas é tida como estratégia promissora (Timmusk *et al.*, 2017).

Existem vários microrganismos presentes no solo capazes de atuar como facilitadores na mineralização e solubilização de nutrientes, e disponibilizá-los para as plantas (Smith; Read, 2008). Além disso, alguns microrganismos podem modificar a arquitetura das raízes, aumentando a área de absorção de água e nutrientes pelas plantas (Berta; Fusconi; Trotta, 1993; Ramírez-Flores *et al.*, 2019; Araujo *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2021). Intitulados de biofertilizantes, os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) apresentam potencial de uso, pois melhoram o crescimento, a

nutrição e a tolerância a estresses bióticos e abióticos nas plantas, promovendo redução no uso de fertilizantes químicos (Emmanuel; Babalola, 2020).

Os FMAs são biotróficos obrigatórios que colonizam o córtex radicular e desenvolvem um micélio externo que se estende pelo solo ao redor das raízes, e funciona como uma área de superfície adicional de absorção para a planta, aumentando sua capacidade de absorver nutrientes, principalmente os de baixa mobilidade no solo, como é o caso do P (Ezawa; Saito, 2018), bem como o potássio, manganês, zinco e ferro (Frew *et al.*, 2018; Rocha *et al.*, 2018; Saboor *et al.*, 2021).

Assim como os FMAs, as BPCPs beneficiam o crescimento e desenvolvimento de plantas, pois são capazes de produzir o ácido indolacético (AIA), que estimula o desenvolvimento das raízes e consequentemente influencia na absorção e solubilização de nutrientes (Silvestrini *et al.*, 2023). Essas bactérias podem habitar a rizosfera da planta ou atuar no seu interior, sem ocasionar danos ao vegetal. Dentre as BPCPs, estirpes da espécie *Bacillus subtilis* tem se destacado pelo potencial de produção de AIA (Aquino *et al.*, 2021) e solubilização de fosfatos inorgânicos, especialmente fosfato de ferro (Batista *et al.*, 2018), resultando na melhoria da arquitetura radicular e da nutrição das plantas (Aquino *et al.*, 2021; Araujo *et al.*, 2021).

O potencial dos efeitos benéficos ocasionados pela interação tripartite (planta-fungo-bactéria), e da sua importância na aplicação em cultivos de elevado interesse econômico, como a cultura do milho (*Zea mays* L.), vem sendo amplamente investigados (Liu *et al.*, 2016; Battini *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2021). Portanto, estudos que buscam elucidar o potencial da diminuição do uso de fertilizantes fosfatados na cultura do milho, utilizando a inoculação com FMAs e BPCPs são importantes para a sustentabilidade dos agroecossistemas.

Nessa perspectiva, a hipótese desta pesquisa foi que a inoculação isolada e/ou coinoculação de FMAs e BPCP melhora a arquitetura radicular e aumenta o crescimento e o acúmulo de nutrientes, especialmente o P, em plantas de milho, podendo contribuir para redução do uso de fertilizantes fosfatados na cultura. Para testar essa hipótese, foi avaliado a influência de três espécies FMAs, em combinação ou não com *Bacillus subtilis*, na arquitetura radicular, promoção do crescimento, pigmentos fotossintéticos e acúmulo de nutrientes em plantas de milho cultivadas sob níveis de P.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Impactos da utilização de fertilizantes fosfatados na produção agrícola

A produção agrícola no Brasil aumentou nas últimas décadas em função dos avanços substanciais de práticas agronômicas, destacando-se o melhoramento genético de plantas, incluindo o desenvolvimento de híbridos, o cultivo em segunda safra e adoção de sistemas integrados (Withers *et al.*, 2018). Apesar dos avanços, o uso de fertilizantes químicos ainda é indispensável, o que torna a aplicação intensiva desses insumos uma ameaça ao meio ambiente. Essa realidade não se limita ao Brasil, é um problema enfrentado por muitos outros países (Ren *et al.*, 2021). Nesse contexto, a busca por uma produção agrícola sustentável que não comprometa o meio ambiente nem ameace o bem-estar humano, continua sendo um desafio complexo e, muitas vezes utópico.

Notavelmente, a agricultura intensiva depende de insumos agrícolas, no entanto, é crucial combinar o uso consciente desses recursos. Um exemplo disso são os fertilizantes fosfatados, predominantemente derivados de rochas fosfáticas, um recurso finito, as quais são convertidas em uma variedade de produtos, incluindo fosfato diamônico (DAP), fosfato monoamônico (MAP), superfosfato simples (SSP) e superfosfato triplo (STP) (Gong *et al.*, 2022). Esses fertilizantes estão entre os fatores mais importantes que limitam a produtividade das culturas (Azziz *et al.*, 2012).

O teor total de fósforo (P) no solo no Brasil varia de 100 a 3000 mg dm⁻³, com concentrações mais elevadas na região Sul (> 500 mg kg⁻¹) em comparação com outras partes do país (200 mg kg⁻¹) (Pavinato *et al.*, 2021). No entanto, a quantidade de P disponível para as plantas é estimada em 0,002 a 2,0 mg L⁻¹, o que equivale a menos de 0,1% do total de P nos solos (Yang *et al.*, 2021). Embora o teor total de P nos solos possa ser alto, a quantidade disponível para as plantas geralmente varia de baixa a muito baixa.

Os fosfatos limitam a produtividade agrícola devido à maioria dos solos brasileiros serem altamente fixadores de P, em virtude da predominância de solos altamente intemperizados. O problema da deficiência de P é frequentemente resolvido com a aplicação de altas doses de fertilizantes, excedendo a quantidade de P demandada pelas culturas (Roy *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2016), uma prática que contribui para a contaminação progressiva do solo a longo prazo (Fall *et al.*, 2023).

Uma parcela substancial da população global depende de recursos finitos de rochas fosfáticas. A preocupação com a má gestão desses recursos vitais, juntamente com os esforços contínuos para aumentar a fertilidade do solo, tem estimulado o interesse na recuperação e reciclagem desse elemento (Roy, 2017). Por tanto, a recuperação e reciclagem de P residual são fundamentais para garantir a segurança alimentar e o desenvolvimento sustentável.

2.2 Formas e dinâmica do fósforo no sistema solo-planta

Plantas cultivadas sob condições de deficiência de P apresentam redução no sistema fotossintético devido à ausência de componentes orgânicos metabolizados a partir do P, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e fosfolípidios (Chen *et al.*, 2023). No solo, o P está presente em frações distintas, podendo ser encontrado naturalmente a partir de minerais primários, como apatita (Cescas; Tyner; Syers, 1970), ou como parte integrante da matéria orgânica do solo, no qual representa uma fração significativa do P no solo (McLaren *et al.*, 2015).

As plantas absorvem o P na forma de íons ortofosfato (H_3PO_4), especificamente nas formas de H_2PO_4^- em solos ácidos e HPO_4^{2-} em condições neutro/alcalino (Nassume *et al.*, 2011). Essa particularidade favorece a complexação do P com íons de Fe e Al por meio de atração eletrostática, ou adsorção nas superfícies de óxidos de Fe e Al (Shan *et al.*, 2021), ambos processos implicam na fixação de P em solos ácidos, reduzindo sua disponibilidade para as plantas. Além do pH, fatores biogeoquímicos influenciam na disponibilidade de P, como temperatura, umidade, exsudatos radiculares e ação dos microrganismos do solo (Ratmini, 2022).

Conforme supracitado, o P no solo pode ser de origem orgânica (Po) ou inorgânica (Pi). Essas frações estão correlacionadas de maneira que, quando o conteúdo de Pi diminui, as comunidades microbianas podem decompor o Po para reabastecer o Pi limitado (Lin *et al.*, 2018). Esse processo de decomposição é essencial para a ciclagem de nutrientes, pois garante que o P esteja disponível nos solos, mesmo em condições limitantes ao crescimento das plantas. Portanto, o fornecimento de P em condições ideais para as plantas ocorre frequentemente por meio de intervenções antrópicas, como a fertilização.

A problemática acerca da adubação fosfatada reside no fato de que, quando aplicado, a maior parte do P pode ser rapidamente fixada no solo. Estima-se que as plantas utilizam apenas

20-30% do P aplicado (López-Arredondo, 2014). Isso favorece a necessidade de aplicações intensivas de P, contribuindo para o surgimento de problemas ambientais e o aumento do P residual no solo. Nesse contexto, os microrganismos desempenham um papel importante na mediação da disponibilidade de P para as plantas. A manipulação de microrganismos específicos pode aumentar a disponibilidade de P no solo, tornando a adubação mais eficiente e sustentável (Richardson; Simpson, 2011).

2.3 Fungos micorrízicos arbusculares

A divisão Glomeromycota engloba todos os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), e representam a maior parte das espécies conhecidas de micorrizas devido sua importante contribuição no crescimento das plantas. Estes organismos se associam com córtex da raiz através do crescimento de hifas intercelular, capazes de evoluir e formar estruturas específicas, como vesículas e arbúsculos (Smith; Read, 2008; Wang; Qiu, 2006). Esses fungos, sem exceção, são biotróficos obrigatórios, ou seja, as raízes de suas plantas hospedeiras são indispensáveis para sua multiplicação (Kulkarni *et al.*, 1997).

A relação micorrízica é expressão de um evento mutuamente benéfico, plantas suprem o fungo com carbono fixado, açúcares e lipídios, enquanto o fungo melhora a nutrição mineral das plantas (Moreira; Siqueira, 2006), a resistência ao estresse, a estrutura do solo e a fertilidade, oferecendo potencial para agricultura sustentável (Chen *et al.*, 2018). A relação simbiótica é facilitada pela produção de hifas intra e extra-radiculares, que são capazes de absorver elementos minerais do solo e transferi-los para o ambiente radicular, onde são prontamente absorvidos (Berbara; Souza; Fonseca, 2006). Esse mecanismo é especialmente benéfico para absorção de elementos de baixa mobilidade no solo, como o P. O micélio extra-radicular é mais extenso que raízes, e pode variar de $9,7 \pm 2,0$ a $48,8 \pm 9,9$ m por planta, dependendo do hospedeiro e da identidade do FMA (Sbrana *et al.*, 2020), e funciona como uma área de superfície adicional de absorção para a planta, aumentando a capacidade de exploração de nutrientes (Smith; Read, 2008).

A simbiose entre a planta e os FMAs inicia com a troca de moléculas sinalizadoras. As estrigolactonas, que são produzidas pelas plantas, são detectadas pelos FMAs (Akiyama; Matsuzaki; Hayashi, 2005). Em resposta, os FMAs produzem uma mistura de quito-oligossacarídeos e lipooligossacarídeos, conhecidos como fatores Myc. Esses fatores são

reconhecidos pela planta, induzindo a expressão de genes-chave e eventos celulares específicos (Figura 1). Como resultado, ocorre a colonização das raízes e a formação de estruturas como vesículas, que atuam como reservas para os FMAs, bem como os arbúsculos, que facilitam a troca de nutrientes entre a planta e os FMAs (Ferrol; Azcon-Aguilar; Tienda, 2019).

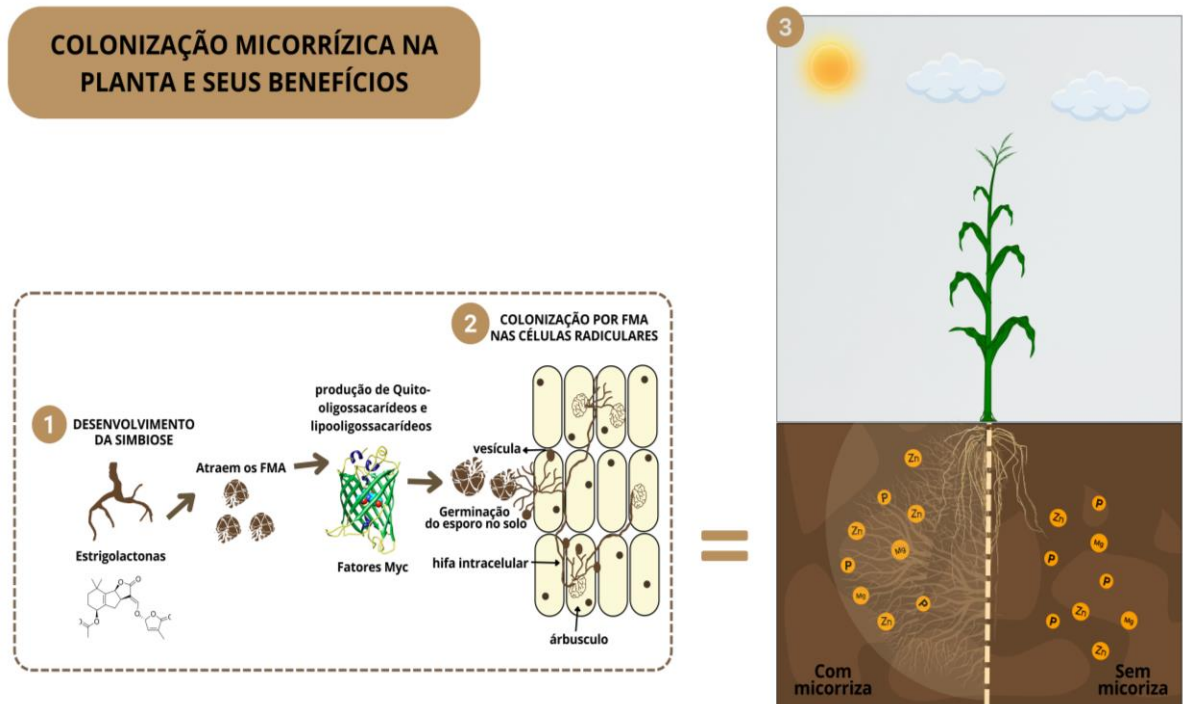


Figura 1 – Representação esquemática do processo de colonização micorrízica em plantas: (1) desenvolvimento da simbiose com liberação de exsudatos e atração de FMAs, (2) colonização das células radiculares por FMAs, formando vesículas e arbúsculos, (3) benefícios observados, como maior crescimento radicular e melhor absorção de nutrientes. Fonte: autoria própria.

As plantas colonizadas por FMAs são duas vezes mais eficientes na absorção de nutrientes em comparação com plantas não colonizadas. Naturalmente, as plantas absorvem nutrientes pelas células epidérmicas das raízes, com o auxílio dos pelos radiculares. Na presença dos FMAs, além desse mecanismo, a absorção também ocorre através das hifas fúngicas nas células corticais da raiz (Smith; Smith, 2011). A absorção simbiótica de P, por exemplo, envolve a aquisição de P inorgânico da solução do solo pelos micélios extra radiculares, seguida pela translocação para a raiz e transferência para as células da planta. Isso demonstra que a absorção de P pelas hifas consegue ser mais eficiente do que pelas raízes não colonizadas, uma vez que as hifas aumentam o comprimento da raiz e a área de superfície das raízes, ajudando na absorção de água e nutrientes a longas distâncias (Ferrol; Azcon-Aguilar; Perez-Tienda, 2019; Busso; Busso, 2022).

Além dos benefícios diretos proporcionados as plantas, há evidências que proteínas do solo relacionada à glomalina estão associadas a atividade dos FMAs no solo. A glomalina é uma glicoproteína abundante, quase ubíqua, que se presumiu ser produzido por FMAs (Wright *et al.*, 1996; Wright; Upadhyaya, 1996). Essa glicoproteína pode ter relação com estabilização dos agregados do solo, uma vez que sua presença e acumulação decorre de muitos anos, sendo parte significativa da matéria orgânica do solo (MOS) (Rillig *et al.*, 2001; Halvorson; Gonzalez, 2006). Outro papel importante é sua capacidade de sequestrar elementos potencialmente tóxicos como Cu, Pb, Zn, Cd, Al e Mn, aliviando efeitos negativos em várias formas de vida no solo, incluindo as plantas (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2004; Chern; Tsai; Ogunseitan, 2007; Vodnik *et al.*, 2008).

Bedini *et al.* (2007) e Wilson *et al.* (2009) apresentam evidências de que a glomalina detectada no solo é apenas correlativamente associada aos produtos metabólicos diretos dos FMAs. Embora existam numerosas correlações positivas entre os FMAs e as concentrações de glomalina no solo, implicando ligações causais (Lutgen *et al.*, 2003; Steinberg; Rillig, 2003), essas respostas sugerem que o entendimento sobre a glomalina ainda é limitado e que sua natureza química no solo não foi determinada de forma conclusiva (Gillespie *et al.*, 2011). Apesar disso, a literatura consolidou a glomalina como um indicador de qualidade biológica do solo, relacionando sua presença à atividade dos FMAs (Agnihotri *et al.*, 2021; Gomes *et al.*, 2021).

O potencial de espécies de FMAs, como *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, e de inoculantes à base de FMAs comercializados no Brasil, como Rootella BR ULTRA (à base de *Rhizophagus intraradices*), e recentemente EndoMaxx® SC, composto por quatro espécies diferentes de FMAs – *Glomus mosseae*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* e *Glomus etunicatum*, tem sido demonstrado em diferentes condições de estresses bióticos e abióticos nas plantas (Ferreira *et al.*, 2015; Cely *et al.*, 2016; Pedone-Bonfim *et al.*, 2018; Rosita *et al.*, 2020; Stoffel *et al.*, 2020; Pedroso *et al.*, 2022).

Recentemente, o potencial de uso de FMAs em combinação com bactérias promotoras do crescimento de plantas também tem se destacado (Alexandre *et al.*, 2021; Ujvári *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2022 ; Ngosong *et al.*, 2022). É evidente que os FMAs desempenham um papel crucial nos ecossistemas. Eles não apenas beneficiam as plantas por meio de suas interações simbióticas, mas também possuem um significativo potencial econômico. O uso de FMAs como biofertilizantes representa uma estratégia promissora para agricultura sustentável, oferecendo uma alternativa para o aumento da produtividade agrícola e otimização no uso de fertilizantes, especialmente os fosfatados.

2.4 Bactérias promotoras do crescimento de plantas e o gênero *Bacillus*

O termo “bactérias promotoras do crescimento de plantas” (BPCPs) designa as bactérias que possuem a capacidade de colonizar a rizosfera e/ou as raízes das plantas e possibilitar o aumento do crescimento vegetal (Vejan *et al.*, 2016). Embora a rizosfera seja colonizada por diversos microrganismos, as bactérias estão mais abundantemente presentes (Kaymak, 2010). Pesquisas relacionadas a eficiência das BPCPs, derivadas da rizosfera ou endofíticas no crescimento geral das plantas, têm sido realizadas (Emami *et al.*, 2019; Hashem; Tabassum; Abd-Allah, 2019; Mahdi *et al.*, 2020; Ganesh *et al.*, 2022). A incorporação de BPCPs, como bioestimulantes, nos sistemas de cultivo tem se mostrado como uma estratégia promissora alinhando a agricultura sustentável, o aumento da produtividade e a busca pela segurança alimentar global (Tsoetsi *et al.*, 2022).

BPCPs beneficiam as plantas através de mecanismos diretos e indiretos. Estas podem melhorar diretamente a disponibilidade de nutrientes (por exemplo, N, P e Fe), além de produzir e alterar a homeostase de hormônios de crescimento como auxina, etileno, citocinina e ácido giberélico. Indiretamente, BPCPs auxiliam na redução de estresses abióticos e na proteção de plantas contra patógenos (Blake; Christensen; Kovács, 2020; Kong; Liu, 2022; Ajijah *et al.*, 2023). Em razão dos benefícios promovidos por essas bactérias, a produção de fertilizantes baseados nesses organismos parece se apresentar como solução para a busca por fertilização segura (Dobrzyński; Jakubowska; Dybek, 2022).

Atualmente, *Bacillus* spp. está entre as comunidades predominantes de BPCPs, sendo amplamente estudadas devido a sua capacidade de formar esporos altamente resistentes e tolerantes a estresses, a produção de metabólitos que estimulam o crescimento das plantas e aumentam a resistência a doenças, além da capacidade de resistência em uma ampla gama de habitats (Hashem; Tabassum; Abd-Allah, 2019, Shahid *et al.*, 2021).

O gênero *Bacillus* foi descrito em 1872 por Cohn, e inclui bactérias caracterizadas por possuírem forma de bastonete, serem Gram-positivas e aeróbicas ou facultativamente anaeróbicas (Miljaković; Marinković; Balešević-Tubić, 2020; Blake, Christensen; Kovács, 2020). Embora *Bacillus* spp. inclua bactérias patogênicas e não patogênicas, a maioria das espécies são considerados seguras para uso no meio ambiente (Miljaković; Marinković; Balešević-Tubić, 2020). Dito isso, o primeiro fertilizante bacteriano, Alinit, foi desenvolvido a partir de *Bacillus* spp., e resultou no aumento do rendimento de culturas em 40% (Kilian *et al.*, 2000). Os efeitos benéficos de *Bacillus* spp. no crescimento e produtividade de plantas já foram

demonstrados para diversas culturas, incluindo o milho (Aloo; Makumba; Mbega, 2019; Aquino *et al.*, 2021).

O gênero abrange mais de 200 espécies que representam as bactérias mais predominantes no solo, entre os quais *Bacillus subtilis* foi identificado na rizosfera de diferentes plantas (Miljaković; Marinković; Balešević-Tubić, 2020; Blake; Christensen; Kovács, 2020). *B. subtilis* é uma bactéria não patogênica e organismo modelo em estudos referentes à produção de metabólitos secundários, esporulação, produção de biofilme e fixação às raízes das plantas, além do mais, seus vários benefícios indica o uso promissor para aplicações agrícolas (Kovács, 2019; Aquino *et al.*, 2021).

As plantas dependem do auxílio de simbioses microbianos para desempenhar determinados mecanismos. Saeide, Prochwnik e Dobrowolska (2018) citam a capacidade de estirpes de *B. subtilis* em atuar na solubilização do P, por meio da produção de vários ácidos orgânicos, aumentando a disponibilidade de P para as plantas. As propriedades benéficas de *B. subtilis* têm sido exploradas em diferentes produtos biológicos (Borris, 2015), além disso, BPCPs presentes na rizosfera podem interagir com outros táxons, como fungos, e promover respostas positivas nas plantas (Ajijah *et al.*, 2023).

2.5 Inoculação com FMAs e BPCPs no milho para otimizar o uso dos fertilizantes fosfatados

Considerado uma das culturas de grãos mais cultivadas no mundo, o milho (*Zea mays* L.) é um componente essencial da alimentação humana e animal, além de ser amplamente utilizado na indústria, com destaque recente na produção de biocombustível (Begum *et al.*, 2019). Devido ao ciclo rápido, a cultura do milho possui uma alta demanda por nutrientes, que geralmente é suprida através de aplicações contínuas de fertilizantes químicos. Para isso, inoculações com FMAs e BPCPs na cultura do milho surge como uma estratégia promissora para melhorar a eficiência do uso fertilizantes, reduzindo custos e promovendo uma produção mais sustentável.

Os benefícios proporcionados pelos FMAs em plantas de milho são relatados em diferentes condições. Esses benefícios incluem o aumento da atividade fotossintética e a tolerância a várias condições de estresse, como estresse hídrico, salino e, notavelmente, estresse nutricional (Khan; Tian, 2022). Dentre os estresses nutricionais, a deficiência de P recebe

destaque, onde os FMAs têm se mostrado um impacto significativo na eficiência do uso de fertilizantes fosfatados.

Entre as melhorias influenciadas pelos FMAs, destaca-se aumento da área foliar e da taxa fotossintética de plantas de milho pelas espécies *Glomus mosseae* e *Rhizophagus irregularis* (Amerian; Stewart; Griffiths, 2001). Comparado às plantas não inoculadas, *Claroideoglomus etunicatum* melhorou o conteúdo de clorofila e absorção de P no milho em até 29% (Almagrabi; Abdelmoneim, 2012). A inoculação de *Rhizophagus irregularis* resultou em raízes mais longas e maior absorção de P em condições alcalinas no cultivo do milho (Merlos *et al.*, 2016). Os benefícios promovidos pelas BPCPs são semelhantes aos dos FMAs, destacando-se a produção de fitohormônios que mantêm mecanismos vitais, como a modulação da fisiologia e expressão genética das plantas. Esses fitohormônios são capazes de beneficiar o crescimento e desenvolvimento das plantas, com avanços recentes que possuem potencial de aplicação na produção agrícola (Orozco-Mosqueda; Santoyo; Glick, 2023). A inoculação de FMAs com BPCPs em plantas tem potencial de aumentar ainda mais a relação simbiótica, impactando positivamente no crescimento de plantas, conforme destacam Wilkes *et al.* (2021).

A compreensão da interação sinérgica entre FMAs e BPCPs é necessária, considerando que as plantas dedicam de 5 a 30% de seus fotoassimilados para apoiar o crescimento bacteriano no solo (Almeida *et al.*, 2020) e outros 20% são alocados para manutenção das redes simbióticas com FMAs (Smith; Read, 2008). Nesse contexto, a eficiência dos FMAs no crescimento das plantas é evidente, e esses efeitos podem ser ainda mais potencializados pela presença de BPCPs. Tais associações demonstram ser altamente eficazes, particularmente em situações de estresses, como deficiência nutricional.

3 METODOLOGIA

3.1 Local de condução do experimento

O experimento foi realizado em estufa agrícola do *Campus* Professora Cinobelina Elvas, da Universidade Federal do Piauí (CPCE/UFPI), localizada no município de Bom Jesus, estado do Piauí, na região semiárida do Brasil (9°05'02.0"S, 44°19'32.0"W, altitude de 277 m). A estrutura da estufa consistia em um telhado coberto com plástico e laterais revestidas por uma tela de polietileno perfurada, proporcionando um ambiente protegido para o cultivo das plantas. O experimento foi conduzido de novembro de 2023 a janeiro de 2024.

3.2 Delineamento experimental

O experimento ocorreu no delineamento em blocos casualizados, compreendendo um esquema fatorial duplo (8×3), com quatro repetições. O primeiro fator foi a inoculação de microrganismos, com os seguintes tratamentos: inoculações individuais com uma estirpe de BPCP (*Bacillus subtilis*, estirpe IPACC26), duas estirpes de FMAs (*Rhizophagus clarus*, estirpe RJN102A e *Claroideoglomus etunicatum*, estirpe SCT101A), um inoculante micorrízico comercial (Rootella BR ULTRA, à base de *Rhizophagus intraradices*), três coinoculações (*B. subtilis* + Rootella BR ULTRA, *B. subtilis* + *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum*) e um tratamento controle sem aplicação de microrganismo. O segundo fator foi referente à adubação fosfatada: sendo 0, 50 e 100 % de P_2O_5 da dose recomendada para cultura do milho.

3.3 Preparo do solo e montagem do experimento

Cada unidade experimental compreendeu um vaso (6,5 dm³) contendo 8 kg (peso seco) de solo esterilizado a 121 °C e 1 atm por 1 hora na autoclave. O solo utilizado no experimento, oriundo de área com vegetação nativa, localizado no Brasil (9°04'45.2" S, 44°19'36.8" W), foi

classificado como Latossolo Amarelo Distrófico (Santos *et al.*, 2013), a profundidade da coleta ocorreu na camada de 0-20 cm. Amostras simples de solo foram coletadas e homogeneizadas para formar uma composta, que foi submetida à caracterização química e granulométrica. Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Atributos químicos e textural do solo utilizado no experimento.

pH H ₂ O	H+Al	Al	Ca	Mg cmolc dm ⁻³	K	SB	T	P mg dm ⁻³	K
4,8	3,67	2,50	0,55	0,05	0,16	0,76	4,43	4,1	62

Cu	Mn	Fe	Zn	V	m	M.O	Argila	Silte	Areia
mg dm ⁻³				%	%	%	%	%	%
0,32	16,9	63,5	1,39	17,1	76,7	1,83	21,3	2,7	76

P, K, Cu, Fe, Mn e Zn - Extrator Mehlich1; Ca, Mg e Al - Extrator KCl - 1 mol/L; H + Al - Extrator Acetato de Cálcio a pH 7,0; Matéria Orgânica (MO) - método Walkley-Black; Enxofre (S) - Ca (H₂PO₄)₂; SB = Soma de Bases Trocáveis; CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0; V = Índice de Saturação de Bases; m = Índice de Saturação de Alumínio.

De acordo com análise química do solo, foi realizada correção do pH empregando o método da elevação da saturação por bases a 60%, recomendado para cultura do milho (Sousa; Lobato, 2004), utilizando calcário dolomítico, com a seguinte composição: CaO 32%, MgO 15% e PRNT 92,38%. Após período de reatividade do calcário (30 dias) foi realizada adubação com fósforo, na concentração de 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ para o nível de 100%, 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅ para o nível de 50% e no nível de 0% não foi aplicado adubação fosfatada. A fonte de fósforo utilizada foi o superfosfato simples (18% de P₂O₅). Para todos os tratamentos foi aplicado potássio, na concentração de 120 kg ha⁻¹ de K₂O (cloreto de potássio, 60% de K₂O), cobre na concentração de 2,0 kg ha⁻¹ (sulfato de cobre, 26,23% de Cu) e zinco na concentração de 1,5 kg ha⁻¹ (sulfato de zinco, 22,73%), de acordo com a disponibilidade dos elementos em solos do Cerrado (Sousa; Lobato, 2004), além de N na concentração de 160 kg ha⁻¹ (ureia, 45% de N), com base na expectativa de rendimento de 10 toneladas por hectare.

As estirpes RJN102A e SCT101A (*R. clarus* e *C. etunicatum*, respectivamente) foram obtidas da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG), pertencente à Universidade Regional de Blumenau (FURB) em Santa Catarina, cultivadas pelo método de culturas armadilha adaptado de Stutz e Morton (1996) e armazenadas a 4 °C desde o recebimento até a utilização. Cada inóculo foi composto por uma mistura de solo, propágulos de raízes colonizadas, hifas e esporos. A estirpe IPACC26 (*B. subtilis*), previamente selecionada por Aquino *et al.* (2021), apresenta potencial de produção de ácido indolacético (AIA) e

promoção do crescimento do milho em condições de estufa. O inoculante micorrízico comercial continha aproximadamente 167.000 propágulos por grama de produto em uma mistura de vermiculita, argila e partículas não identificadas.

A bactéria *B. subtilis* foi cultivada em meio Caldo Triptona Soja (TSB), agitado a 120 rpm a 28 °C por 3 dias. A semeadura foi realizada com adição de 3 sementes de milho (híbrido BM970VIP3) por vaso a uma profundidade de 0,5 cm. As sementes foram desinfestadas utilizando-se hipoclorito de sódio (2 %) por dois minutos e, em seguida, lavadas três vezes em água destilada esterilizada (Catão *et al.*, 2013).

As inoculações foram realizadas no momento da semeadura. Nos vasos inoculados com *B. subtilis*, foi aplicado 1,0 mL de inoculante (com uma concentração aproximada de 1×10^8 células bacterianas mL⁻¹) por semente. Nos vasos inoculados com *R. clarus* e *C. etunicatum* foram adicionados 5 g vaso⁻¹ da mistura abaixo das sementes, seguindo recomendações da CICG. A inoculação de Rootella BR ULTRA seguiu a recomendação do fabricante (16 g ha⁻¹), que após adaptação para vaso, a quantidade foi de 0,052 mg vaso⁻¹, aplicado de forma semelhante a aplicação das estirpes de FMAs.

O desbaste foi realizado aos 10 dias após semeadura (DAS), mantendo uma planta por vaso. Durante o experimento, a umidade do solo foi mantida na capacidade de vaso a 80%. Na Figura 2, estão registradas as variações de temperatura do ar e umidade do ar no interior da estufa, observadas durante o período de condução do experimento.

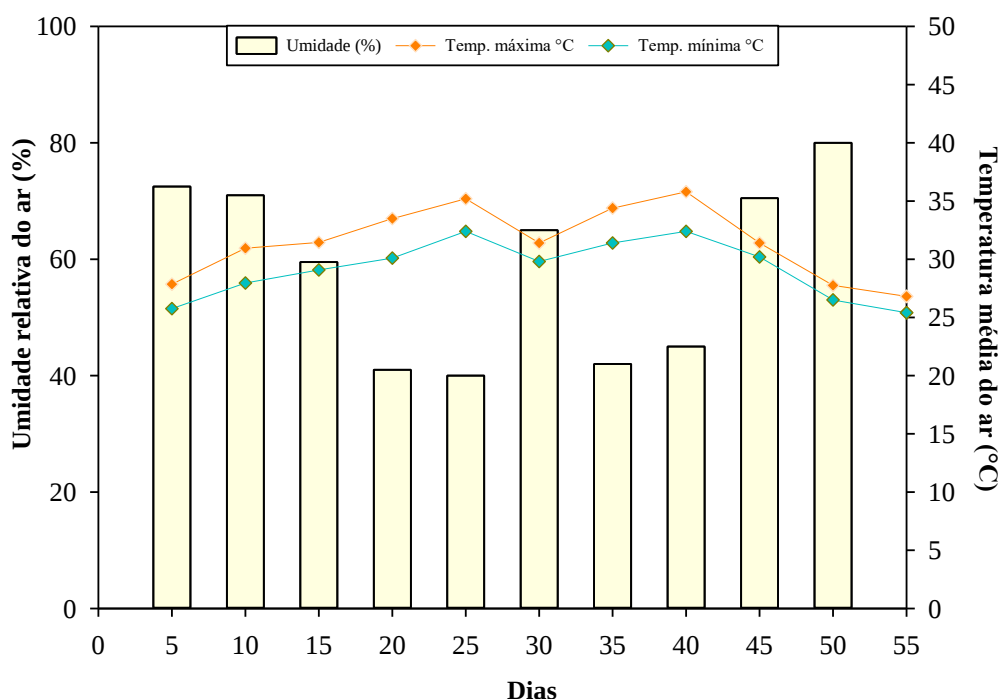


Figura 2 – Umidade relativa do ar (%) e temperatura média do ar (°C) dentro da estufa durante o período experimental.

3.4 Avaliações morfológicas da parte aérea e raízes e produção de biomassa

A coleta de dados foi realizada aos 55 DAS, quando aproximadamente 50 % das plantas haviam iniciado o florescimento. Dados referentes à morfologia da planta, como comprimento, diâmetro basal do colmo e número de folhas foram mensurados, além da obtenção de imagens comparativas com auxílio de câmera fotográfica, e posterior edição no programa *CorelDraw*.

Após lavagem das raízes, realizou-se análise morfológica do sistema radicular com auxílio de scanner (EPSON) acoplado ao computador. Posteriormente as imagens obtidas foram avaliadas no programa *RhizoVisionExplorer*, onde os dados referentes a comprimento de raiz, diâmetro médio, número médio de ramificações e área de superfície de raiz foram analisados. Separou-se 10 g de raízes de cada tratamento para a avaliação da colonização micorrízica. Em seguida, a parte aérea e o restante das raízes foram colocados para secar em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C até obtenção de massa constante.

3.5 Taxa de colonização micorrízica

Para verificação da taxa de colonização micorrízica, amostras de aproximadamente 10 g de raízes frescas foram clarificadas com KOH (10%), acidificadas com HCL (1%), e coradas com azul de Tripan (Phillips; Hayman, 1970). A quantificação da percentagem de colonização foi obtida pela identificação das estruturas fúngicas através de contagem em lâminas, utilizando o método de interseções ampliadas no microscópio (McGonigle *et al.*, 1990). As estruturas foram observadas em microscópio óptico planacromático infinito e iluminação LED, com ampliação de 40x. As imagens foram capturadas utilizando uma câmera móvel de 12 megapixels acoplada à lente do microscópio.

3.6 Extração e quantificação da proteína do solo relacionada à glomalina facilmente extraível (PSRG-FE)

A PSRG-FE foi obtida a partir da extração em autoclave. Para isso, utilizou-se 1 g de solo seco de cada tratamento, previamente peneirado em malha de 2 mm, com posterior adição de 8 mL de solução de citrato de sódio a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0, submetidos a uma temperatura de 121°C por 30 min. Após autoclavagem, foi realizada centrifugação a 3.500 rpm por 10 min, sendo coletado o sobrenadante. Após processo de extração, a PSRG-FE foi quantificada pelo método de Bradford (1976), utilizando corante Coomassie Brilliant Blue G-250 e leitura em espectrofotômetro a 590 nm de densidade óptica. Conforme o método de Wright e Updahyaya (1998), a leitura do espectrofotômetro foi baseada em uma curva padrão de concentração de proteína conhecida, utilizando albumina bovina sérica (BSA). A concentração PSRG-FE foi corrigida para mg de glomalina g^{-1} de solo, considerando-se o volume total do sobrenadante e o peso seco do solo.

3.7 Acúmulo de fósforo e outros nutrientes nas plantas

Em função da pequena quantidade de massa seca das plantas, especialmente no controle sem inoculação, foram selecionados quatro macro (P, K, Ca e Mg) e três micronutrientes (Fe, Zn e Mn) para avaliação de sua acumulação, tanto na raiz, como na parte aérea. O P, K, Zn, Mn e Fe foram selecionados por representar os elementos com menor mobilidade no solo, respectivamente (Prado, 2020). O Ca e o Mg foram selecionados devido a importante contribuição do processo de interceptação radicular, como mecanismo de contato desses nutrientes com raízes, para absorção pelas plantas.

Amostras de 0,5 g de material vegetal da parte aérea/raiz seco e moído, foram submetidos à digestão nitroperclórica, seguindo metodologia descrita por Silva (2009). A determinação do teor de P ocorreu por espectrofotometria com amarelo de vanadato (Silva, 2009). O teor de K foi determinado pelo método fotometria de chama. Os teores de Ca e o Mg foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica, bem como os micronutrientes (Fe, Zn e Mn). O acúmulo de macro e micronutrientes foram calculados multiplicando o valor

da massa seca (g) pelo teor do elemento (%) na parte aérea e na raiz, dividindo o resultado por 100.

3.8 Taxa de resposta à inoculação (IR)

Para verificação do índice de eficiência da inoculação no incremento de massa seca da parte aérea e no acúmulo total de fósforo, foi calculada a taxa de resposta à inoculação (IR) utilizando as equações (1) e (2), respectivamente. Um valor de $IR > 1$ implica uma resposta efetiva à inoculação (Lekberg; Koide, 2005).

$$(1) IR_{\text{biomassa parte aérea}} = \frac{\text{Massa seca parte aérea inoculada}}{\text{Massa seca parte aérea não inoculada}}$$

$$(2) IR_{\text{acúmulo de P parte aérea}} = \frac{\text{Acúmulo de P total inoculado}}{\text{Acúmulo de P total não inoculado}}$$

3.9 Eficiência de utilização de fósforo pelas plantas

A eficiência de utilização do fósforo (EUF) foi determinada para avaliar a influência da inoculação na utilização da adubação fosfatada. A EUF foi avaliada pelo método de balanço descrito por Syers, Johnston e Curtin (2008), no qual a porcentagem de recuperação de fósforo adicionado é calculada como:

$$EUR = \frac{\text{Remoção de fósforo pela cultura}}{\text{Fósforo aplicado}} \times 100$$

3.10 Pigmentos fotossintéticos e temperatura foliar

Para determinação dos pigmentos fotossintéticos, amostras de discos foliares foram retiradas da folha localizada no terço médio da planta, com o auxílio de um cilindro de metal

vazado, aos 55 DAS. Os discos foram alocados em tubos de ensaio, envolvidos em papel alumínio para proteção contra a radiação. Em sequência, seguiu-se a metodologia descrita por Wellburn (1994) utilizando-se 3 mL do reagente CaCO_3 saturado com dimetilsulfóxido (DMSO) com incubação a 65 °C por 30 min, em banho-maria. O equipamento utilizado para as leituras dos pigmentos foi o espectrofotômetro Leitor de Microplacas, por meio dos comprimentos de onda a 665, 649 e 480 nm.

A temperatura foliar foi avaliada utilizando câmera termográfica de imagem térmica infravermelho. As leituras foram realizadas no período entre 10h:00 e 11h:00 da manhã, tendo em vista que nesse intervalo a influência solar na temperatura das folhas está equilibrada e as taxas de transpiração são estáveis. A medição foi realizada na folha do terço médio das plantas, a fim de evitar extremos de folhas novas e velhas.

3.11 Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Bartlett). Atendidos os pressupostos, realizou-se análise de variância, seguida pelo teste de médias Scott-Knott ($\alpha=0,05$), utilizando o software Sisvar 5.6 (Ferreira, 2019). As médias foram representadas graficamente utilizando o software SigmaPlot (versão 14.0). Além disso, foi realizada avaliação conjunta das relações entre variáveis analisadas, inoculação e níveis de fósforo por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) e dendrograma de cluster.

4 RESULTADOS

Foi observada interação significativa entre as inoculações e os níveis de P para todos os parâmetros avaliados nesse estudo (Tabelas S1, S2 e S3).

4.1 Taxa de colonização micorrízica

A colonização micorrízica foi constatada em todos os tratamentos que havia inoculação com FMAs (Figura 3) e as plantas sem inoculação de FMAs não apresentaram estruturas micorrízica. De modo geral, a taxa de colonização foi mais expressiva nos tratamentos que não receberam adubação fosfatada ou que receberam metade do nível de P (50%) (Figura 3A). Nesses tratamentos, as menores taxas de colonização ($p < 0,05$) foram observadas para Rootella BR ULTRA e *B. subtilis* + Rootella BR ULTRA (Figura 3A). No que se refere às estruturas fúngicas, a colonização por hifas apresentou maior ocorrência nas raízes em comparação com as demais estruturas. Nas plantas sem aplicação de P (0%), *R. clarus* e *B. subtilis* + *R. clarus* destacaram-se ($p < 0,05$) dos demais tratamentos para colonização por hifas (Figura 3B), enquanto as taxas de colonização arbuscular e vesicular foram mais elevadas com a inoculação de *C. etunicatum* (Figura 3C, D).

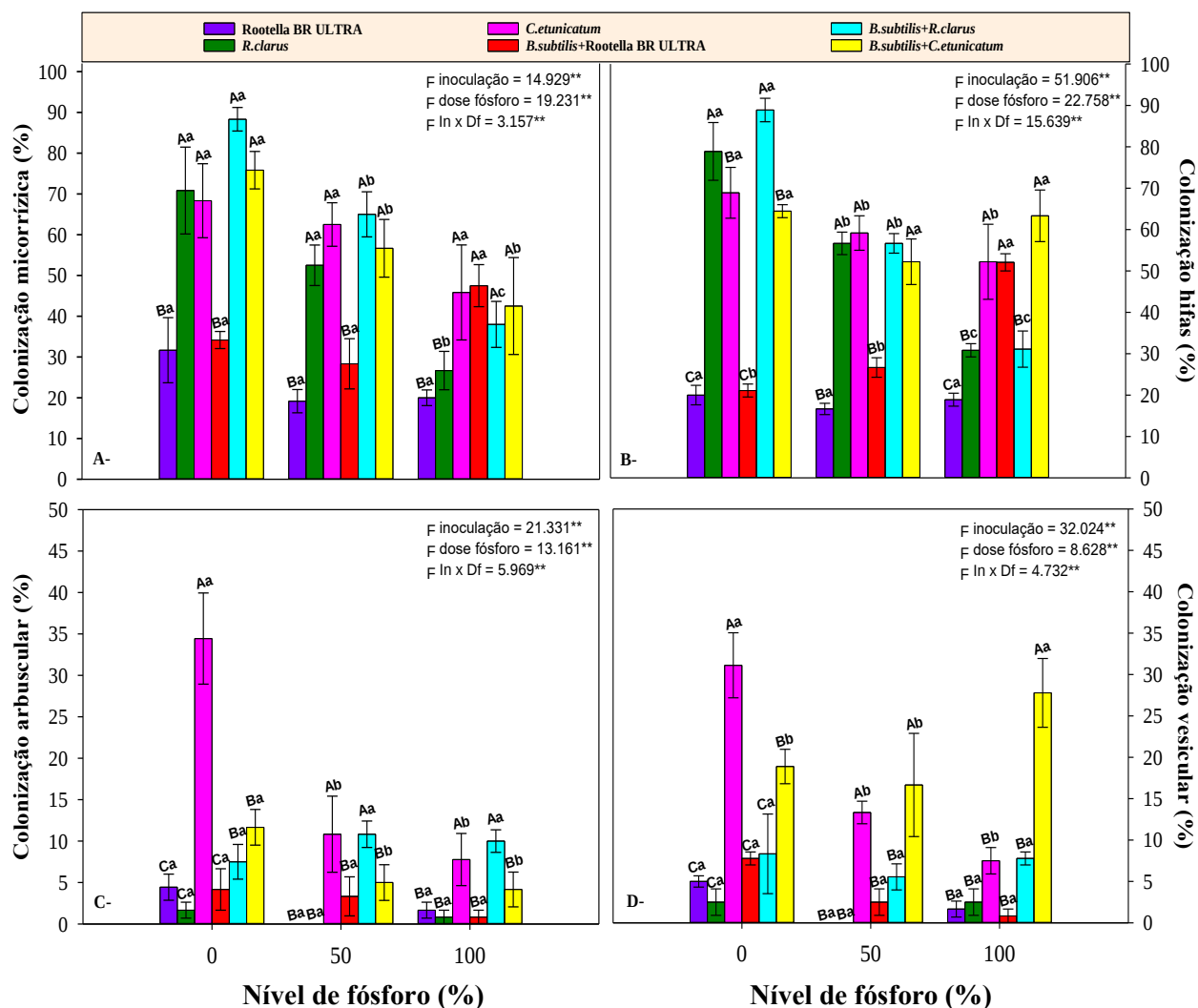


Figura 3 – Colonização micorrízica (A), colonização por hifas (B), colonização por arbúsculos (C) e colonização por vesículas (D) observadas em raízes de plantas de milho com diferentes inoculações (*Rootella* BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + *Rootella* BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum*) e níveis de fósforo (0, 50 e 100%). Letras maiúsculas comparam inoculações dentro de cada nível de fósforo, e letras minúsculas comparam níveis dentro de cada inoculação. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Valores de F da ANOVA: ** = significativo a 5%; ns = não significativo.

Nas imagens microscópicas das raízes de milho verifica-se a presença de estruturas fúngicas como arbúsculos, hifas vesículas e esporos em todos os tratamentos que continha presença de FMAs (Figura 4B, C, D, E, F, G), confirmando os resultados apresentados na Figura 3.

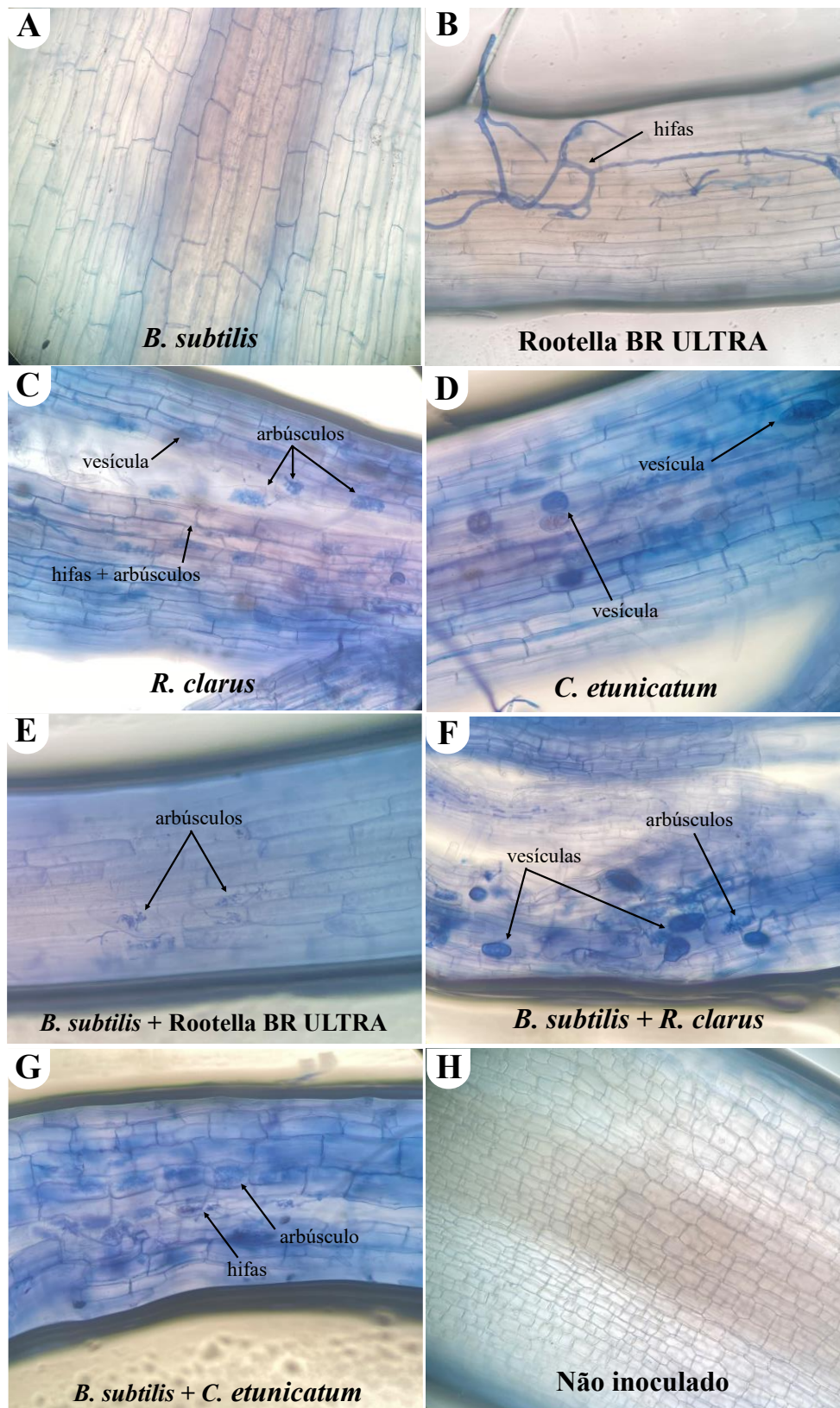


Figura 4 – Microscopia das raízes de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, Rootella BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + Rootella BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e tratamento não inoculado) submetidas ao tratamento sem aplicação de fósforo (0% de P).

4.2 Concentração da proteína do solo relacionada à glomalina facilmente extraível (PSRG-FE)

Para concentração da PSRG-FE foi observada redução ($p < 0,05$) nas médias no nível de 100% de P para maioria dos tratamentos (Figura 5). Sob 0 e 50% de P, todas as inoculações ou coinoculações aumentaram ($p < 0,05$) as médias de PSRG-FE em relação controle sem inoculação, exceto para *B. subtilis* e *B. subtilis* + Rootella BR ULTRA no nível de 50%. No nível de 100% de P, apenas *R. clarus* e *B. subtilis* + Rootella BR ULTRA apresentaram médias superiores ($p < 0,05$) ao controle sem inoculação.

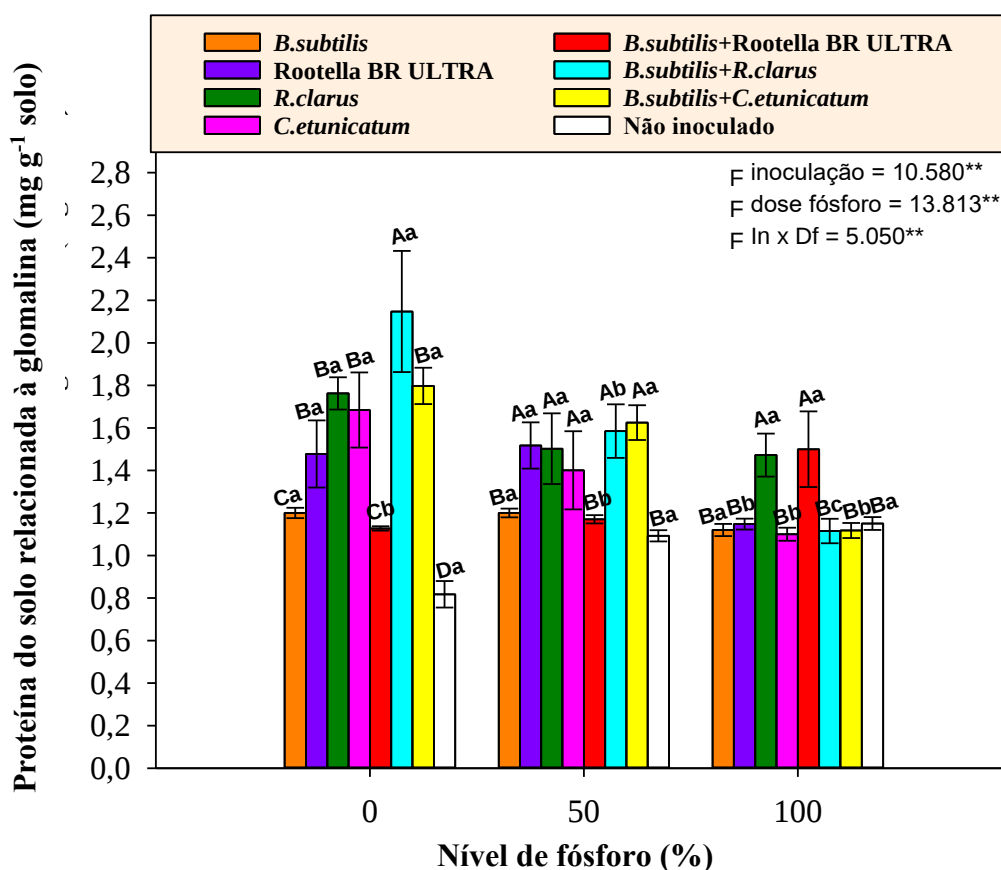


Figura 5 – Concentração da proteína do solo relacionada à glomalina facilmente extraível (PSRG-FE) de plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, Rootella BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + Rootella BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e tratamento não inoculado) e níveis de fósforo (0, 50 e 100%). Letras maiúsculas comparam inoculações dentro de cada nível de fósforo, e letras minúsculas comparam níveis dentro de cada inoculação. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Valores de F da ANOVA: ** = significativo a 5%; ns = não significativo.

4.3 Características morfológicas e produção de biomassa da raiz

De modo geral, o número médio de ramificações (NMR), área de superfície de raiz (ASR) e massa seca da raiz (MSR) das plantas de milho foram reduzidos ($p < 0,05$) nos tratamentos sem aplicação de P, quando comparadas aos níveis de 50 e 100% de P (Figura 6A, C, D, E). No entanto, para o comprimento da raiz (CR) e diâmetro médio da raiz (DMR), as médias foram semelhantes entre os tratamentos sem aplicação de fósforo e aqueles com 100% de P (Figura 6B).

Na ausência de adubação fosfatada, *R. clarus*, *C. etunicatum*, *B. subtilis* + *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum* promoveram CR, DMR e MSR superiores ($p < 0,05$) aos demais tratamentos, com exceção da *B. subtilis* + *C. etunicatum* para MSR (Figura 6A, B, E). Além disso, todos os tratamentos de inoculação, com exceção de *B. subtilis* + Rootella BR ULTRA, aumentaram ($p < 0,05$) o NMR e ASR, com destaque para *B. subtilis* + *R. clarus* (Figura 6C e D).

Quando as plantas foram tratadas com 50% de P, as maiores médias ($p < 0,05$) de CR foram obtidas com *B. subtilis*, Rootella BR ULTRA, *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum*, enquanto para o DMR, a inoculação com *B. subtilis* destacou-se das demais (Figura 6A e B). *R. clarus* e *B. subtilis* + *R. clarus* aumentaram ($p < 0,05$) o NMR (Figura 6C) e a maioria dos tratamentos de inoculação aumentaram ($p < 0,05$) a ASR (Figura 6D). Para MSR foi observada resposta semelhante ao tratamento sem aplicação de P, com exceção de *B. subtilis* + *C. etunicatum* (Figura 6E).

Para o nível de 100% de P, não foram observadas respostas positivas as inoculações para CR, DMR e ASR (Figura 6A, B, D). Contudo, a maioria dos tratamentos aumentaram ($p < 0,05$) o NMR, com destaque para *B. subtilis* e *B. subtilis* + *C. etunicatum* (Figura 6C) e todos os tratamentos destacaram-se ($p < 0,05$) do controle para MSR, com as maiores médias obtidas com Rootella BR ULTRA e *B. subtilis* + *R. clarus* (Figura 6E).

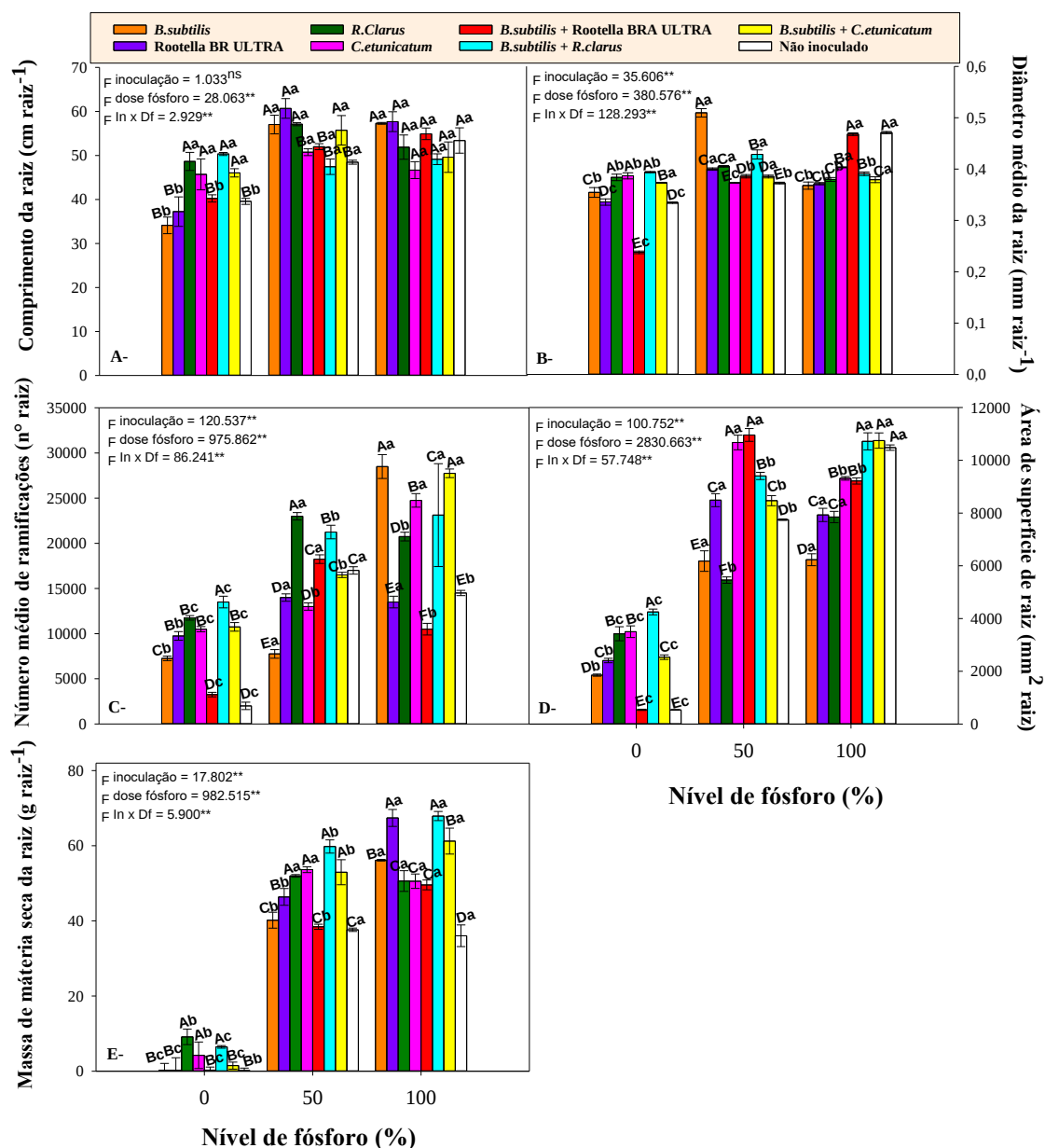


Figura 6 – Comprimento da raiz (A), diâmetro médio da raiz (B), número médio de ramificações (C), área de superfície de raiz (D) e massa de matéria seca da raiz (E) de plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, Rootella BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + Rootella BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e tratamento não inoculado) e níveis de fósforo (0, 50 e 100%). Letras maiúsculas comparam inoculações dentro de cada nível de fósforo, e letras minúsculas comparam níveis dentro de cada inoculação. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Valores de F da ANOVA: ** = significativo a 5%; ns = não significativo.

Com base na análise morfológica, observou-se drástica redução no desenvolvimento radicular das plantas que não receberam adubação fosfatada em comparação com aquelas que receberam (50 e 100% de P) (Figura 7). Esse efeito foi menos drástico nas plantas inoculadas com *R. clarus*, *C. etunicatum* e suas respectivas coinoculações com *B. subtilis*, que

apresentaram raízes mais desenvolvidas, especialmente sob condições de ausência e nível moderado de P.

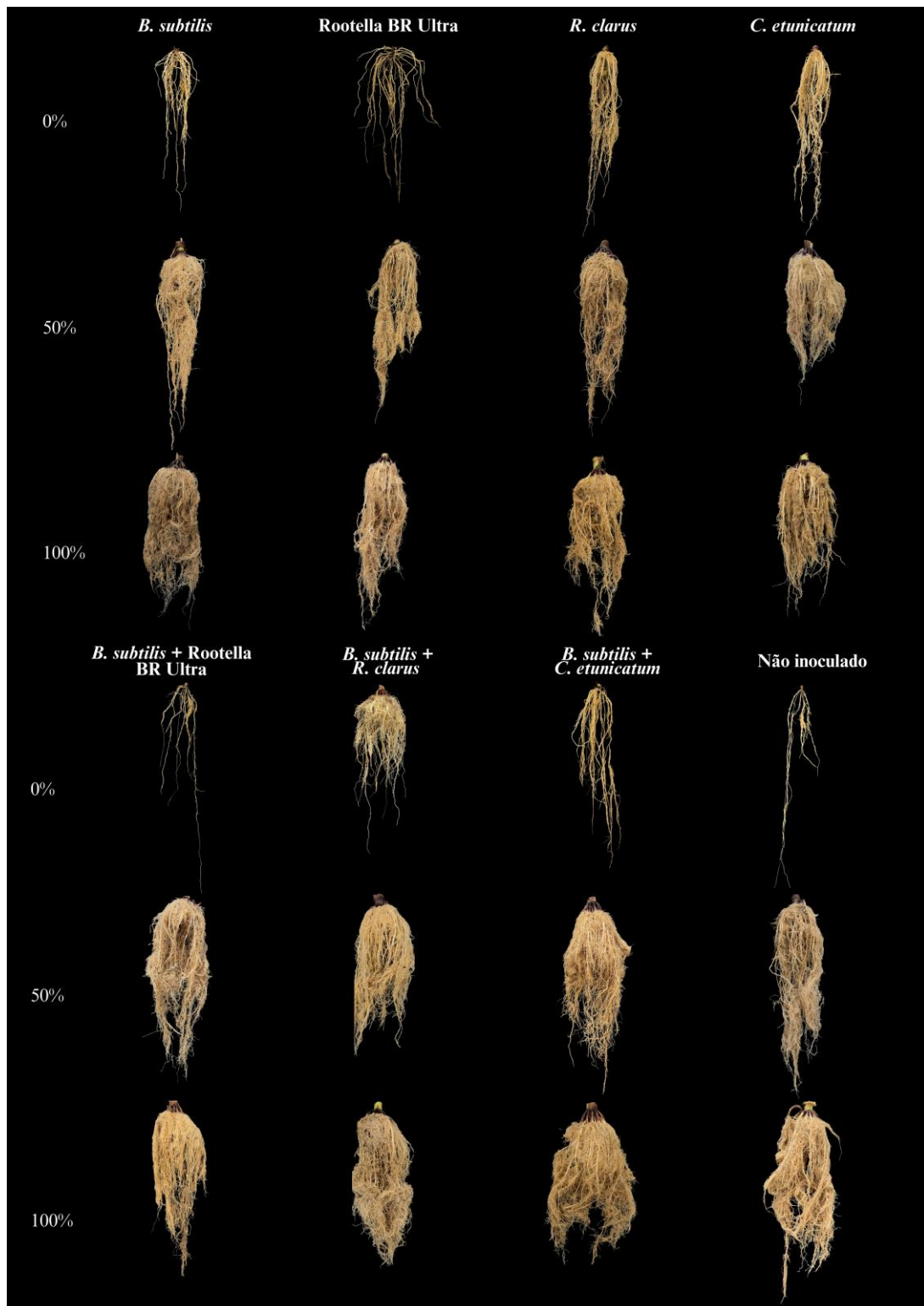


Figura 7 – Morfologia das raízes de plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, Rootella BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + Rootella BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e tratamento não inoculado) e níveis de fósforo (0, 50 e 100%).

4.4 Pigmentos fotossintéticos e temperatura foliar

Plantas inoculadas com *B. subtilis* + *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum* apresentaram maiores teores ($p < 0,05$) de clorofila *a*, *b* e total no tratamento sem aplicação de P em comparação aos demais níveis de P, enquanto o controle não inoculado apresentou teores de clorofila *a* e total semelhante entre os níveis de P (Figura 8A, B, C). Para os teores de carotenoides, a maioria dos tratamentos promoveram médias superiores ($p < 0,05$) no nível de 100% de P, exceto as inoculações com Rootella BR ULTRA e *C. etunicatum* (Figura 8D).

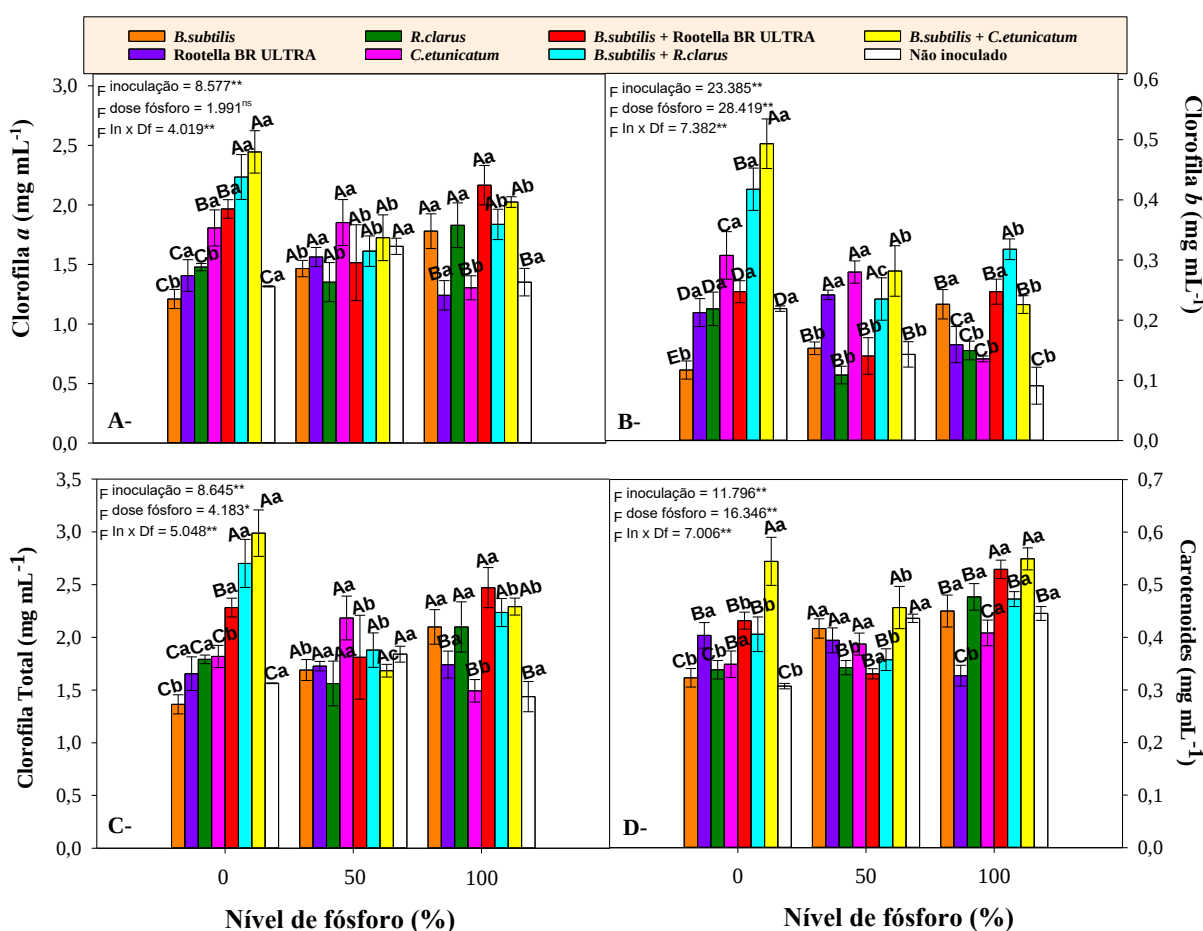


Figura 8 – Clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenoides (D) de plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, Rootella BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + Rootella BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e tratamento não inoculado) e níveis de fósforo (0, 50 e 100%). Letras maiúsculas comparam inoculações dentro de cada nível de fósforo, e letras minúsculas comparam níveis dentro de cada inoculação. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Valores de F da ANOVA: ** = significativo a 5%; ns = não significativo.

Na ausência da adubação de P, plantas *B. subtilis* + *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum* aumentaram ($p < 0,05$) os teores de clorofila a, b e total (Figura 8A, B, C). Com exceção de *B. subtilis* e *R. clarus*, todos os tratamentos de inoculação aumentaram ($p < 0,05$) os teores de carotenoides, destacando-se *B. subtilis* + *C. etunicatum* (Figura 8D). No nível de 50%, não houve respostas positivas as inoculações em relação aos teores de clorofila a e total e carotenoides (Figura 8A, C, D), mas as inoculações de Rootella BR ULTRA, *C. etunicatum*, *B. subtilis* + *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum* aumentaram ($p < 0,05$) os teores de clorofila b (Figura 7B). Para o nível de 100% de P, a maioria dos tratamentos aumentou ($p < 0,05$) os teores de clorofila a, b e total (Figura 8A, B, C) e apenas *B. subtilis* + *C. etunicatum* e *B. subtilis* + Rootella BR ULTRA aumentaram ($p < 0,05$) os teores de carotenoides (Figura 8D).

Para a temperatura foliar, *B. subtilis*, Rootella BR ULTRA, *B. subtilis* + Rootella BR ULTRA e controle sem inoculação promoveram médias mais elevadas ($p < 0,05$) na ausência de adubação de P em comparação com os demais níveis (Figura 9). Na ausência de P, as inoculações com *R. clarus*, *B. subtilis* + *R. clarus*, *C. etunicatum* e *B. subtilis* + *C. etunicatum*, resultaram em médias mais baixas ($p < 0,05$). Nos níveis de 50 e 100% de P, não foram observadas diferenças significativas entre as inoculações e o tratamento controle

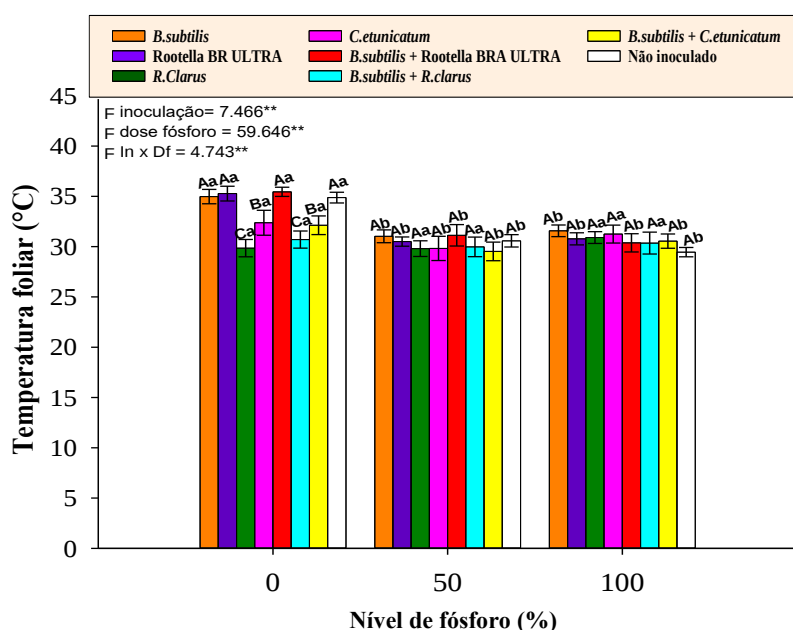


Figura 9 – Temperatura foliar de plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, Rootella BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + Rootella BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e tratamento não inoculado) e níveis de fósforo (0, 50 e 100%). Letras maiúsculas comparam inoculações dentro de cada nível de fósforo, e letras minúsculas comparam níveis dentro de cada inoculação. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Valores de F da ANOVA: ** = significativo a 5%; ns = não significativo.

4.5 Acúmulo de P e outros nutrientes e eficiência de utilização do P pelas plantas

Para o acúmulo de P na parte aérea e total e eficiência de utilização do P, o nível de 100%, independentemente da inoculação, apresentou maiores médias ($p < 0,05$), seguidas do nível de 50% de P (Figura 10A, C, D), exceto para *B. subtilis* + *R. clarus* (Figura 10A, D). Para o acúmulo de P nas raízes, metade dos tratamentos apresentaram médias semelhantes entre os níveis de 50 e 100% (Figura 10B).

Na ausência da adubação de P, *R. clarus*, *C. etunicatum*, *B. subtilis* + *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum* aumentaram ($p < 0,05$) o acúmulo de P na parte aérea e total e *R. clarus* foi o único tratamento que aumentou ($p < 0,05$) o acúmulo de P na raiz (Figura 10A, B, C). No nível de 50%, *B. subtilis*, *R. clarus*, *B. subtilis* + *R. clarus* destacou-se ($p < 0,05$) dos demais no acúmulo de P na parte aérea e eficiência de uso do P (Figura 10A, D). Para o acúmulo de P nas raízes, nesse mesmo nível, houve destaque para *R. clarus* e *C. etunicatum* e suas coinoculações com *B. subtilis* (Figura 10B).

Para o nível de 100% de P, houve resposta positiva para acúmulo de P na parte aérea apenas para *C. etunicatum* (Figura 10A), enquanto todas as inoculações aumentaram ($p < 0,05$) o acúmulo de P nas raízes e total, a exceção de *R. clarus* e *B. subtilis* (Figura 10B, C). Já para a eficiência de utilização de P, apenas os três FMAs aplicados individualmente aumentaram ($p < 0,05$) essa eficiência, com destaque para *C. etunicatum* (Figura 10D).

Quanto aos demais nutrientes avaliados, os maiores ($p < 0,05$) acúmulos de K, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn foram observadas nos níveis de 100 e 50% de P, tanto na parte aérea quanto na raiz, havendo variações em função da inoculação aplicada em ambos os níveis (Figuras S1 e S2). Dentro de cada nível de P, houve respostas diferenciadas aos tratamentos de inoculação. Na ausência de adubação fosfatada, *R. clarus*, *C. etunicatum*, *B. subtilis* + *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum* contribuíram para o aumento do acúmulo de K e Mg na parte aérea (Figura S1 A e E). Esses mesmos tratamentos, exceto *B. subtilis* + *R. clarus*, também aumentaram ($p < 0,05$) os acúmulos de Fe e Zn na parte aérea em relação aos demais tratamentos (Figura S2 A e C).

No nível de 50% de P, *B. subtilis* + *R. clarus* aumentou ($p < 0,05$) o acúmulo de K e Mg na parte aérea, e o acúmulo de K, Ca, Mg (Figura S1 A, B, C, E e F), Fe e Mn (Figura S1 B e F) nas raízes. Outro tratamento com destaque foi *C. etunicatum*, o qual aumentou o acúmulo de K, Ca e Mg, Fe e Mn nas raízes, além do acúmulo de Zn na parte aérea (Figura S2 C). Para o nível de 100% de P, houve muita variação de respostas, mas todos os tratamentos de inoculação contribuíram para o aumento do acúmulo de Zn e Mn na parte aérea, com destaque para *B.*

subtilis + Rootella BR ULTRA e *B. subtilis*, respectivamente (Figura S2 C e E). Ainda nesse nível, todas as inoculações, exceto *B. subtilis* + Rootella BR ULTRA (Figura S2 B), aumentaram também o acúmulo de K e Fe nas raízes, com destaque para *B. subtilis* + *R. clarus*.

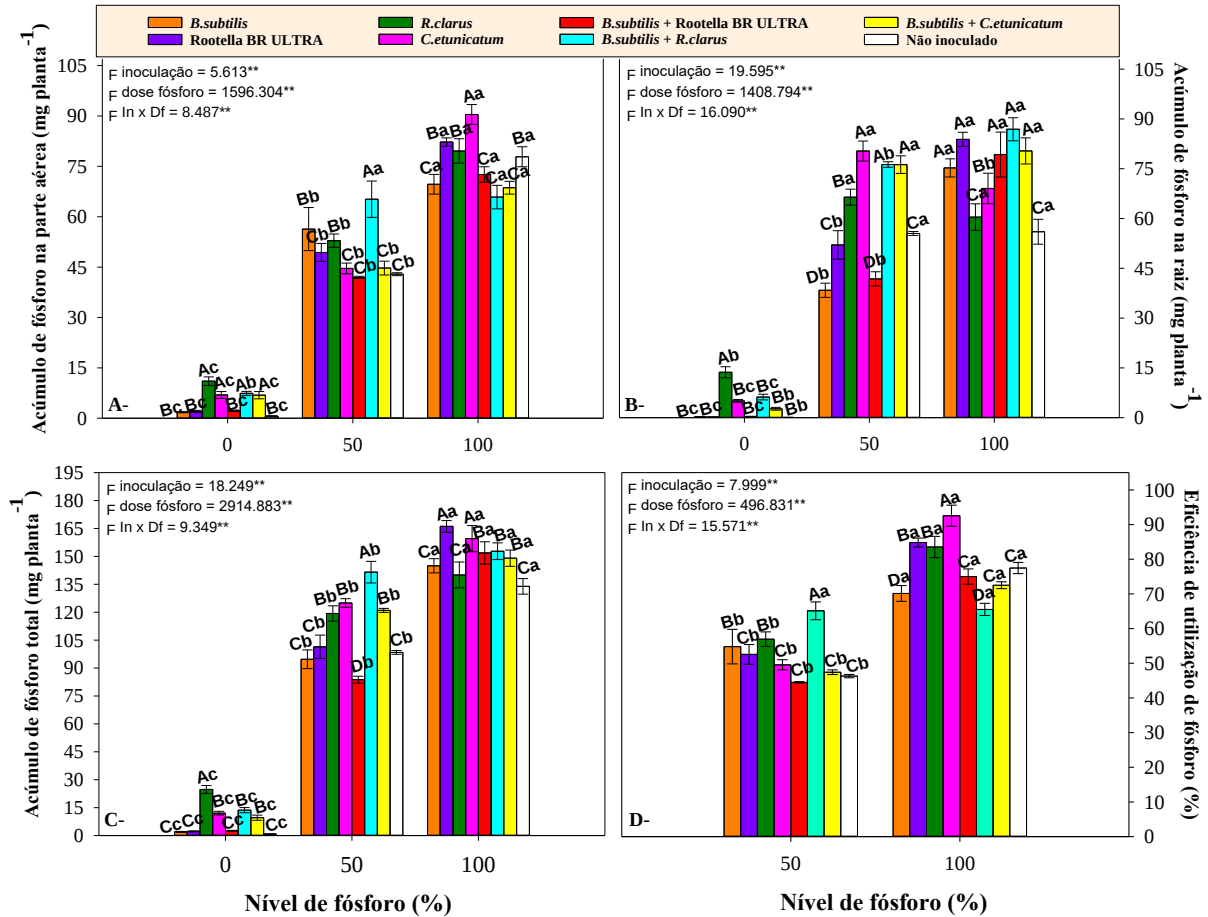


Figura 10 – Acúmulo de fósforo na parte aérea (A), na raiz (B), e total (C) e eficiência de utilização de fósforo (D) de plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, *Rootella BR ULTRA*, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + *Rootella BR ULTRA*, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e tratamento não inoculado) e níveis de fósforo (0, 50 e 100%). Letras maiúsculas comparam inoculações dentro de cada nível de fósforo, e letras minúsculas comparam níveis dentro de cada inoculação. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Valores de F da ANOVA: ** = significativo a 5%; ns = não significativo.

4.6 Parâmetros morfológicos e produção de biomassa da parte aérea

Houve uma drástica redução ($p<0,05$) no comprimento de planta (CP), número de folhas (NF), diâmetro basal do colmo (DBC) e massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas no tratamento sem aplicação de P (0% de P) em comparação aos níveis de 50 e 100% de P (Figura 11), conforme constatado também na Figura 12. Além disso, a deficiência de P nas folhas de milho foi identificada pela coloração roxa observada nos tratamentos que não receberam adubação fosfatada e naqueles que receberam metade da dose recomendada (50% de P). (Figura 13).

Dentro do tratamento sem aplicação de P, *R. clarus* e *B. subtilis* + *R. clarus*, *C. etunicatum* e *B. subtilis* + *C. etunicatum* aumentaram o CP, NF, DBC e MSPA em relação aos demais tratamentos (Figura 11A, B, C, D). No nível de 50% de P, todas as inoculações individuais e coinoculações aumentaram ($p<0,05$) o CP, NF, DBC, com exceção de *C. etunicatum* para CP (Figura 11A, B, C). Contudo, para MSPA, apenas quatro tratamentos (*B. subtilis*, *R. clarus*, *B. subtilis* + *R. clarus* e Rootella BR ULTRA) foram superiores ($p<0,05$) ao controle sem inoculação, destacando-se dos demais *B. subtilis* + *R. clarus* (Figura 11D). Para o nível de 100% de P, nota-se que não houve nenhuma resposta positiva as inoculações para variáveis morfológicas, enquanto para MSPA, todas as inoculações individuais de FMAs e BPCP promoveram aumentos ($p<0,05$) das médias.

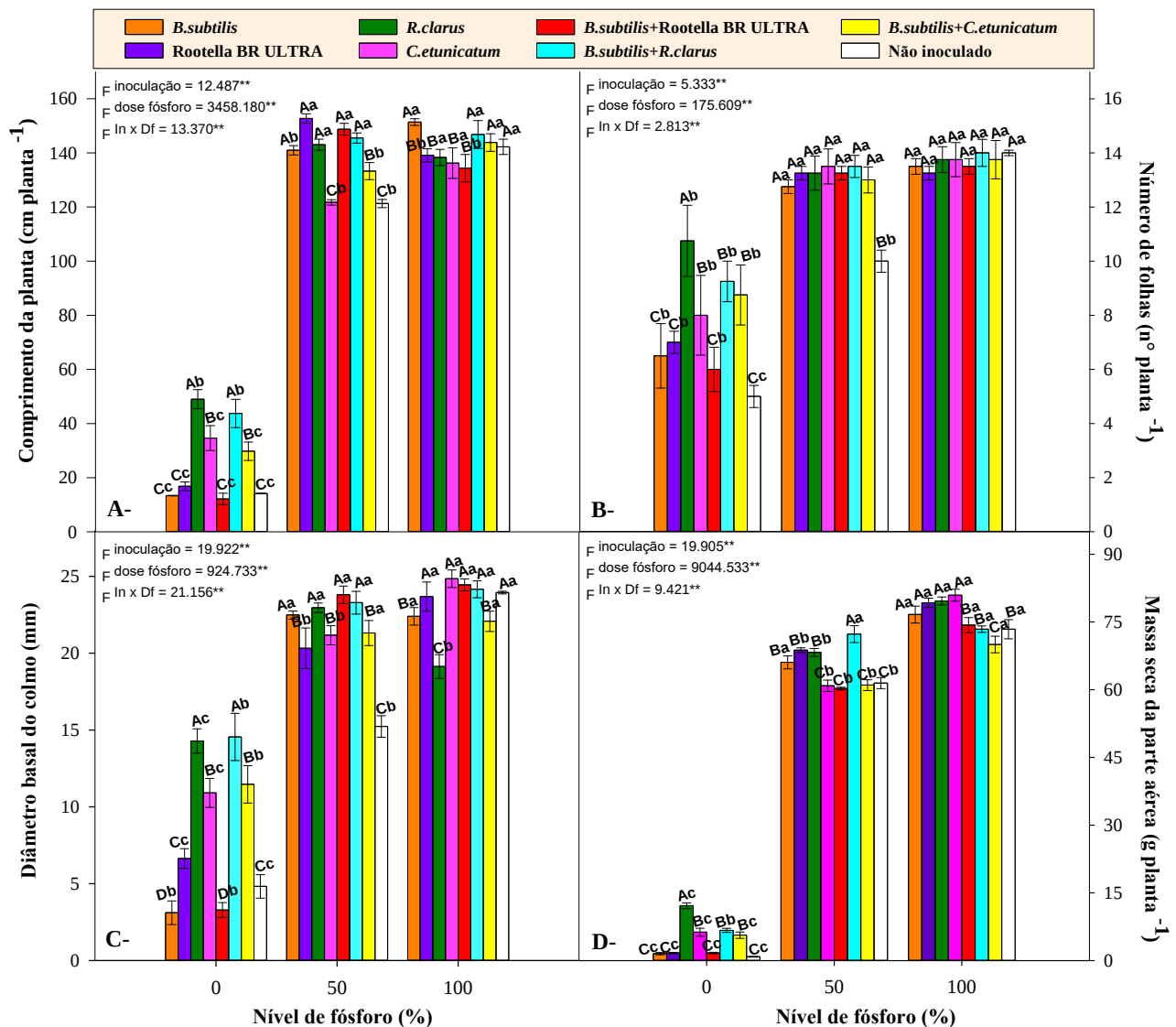


Figura 11 – Comprimento da planta (A), número de folhas (B), diâmetro basal do colmo (C) e massa de matéria seca parte aérea (D) de plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, *Rootella* BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + *Rootella* BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e tratamento não inoculado) e níveis de fósforo (0, 50 e 100%). Letras maiúsculas comparam inoculações dentro de cada nível de fósforo, e letras minúsculas comparam níveis dentro de cada inoculação. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Valores de F da ANOVA: ** = significativo a 5%; ns = não significativo.

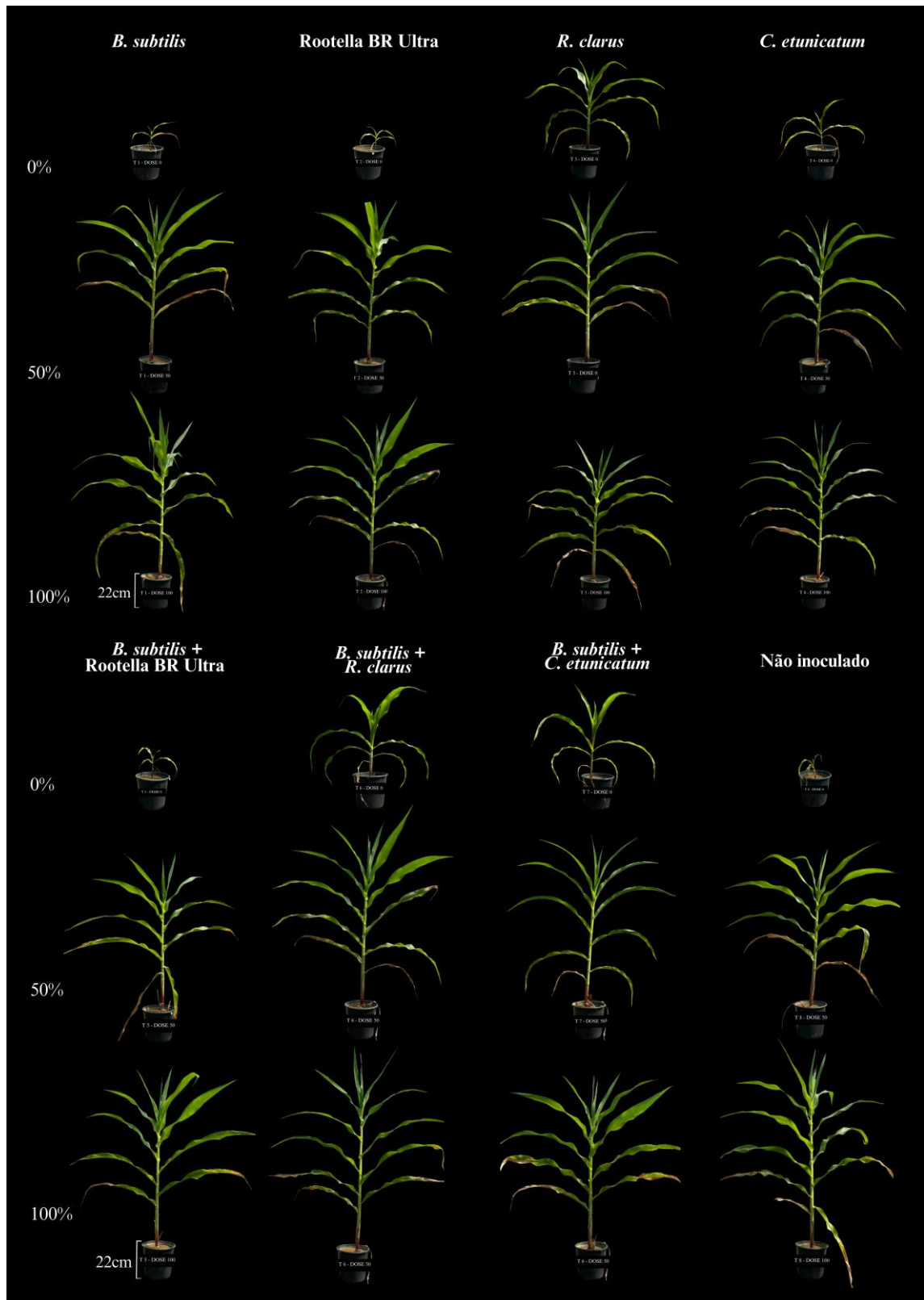


Figura 12 – Plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, Rootella BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + Rootella BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e tratamento não inoculado) e níveis de fósforo (0, 50 e 100%).

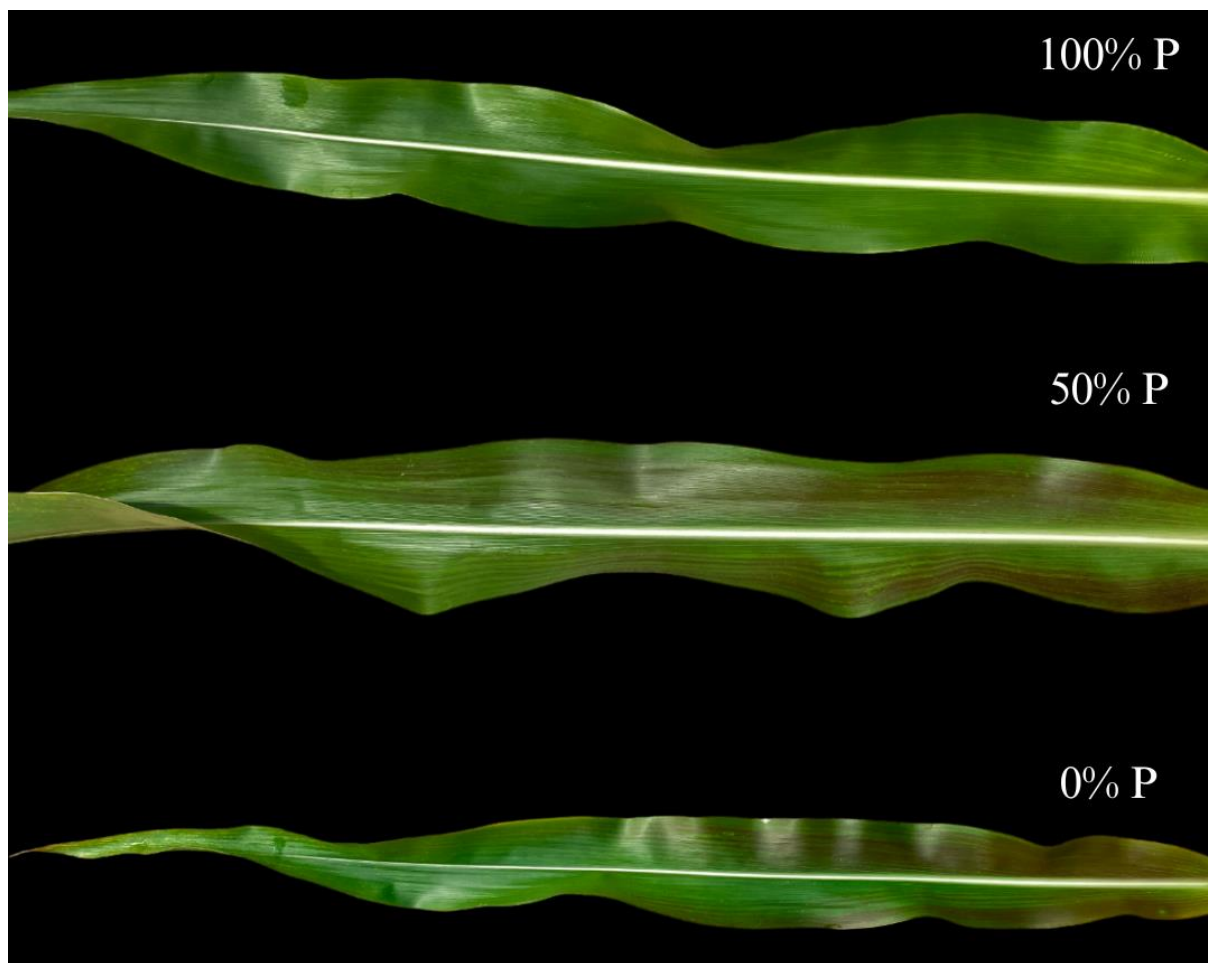


Figura 13 – Folhas representativas de cada nível de P avaliado, evidenciado a deficiência de P apresentado nos tratamentos com 0 e 50% da adubação fosfatada.

4.7 Índice de resposta à inoculação (IR)

Para o índice de resposta à inoculação (IR), tanto em termos de massa seca da parte aérea quanto de acúmulo total de P em condições de P moderado (50% de P) e completo (100% de P), as inoculações apresentaram resultados semelhantes em ambas as variáveis analisadas (Figura 14A, B). No entanto, quando submetida à deficiência de P (0% de P), torna-se evidente a eficácia dos microrganismos, especialmente as inoculações de *R. clarus* e *C. etunicatum*, e suas combinações com *B. subtilis*, com destaque para inoculação com *R. clarus*.

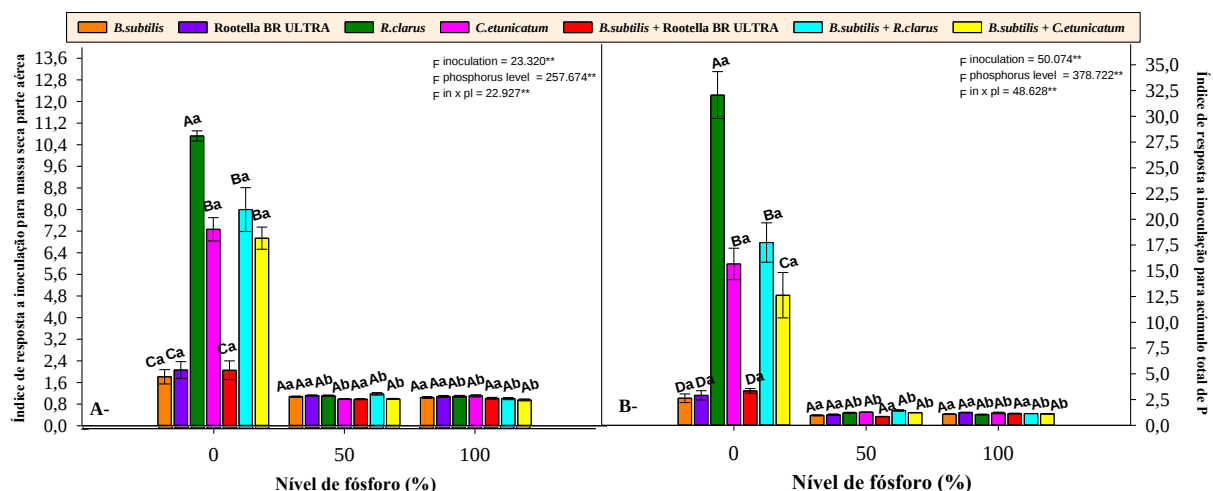


Figura 14 – Índice de resposta a inoculação (IR) para massa seca parte aérea (A) e no acúmulo total de fósforo (B) de plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, *Rootella* BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + *Rootella* BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e níveis de fósforo (0, 50 e 100%). Letras maiúsculas comparam inoculações dentro de cada nível de fósforo, e letras minúsculas comparam níveis dentro de cada inoculação. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Valores de F da ANOVA: ** = significativo a 5%; ns = não significativo.

4.8 Dendrograma dos grupos e PCA

O primeiro e segundo componentes principais identificaram uma proporção substancial da variabilidade dos dados de 57,06 e 21,19%, respectivamente, explicando 78,25% da variância total dos dados (Figura 15A). De maneira geral, a PCA revela a influência dos níveis de fósforo e diferentes inoculações, indicando que a separação clara entre os grupos demonstra que tanto a concentração de P quanto o tipo de inoculação apresentam efeito significativo nas variáveis analisadas.

Foi observada a formação de quatro grupos distintos em função dos parâmetros avaliados nos diferentes tratamentos (Figura 15B). Os grupos 1 e 2 foram formados por tratamentos que não receberam adubação de P. O grupo 1, composto pelas inoculações *R. clarus* e *C. etunicatum*, além de suas combinações *B. subtilis*, esses tratamentos tiveram associação com pigmentos fotossintéticos e PSRG-FE (Figura 15A, B). Já o grupo 2, formado pelas inoculações com *B. subtilis*, *Rootella* BR ULTRA, *B. subtilis* + *Rootella* BR ULTRA e o controle sem inoculação, teve maior relação com a temperatura foliar.

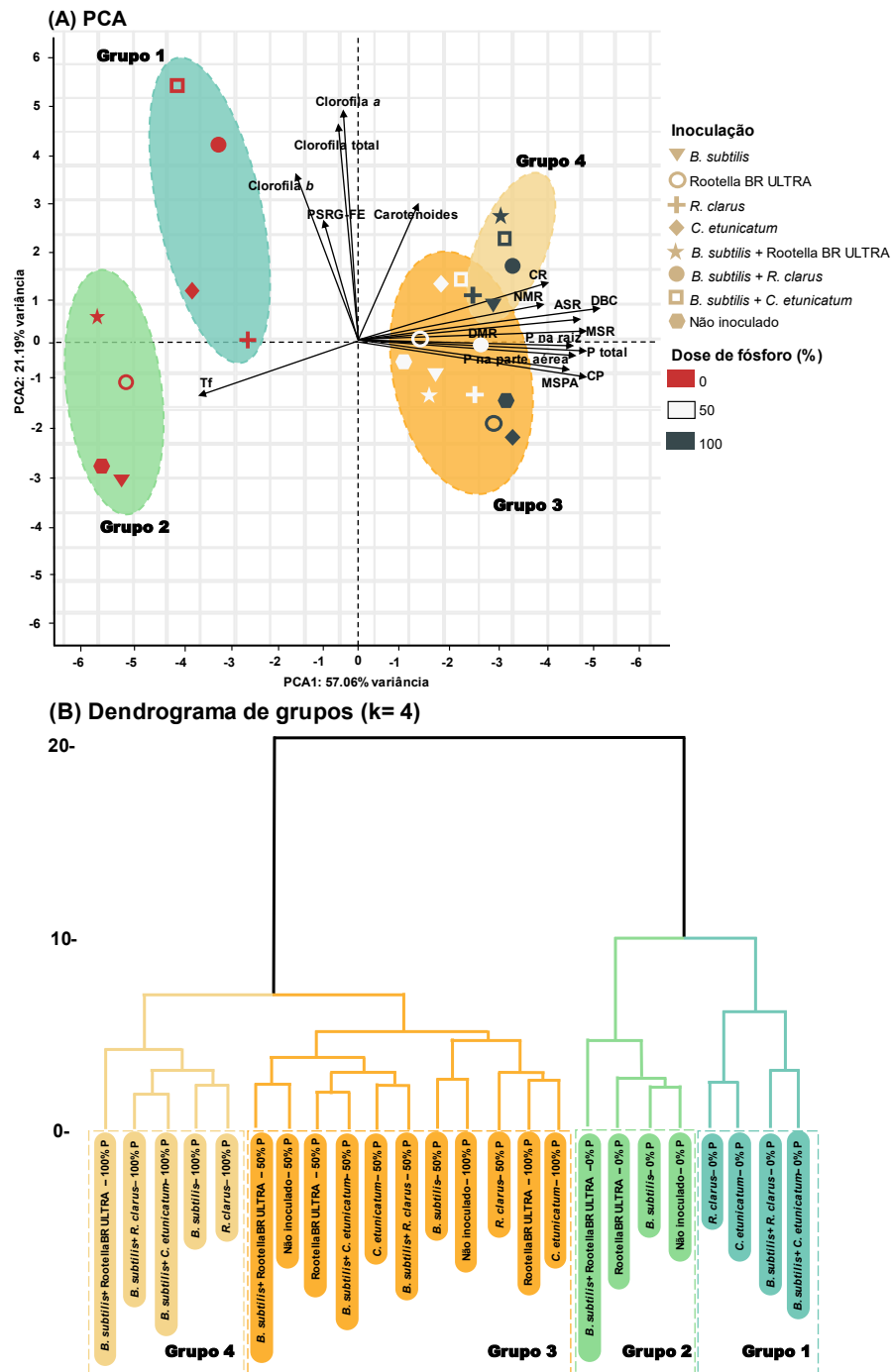


Figura 15 – Análise de componentes principais (A) e dendrograma de grupos (B) para variáveis fósforo total (P total), fósforo na parte aérea (P na parte aérea), fósforo na raiz (P na raiz), massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento de planta (CP), comprimento da raiz (CR), massa seca da raiz (MSR), diâmetro médio da raiz (DMR), número médio de ramificações (NMR), área de superfície específica da raiz (ASR), diâmetro basal do colmo (DBC), clorofila a, clorofila b, clorofila total, carotenoides, temperatura foliar (Tf) e proteína do solo relacionada à glomalina facilmente extraível (PSRG-FE) de plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, Rootella BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + Rootella BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e níveis de fósforo (0, 50 e 100%).

O grupo 3 foi formado por todos os tratamentos do nível de 50% de P e mais três tratamentos do nível de 100% (*C. etunicatum*, Rootella BR ULTRA e o tratamento não inoculado) (Figura 15A, B). Esse grupo se associou com variáveis relacionadas ao crescimento, produção de biomassa e acumulação de P nas plantas. O grupo 4, formado apenas por tratamentos 100% de P, associou-se, principalmente com o comprimento da raiz e número médio de ramificações de raízes. Em especial, *B. subtilis* + *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum* apresentam efeitos positivos para maioria dos parâmetros avaliados quando submetidas a condições de nível moderado de P (50%) ou completo (100%).

5 DISCUSSÃO

A disponibilidade de P exerce influência significativa no crescimento das plantas, pois esse nutriente é requerido em processos fundamentais como a divisão celular, absorção de nutrientes, além de atuar como catalisador em reações biológicas, a exemplo da fotossíntese (Sun *et al.*, 2023). No presente estudo, a ausência de adubação fosfatada no cultivo do milho (nível 0%) resultou em impactos adversos nos parâmetros morfológicos tanto da parte aérea quanto radicular, além de reduzir o acúmulo dos nutrientes avaliados (Figuras 6, 7, 10, 11 e 12; Figuras S1 e S2).

No entanto, quando cultivado com metade do nível recomendado (nível 50%), e submetido à inoculação com FMAs ou combinada com *B. subtilis*, a maioria dos parâmetros supracitados apresentaram médias quase equivalentes aos das plantas que receberam adubação completa (nível 100%). Em uma abordagem similar, Stoffel *et al.* (2020) ao investigarem o potencial do inoculante micorrízico à base de *Rhizophagus intraradices* em diferentes condições edafoclimáticas no Brasil, identificaram aumento da produção de biomassa e absorção de P pelo milho, especialmente em solos que originalmente apresentavam níveis baixos ou médios de P disponível.

Song *et al.* (2021) também demonstraram benefícios semelhantes ao avaliarem a eficiência de plantas de milho consorciado com leguminosa e monocultivo em vasos inoculado com *Rhizophagus irregularis* ou em combinação com duas estirpes de BPCP cultivado sob três doses de P (20, 50 e 100% da dose recomendada). Esses autores observaram que plantas inoculadas sob sistema de consórcio apresentaram superioridade aos demais tratamentos, havendo melhor crescimento das plantas e maior absorção de P no solo nos tratamentos de coinoculação com aplicação de 50% da dose recomendada. Além disso, Fall *et al.* (2023) demonstram que a inoculação com FMAs combinada com 50% de NPK da dose recomendada, aumenta significativamente o crescimento das plantas, a colonização das raízes, o conteúdo de clorofila nas folhas e os teores de N, P e K nos tecidos de milho cultivado em condições de estufa.

Segundo Grzebisz *et al.* (2024), o estresse causado pela deficiência de P nas plantas pode ser mitigado através da infecção progressiva e simbiótica com FMAs. Nesse contexto, ao analisar isoladamente os tratamentos de inoculação submetidos a ausência de adubação de P para maioria dos parâmetros avaliados (Tabelas S1 e S2), os resultados corroboram com a nossa hipótese, uma vez que plantas inoculadas com FMAs apresentaram desempenho superior ao

tratamento controle não inoculado, este efeito foi especialmente notável nas inoculações com *R. clarus*, *C. etunicatum*, *B. subtilis* + *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum*.

A maior taxa de colonização observada nos tratamentos que não receberam adubação fosfatada, ou que receberam metade do nível recomendado (Figura 3), evidência não apenas a eficiência isolada dos FMAs, mas também a eficácia da coinoculação com *B. subtilis*, refletindo na melhoria da arquitetura radicular das plantas de milho (Figuras 6 e 7), confirmando a hipótese proposta neste estudo. Ambos os parâmetros podem estar interligados, especialmente nos tratamentos submetidos a inoculações com *R. clarus*, *C. etunicatum*, *B. subtilis* + *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum* na ausência de adubação.

A adubação fosfatada completa (nível 100%) reduziu a taxa de colonização micorrízica, o que pode ter resultado na redução da influência dos FMAs no desenvolvimento radicular nesse nível de P em comparação ao demais níveis (Figuras 3, 6 e 7). O mesmo padrão foi observado por Song *et al.* (2021), ao avaliarem a eficiência de FMAs e bactérias no milho, constatando uma redução na colonização sob condições de adubação completa. Esses resultados contrariam a hipótese de Gosling *et al.* (2013), que sugeriram que a concentração adequada de P no solo não teria impacto negativo na eficiência de FMAs.

Foi observada redução na concentração de glomalina à medida que aumentava o nível de P no solo (Figura 5). A glomalina pode ser encontrada na parede celular das hifas e esporos e sua presença no solo indica a decomposição dessas estruturas (Wright; Upadhyaya, 1998; Rillig *et al.*, 2003; Driver; Holben; Rillig, 2005). Neste estudo, a fração de glomalina quantificada refere-se a glomalina facilmente extraível no solo (GFE), que está relacionada a atividades recentes dos FMAs. Os resultados mostraram que PSRG-FE apresenta relação com a taxa de colonização micorrízica, sendo ambas mais expressivas nos menores níveis de P (0 e 50%) (Figuras 3 e 5). A presença de PSRG-FE no tratamento controle não inoculado pode ser resultado de glomalina remanescente do solo de origem, conforme destaca Rillig *et al.* (2003) ao relatarem que a glomalina é mais persistente em áreas de vegetação nativa, em comparação com áreas agrícolas e reflorestadas. Essa maior persistência pode ser atribuída a condições de solo mais estáveis, que favorecem a preservação da glomalina ao longo do tempo.

Conforme esperado, de modo geral, plantas que receberam 100% da concentração recomendada culminaram no maior acúmulo de P e outros nutrientes na parte aérea e raiz (Figuras 10, S1 e S2). No entanto, como o principal fator limitante neste estudo foi o P, o acúmulo superior de nutrientes das plantas submetidas aos níveis de 0 e 50% de P, em comparação ao tratamento controle não inoculado, indica que as inoculações utilizadas melhoraram o estado nutricional das plantas. Vale ressaltar que mesmo no nível de 100% de P,

houve contribuição das inoculações no aumento da absorção e acumulação de todos os nutrientes avaliados nas raízes, e de alguns na parte aérea, com respostas variadas, dependendo do tratamento e do nutriente (Figuras 10, S1 e S2). Esses resultados estão em conformidade a hipótese deste trabalho, e de acordo com Chiu e Paszkowski (2019), que relatam que uma unidade de raiz colonizada por FMA consegue absorver maior quantidade de P e outros nutrientes do que uma unidade de raiz não colonizada.

Os efeitos positivos proporcionados pela estirpe IPACC26 (*B. subtilis*), isoladamente ou co-inoculados com FMAs, podem estar relacionados a produção de AIA por essa bactéria (Aquino *et al.*, 2021), que resultou na alteração da arquitetura radicular, aumento crescimento e biomassa de plantas refletindo na maior absorção e acúmulo dos nutrientes e eficiência de uso do P (Figuras 7, 10 e 11). A variabilidade de respostas observadas entre os tratamentos no acúmulo dos nutrientes bem como em outras variáveis pode ter sido influenciada por uma interação complexa de fatores, incluindo o sinergismo microbiano com os diferentes FMAs, fenologia da planta hospedeira, exsudação radicular e disponibilidade de P no solo (Silva *et al.*, 2023).

Para o Zn, normalmente é esperada uma interação antagônica com o P, devido aos efeitos de diluição ou precipitação desse nutriente na planta. A precipitação de P e Zn pode ocorrer nos vasos condutores, reduzindo o transporte de Zn para parte aérea (Prado, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Neste estudo foi confirmada essa interação negativa na acumulação desses nutrientes para maioria dos tratamentos nos níveis de 50 e 100% de P, onde aplicação de P diminuiu a concentração de Zn na raiz devido ao aumento da massa seca da raiz e pela alteração das propriedades da raiz e da rizosfera, incluindo a colonização da raiz por FMAs.

Plantas submetidas a ambientes estressantes podem reduzir a produção de pigmentos fotossintéticos (Ashraf; Harris, 2013), contrariando os resultados obtidos neste estudo, no qual plantas inoculadas com FMAs submetidas ao estresse nutricional de P (nível 0%) produziram teores de clorofila *a*, *b* e total e carotenoides superior ao tratamento controle não inoculado (Figuras 8). Esses resultados indicam que a inoculação pode compensar a ausência de P, permitindo que plantas mantenham atividade fotossintética mesmo sob condições de estresse nutricional. Nos níveis de 50 e 100% de P, foi observado o mesmo padrão, reforçando a correlação entre FMAs e atividade fotossintética da planta. Zhu *et al.* (2014) reforçam que o aumento dos conteúdos de clorofila em plantas micorizadas podem estar associados a maior absorção de P e Mg, estando em consonância com resultados descritos na maioria dos tratamentos de inoculação para acúmulo desses nutrientes, conforme observado neste trabalho.

Dentre os pigmentos, os carotenoides atuam como moléculas antioxidantes, protegendo as células ao neutralizar radicais livres, impedindo o processo de peroxidação lipídica (Sandmann, 2022). De modo geral, os maiores teores de carotenoides foram observados em plantas que não receberam adubação de P e foram inoculadas com FMAs, especialmente com *B. subtilis* + *C. etunicatum*. Baslam e Goicoechea (2012) destacam que plantas inoculadas com FMAs possuem sistemas de defesa antioxidante mais eficiente em comparação com plantas não inoculadas sob condições de estresse, o que resulta em um aumento na concentração de carotenoides nas plantas.

A temperatura foliar também demonstrou ser um importante indicador de estresse nessa pesquisa, onde ficou evidente o papel mitigador dos FMAs (*R. clarus* e *C. etunicatum*) na redução da temperatura foliar das plantas (Figura 9). Os resultados estão de acordo com os estudos realizados por Mathur, Sharma e Jajoo (2018) e Mathur e Jajoo (2020), que verificaram que FMAs reduzem a temperatura foliar e protegem plantas de milho por meio da regulação da heterogeneidade do fotossistema II.

De modo geral, as inoculações com *R. clarus*, *C. etunicatum*, *B. subtilis* + *R. clarus* e *B. subtilis* + *C. etunicatum* influenciaram positivamente vários parâmetros (Figura 14), mostrando-se eficientes para melhorar o crescimento e nutrição de plantas de milho em solos com diferentes níveis de P. O potencial dessas espécies de FMAs também foi demonstrado por Santana *et al.* (2023) em plantas de milho submetidas a períodos de restrição hídrica, onde os FMAs ajudaram a manter o funcionamento do aparato fotossintético das plantas.

Esta pesquisa é pioneira ao utilizar especificamente esses FMAs, isolados ou coinoculados com *B. subtilis*, em combinação com três níveis de fósforo no cultivo do milho, para avaliar o potencial de redução do uso de fertilizantes fosfatados. Diante dos resultados promissores, mais estudos são necessários para validar a eficiência desses microrganismos, bem como sua capacidade de atenuar diferentes condições de estresse no milho, visando o manejo sustentável dessa cultura.

6 CONCLUSÃO

A presente pesquisa demonstra que a colonização micorrízica isolada ou coinoculada com *Bacillus subtilis* aumenta o teor de glomalina no solo, melhora a arquitetura radicular e o crescimento, e beneficia a nutrição de milho, especialmente na absorção de fósforo, em condições de estufa. Entre as inoculações testadas, *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglomus etunicatum*, isolados ou coinoculados com *Bacillus subtilis*, demonstram potencial para uso como biofertilizantes no milho em solos com diferentes níveis de fósforo, especialmente sob nível moderado de fósforo (50% de P).

Futuros estudos devem investigar a validação da eficiência dessas inoculações em condições de campo para confirmar os resultados observados em estufa, uma vez que, a aplicação prática dessas inoculações pode contribuir para redução do uso de fertilizantes fosfatados, promovendo uma agricultura mais sustentável e economicamente viável.

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, R.; BHARTI, A.; RAMESH, A.; PRAKASH, A.; SHARMA, M. Glomalin related protein and C16:1 ω 5 PLFA associated with AM fungi as potential signatures for assessing the soil C sequestration under contrasting soil management practices. **European Journal of Soil Biology**, v. 103, n. 103286, 2021.
- AJIJAH, N.; FIODOR, A.; PANDEY, A. K.; RANA, A.; PRANAW, K. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with biofilm-forming ability: a multifaceted agent for sustainable agriculture. **Diversity**, v. 15, n. 112, 2023.
- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, H.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, v. 435, p. 824–827, 2005.
- ALEXANDRE, F.; FLORA, L.; HENRIQUE, I.; SILVA, D.; MERCEDES, A.; SILVA, A.; OLIVEIRA, A.; SILVA, M.; RONNING, B.; DREHER, D.; CANO, B.; ANDREATA, M.; FILHO, J.; SANTOS, E.; TAKISAWA, F.; ALFENAS, R.; ANDRADE, G.; CELY, M. Arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus clarus*) and rhizobacteria (*Bacillus subtilis*) can improve the clonal propagation and development of teak for commercial plantings. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 628769, 2021.
- ALMAGRABI, O. A.; ABDELMONEIM, T. S. Using of arbuscular mycorrhizal fungi to reduce the deficiency effect of phosphorous fertilization on maize plants (*Zea mays* L.). **Life Science Journal**, v. 9, p. 1648–1654, 2012.
- ALOO, B. N.; MAKUMBA, B. A.; MBEGA, E. R. The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, v. 219, p. 26-39, 2019.
- AMERIAN, M. R.; STEWART, W. S.; GRIFFITHS, H. Effect of two species of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, assimilation and leaf water relations in maize (*Zea mays*). **Aspects of applied biology**, v. 63, p. 71–76, 2001.
- AQUINO, J. P. A.; ANTUNES, J. E. L.; BONIFÁCIO, A.; ROCHA, S. M. B.; AMORIM, M. R.; NETO, F. A.; ARAUJO, A. S. F. Plant growth-promoting bacteria improve growth and nitrogen metabolism in maize and sorghum. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 33, p. 249-260, 2021.
- ARAUJO, F. F.; BONIFACIO, A.; BAVARESCO, L. G.; MENDES, L. W.; ARAUJO, A. S. F. *Bacillus subtilis* changes the root architecture of soybean grown on nutrient-poor substrate. **Rhizosphere**, v. 18, n. 100348, 2021.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p.163-190, 2013.
- AZZIZ, G.; BAJSA, N.; HAGHJOU, T.; TAULÉ, C.; VALVERDE, Á.; IGUAL, J. M.; ARIAS, A. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop–pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 320-326, 2012.

BATISTA, F. C.; FERNANDES, T. A.; ABREU, C. S.; OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRA, V. P.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. P.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, C. A. O. **Potencial de microrganismos rizosférico e endolíticos de milho em solubilizar o fosfato de ferro e produzir sideróforos.** 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1096969/1/bol166.pdf>. Acesso em: 21 de maior de 2024.

BATTINI, F.; GRONLUND, M.; AGNOLUCCI, M.; GIOVANNETTI, M.; JAKOBSEN, I. Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria. **Scientific Reports**, v. 7, n. 4686, 2017.

BASLAM, M.; GOICOECHEA, N. Water deficit improved the capacity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. **Mycorrhiza**, v. 22, n. 5, p. 347-359, 2012.

BEDASSA, M. Fractionation and distribution of phosphorus in acid soils: Review. **International Journal of Horticulture and Food Science**, v. 5, n. 1, p. 64-70, 2023.

BEDINI, S.; AVIO, L.; ARGESE, E.; GIOVANNETTI, M. Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 120, p. 463-466, 2007.

BEGUM, N.; AHANGER, M. A.; SU, Y.; LEI, Y.; MUSTAFA, N. S. A.; AHMAD, P.; ZHANG, L. Improved drought tolerance by AMF inoculation in maize (*Zea mays*) involves physiological and biochemical implications. **Plants**, v. 8, n. 579, 2019.

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A C. **Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição.** In: FERNANDES, M. S (Ed.). Nutrição Mineral de Plantas. Viçosa: SBCS, p. 57, 2006.

BERTA, G.; FUSCONI, A.; TROTTA, A. VA mycorrhizal infection and the morphology and function of root systems. **Environmental and Experimental Botany**, v. 33, n. 1, p. 159-173, 1993.

BLAKE, C.; CHRISTENSEN, M. N.; KOVÁCS, A T. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. **International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 1, p. 15-25, 2021.

BORRIS, R. **Bacillus, a plant-beneficial bacterium.** In: LUGTENBERG, B. Principles of plant-microbe interactions. Springer International Publishing, 2015. 379-391 p.

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

BUSSO, M.; BUSSO, M. Arbuscular mycorrhizal fungi and common mycorrhizal networks benefit plants through morphological, physiological and productive traits and soil quality. **Lilloa**, v. 59, n. 2, p. 301-317, 2022.

BUZO, F. S.; MORTINHO, E. S.; SANTANA, T. L. L.; GARCIA, I. M.; CARVALHO, C. L. M.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. T. Bean nutrition and development in the function of reduced phosphorus doses and inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus. **Journal of Plant Nutrition**, v. 45, n. 13, p. 1942-1952, 2022.

CATÃO, H. C. R. M.; MAGALHÃES, H. M.; SALES, N. L. P.; BRANDÃO JÚNIOR, D. S.; ROCHA, F. S. Incidência e viabilidade de sementes crioulas de milho naturalmente infestadas com fungos em pré e pós-armazenamento. **Ciência Rural**, v. 43, n. 5, p. 764-770, 2013.

CELY, M.; OLIVEIRA, A.; FREITAS, V.; LUCA, M.; BARAZETTI, A.; SANTOS, I.; GIONCO, B.; GARCIA, G.; PRETE, C.; ANDRADE, G. Inoculant of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (*Rhizophagus clarus*) increase yield of soybean and cotton under field conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 720, 2016.

CESCAS, M.; TYNER, E.; SYERS, J. Distribution of apatite and other mineral inclusions in a rhyolitic pumice ash and beach sands from New Zealand: an electron-microprobe study. **European Journal of Soil Science**, v. 21, n. 1, p. 78-84, 1970.

CHEN, M.; ARATO, M.; BORGHI, L.; NOURI, E.; REINHARDT, D. Beneficial services of Arbuscular Mycorrhizal Fungi – from ecology to application. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1270, 2018.

CHEN, S.; ZHAO, H.; ZOU, C.; LI, Y.; CHEN, Y.; WANG, Z.; JIANG, Y.; LIU, A.; ZHAO, P.; WANG, M.; AHAMMEND, G. J. Combined inoculation with multiple Arbuscular Mycorrhizal Fungi improves growth, nutrient uptake and photosynthesis in cucumber seedlings. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2516, 2017.

CHEN, Z.; WANG, L.; CARDOSO, J.; ZHU, S.; LIU, G.; RAO, I.; LIN, Y. Improving phosphorus acquisition efficiency through modification of root growth responses to phosphate starvation in legumes. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1094157, 2023.

CHERN, E. C.; TSAI, D. W.; OGUNSEITAN, O. A. Deposition of glomalin-related soil protein and sequestered toxic metals into watersheds. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 3566-3572, 2007.

CHIU, C. H.; PASZKOWSKI, U. Mechanisms and impact of symbiotic phosphate acquisition. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 6, 2019.

DOBRYŃSKI, J.; JAKUBOWSKA, Z.; DYBEK, B. Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1069053, 2022.

DRIVER, J. D.; HOLBEN, W. E.; RILLIG, M. C. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Soil Biology & Biochemistry**, v.37, n.1, p.101-106, 2005.

EMAMI, S.; ALIKHANI, H.; POURBABAEI, A.; ETESAMI, H.; SARMADIAN, F.; MOTESSHAREZADEH, B. Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 19, p. 19804-19813, 2019.

EMMANUEL, O. C.; BABALOLA, O. O. Productivity and quality of horticultural crops through co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting bacteria. **Microbiological Research**, v. 239, n. 126569, 2020.

EZAWA, T.; SAITO, K. How do Arbuscular Mycorrhizal Fungi handle phosphate? New insight into fine-tuning of phosphate metabolism. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1116-1121, 2018.

FALL, A. F.; NAKABONGE, G.; SSEKANDI, J.; FOUNOUNE-MBOUP, H.; BADJI, A.; NDIAYE, A.; NDIAYE, M.; KYAKUWA, P.; ANYONI, O. G.; KABASEKE, C.; RONO, A. K.; EKWANGU, J. Combined effects of indigenous Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and NPK fertilizer on growth and yields of maize and soil nutrient availability. **Sustainability**, v. 15, n. 3, p. 2243, 2023.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type 259 designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

FERREIRA, P.; CERETTA, C.; SORIANI, H.; TIECHER, T.; SOARES, C.; ROSSATO, L.; NICOLOSO, F.; BRUNETTO, G.; PARANHOS, J.; CORNEJO, P. *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. **Applied Soil Ecology**, v. 91, p. 37-47, 2015.

FERROL, N.; AZCÓN-AGUILAR, C.; PÉREZ-TIENDA, J. Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. **Plant Science**, v. 280, p. 441-447, 2019.

FREW, A.; POWELL, J. R.; GLAUSER, G. BENNETT, A. E.; JOHNSON, S. N. Mycorrhizal fungi enhance nutrient uptake but disarm defences in plant roots, promoting plant-parasitic nematode populations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 126, p. 123-132, 2018.

GATIBONI, L.; BRUNETTO, G.; PAVINATO, P. S.; GEORGE, T. S. Editorial: Legacy phosphorus in agriculture: role of past management and perspectives for the future. **Frontiers in Earth Science**, v. 8, p. 619935, 2020.

GANESH, J.; SINGH, V.; HEWITT, K.; KAUNDAL, A. Exploration of the rhizosphere microbiome of native plant *Ceanothus velutinus* – an excellent resource of plant growth-promoting bacteria. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 979069, 2022.

GILLESPIE, A.; FARRELL, R.; WALLEY, F.; ROSS, A.; LEINWEBER, P.; ECKHARDT, K.; REGIER, T.; BLYTH, R. Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 766-777, 2011.

GOMES, V.; ASSIS, I.; HOBBS, R.; FERNANDES, G. Glomalin-related soil protein reflects the heterogeneity of substrate and vegetation in the campo rupestre ecosystem. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, p. 733-743, 2021.

GONG, H.; MENG, F.; WANG, G.; HARTMANN, T. E.; FENG, G.; WU, J.; JIAO, X.; ZHANG, F. Toward the sustainable use of mineral phosphorus fertilizers for crop production

in China: From primary resource demand to final agricultural use. **Science of The Total Environment**, v. 804, p. 150183, 2022.

GONZALEZ-CHAVEZ, M. D. A.; NEWSAM, R.; LINDERMAN, R.; DODD, J.; VALDEZ-CARRASCO, J. M. Bacteria associated with the extraradical mycelium of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus in an As/Cu polluted soil. **Agrociencia**, v. 42, p. 1-10, 2004.

GOSLING, P.; MEAD, A.; PROCTOR, M.; HAMMOND, J. P.; BENDING, G. D. Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient. **New Phytologist**, v. 198, n. 2, p. 546-556, 2013.

GRZEBISZ, W.; NIEWIADOMSKA, A.; POTARZYCKI, J.; ANDRZEJEWSKA, A. Phosphorus hotspots in crop plants production on the farm-mitigating critical factors. **Agronomy**, v. 14, n. 1, p. 200, 2024.

HALVORSON, J. J.; GONZALEZ, J. M. Bradford reactive soil protein in Appalachian soils: distribution and response to incubation, extraction reagent and tannins. **Plant and Soil**, v. 286, p. 339–356, 2006.

HASHEM, A., TABASSUM, B.; ALLAH, E. F. A. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 6, p. 1291-1297, 2019.

KAYMAK, H. **Potential of PGPR in agricultural innovations**. In: MAHESHWARI, D. Plant growth and health promoting bacteria. Microbiology Monographs, v. 18. 2010.

KHAN, Y.; SHAH, S.; TIAN, H. The roles of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in influencing plant nutrients, photosynthesis, and metabolites of cereal crops – A review. **Agronomy**, v. 12, n. 12, p. 2191, 2022.

KILIAN, M.; STEINER, U.; KREBS, B.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; HAIN, R. FZB24® *Bacillus subtilis*-mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Pflanzenschutz Nachr Bayer**, v. 1, p. 72–93, 2000.

KONG, Z.; LIU, H. Modification of rhizosphere microbial communities: a possible mechanism of plant growth promoting rhizobacteria enhancing plant growth and fitness. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 920813, 2022.

KOVÁCS, A. T. *Bacillus subtilis*. **Microbe of The Month**, v. 27, n. 8, p. 724-725, 2019.

KULKARNI, S. S.; RAVIRAJA, N. S.; SRIDHAR, K. R. Arbuscular Mycorrhizal Fungi of tropical sand dunes of west coast of India. **Journal of Coastal Research**, v. 13, n. 3, p. 931-936, 1997.

LEKBERG, Y.; KOIDE, R. Is plant performance limited by abundance of Arbuscular Mycorrhizal Fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. **New Phytologist**, v. 168, n. 1168, p. 189-204, 2005.

- LIMA, J. V.; TINÔCO, R. S.; OLIVARES, F. L.; CHIA, G. S.; MELO JÚNIOR, J. A. G.; SILVA, G. B. Rhizobacteria modify root architecture and improve nutrient uptake in oil palm seedlings despite reduced fertilizer. **Rhizosphere**, v. 19, n. 2452-2198, 2021.
- LIN, C.; TIAN, G.; PAI, C.; CHIU, C. Characterization of phosphorus in subtropical coastal sand dune forest soils. **Forests**, v. 9, n. 11, p. 710, 2018.
- LIU, W.; ZHANG, Y.; JIANG, S.; DENG, Y.; CHRISTIE, P.; MURRAY, P. J.; LI, X.; ZHANG, J. Arbuscular Mycorrhizal Fungi in soil and roots respond differently to phosphorus inputs in an intensively managed calcareous agricultural soil. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24902, p. 1-11, 2016.
- LÓPEZ-ARREDONDO, D.; LEYVA-GONZÁLEZ, M.; GONZÁLEZ-MORALES, S.; LÓPEZ-BUCIO, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 95-123, 2014.
- LUTGEN, E. R.; MUIR-CLAIRMONT, D.; GRAHAM, J.; RILLIG, M. C. Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland. **Plant and Soil**, v. 257, p. 71-83, 2003.
- MAHDI, I.; FAHSI, N.; HAFIDI, M.; ALLAOUI, A.; BISKRI, L. Plant growth enhancement using rhizospheric halotolerant phosphate solubilizing bacterium *Bacillus licheniformis* QAI and *Enterobacter asburiae* QF11 isolated from *Chenopodium quinoa* Willd. **Microorganisms**, v. 8, p. 948, 2020.
- MARDAMOOTOO, T., PREEZ, C.; BARNARD, J. Agricultural phosphorus management for environmental protection: A review. **Journal of Geoscience and Environment Protection**, v. 9, n. 8, 2021.
- MATHUR, S.; JAJOO, A. Arbuscular Mycorrhizal Fungi protects maize plants from high temperature stress by regulating photosystem II heterogeneity. **Industrial Crops and Products**, v. 143, n. 111934, 2020.
- MATHUR, S.; SHARMA, M. P.; JAJOO, A. Improved photosynthetic efficacy of maize (*Zea mays*) plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under high temperature stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 180, p. 149-154, 2018.
- MCGONIGLE, T. P.; MILLER, M. H.; EVANS, D. G.; FAIRCHILD, G. L.; SWAN, J. A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **New Phytologist.**, v. 115, n. 3, p. 495-501, 1990.
- MCLAREN, T.; SMERNIK, R.; MCLAUGHLIN, M.; MCBEATH, T.; KIRBY, J.; SIMPSON, R.; GUPPY, C.; DOOLETTE, A.; RICHARDSON, A. Complex forms of soil organic phosphorus – A major component of soil phosphorus. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 22, p. 13238-13245, 2015.
- MERLOS, M.A.; ZITKA, O.; VOJTECH, A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. The arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* differentially regulates the copper response of two maize cultivars differing in copper tolerance. **Plant Science**, v. 253, p. 68–76, 2016.

MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The significance of *Bacillus* spp. In disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. **Microorganism**, v. 8, n. 7, 2020.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. Ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2006, 729 p.

NGOSONG, C.; TATAH, B.; OLOUGOU, M.; SUH, C.; NKONGHO, R.; NGONE, M.; ACHIRI, D.; TCHAKOUNTÉ, G.; RUPPEL, S. Inoculating plant growth-promoting bacteria and Arbuscular Mycorrhiza Fungi modulates rhizosphere acid phosphatase and nodulation activities and enhance the productivity of soybean (*Glycine max*). **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 934339, 2022.

NUNES, R. S.; ROSOLEM, C. A.; ANDREOTE, F. D.; OLIVEIRA, A. J. R.; COUTINHO, E. L. M.; PAVINATO, P. S. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2537, 2018.

NUSSAUME, L.; KANNO, S.; JAVOT, H.; MARÍN, E.; POCHON, N.; AYADI, A.; NAKANISHI, T.; THIBAUD, M. Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters. **Frontiers in plant science**, v. 2, p. 83, 2011.

OROZCO-MOSQUEDA, M.; SANTOYO, G.; GLICK, B. Recent advances in the bacterial phytohormone modulation of plant growth. **Plants**, v. 12, n. 3, p. 606, 2023.

PAIVA, M.; OLIVEIRA, F.; ALVES, W.; FARIAS, M.; CUNHA, M.; TAVARES, H.; GÓIS, H.; SANTOS, M.; ARRUDA, J.; GRANGEIRO, L.; BEZERRA, M.; SÁ, F. Phosphorus in alkaline soils of the semiarid region, Brazil: inorganic fractions, capacity factor, and availability. **International Journal of Phytoremediation**, v. 25, p. 965-980, 2022.

PAVINATO, P.; ROCHA, G.; CHERUBIN, M.; HARRIS, I.; JONES, D.; WITHERS, P. Map of total phosphorus content in native soils of Brazil. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 6, 2021.

PEDONE-BONFIM, M.; SILVA, D.; SILVA-BATISTA, A.; OLIVEIRA, A.; ALMEIDA, J.; YANO-MELO, A.; MAIA, L. Mycorrhizal inoculation as an alternative for the sustainable production of *Mimosa tenuiflora* seedlings with improved growth and secondary compounds content. **Fungal biology**, v. 122, n. 9, p. 918-927, 2018.

PEDROSO, R.; MEDEIROS, C.; OMETTO, A.; PAES, V.; ANDRADE, E.; INMAN, S.; SILVA, J.; PEDROSO, G. In-furrow application of arbuscular mycorrhizal fungi propagules enhanced yields, plant vigor, and biomass accumulation of soybeans (*Glycine max*) and maize (*Zea mays*). **Australian Journal of Crop Science**, v. 16, n. 5, p. 657-664, 2022.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**. v. 55, n. 18, p. 158, 1970.

PRADO, R. M. **Nutrição de plantas**. 2. ed. São Paulo: Editora UNESP. 2020. p. 49-50.

RAMÍREZ-FLORES, M.; BELLO-BELLO, E.; RELLÁN-ÁLVAREZ, R.; SAWERS, R. J. H.; OLALDE-PORTUGAL, V. Inoculation with the mycorrhizal fungus *Rhizophagus*

irregularis modulates the relationship between root growth and nutrient content in maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). **Plant Direct**, v. 3, p. e00192, 2019.

RATMINI, N. P. Metabolism and transport of P nutrient in the rhizosphere zone in acidic soils. **Jurnal Lahan Suboptimal: Journal of Suboptimal Lands**, v. 11, n. 1, p. 51-598, 2022.

REN, C.; JIN, S.; WU, Y.; ZHANG, B.; KANTER, D.; WU, B.; XI, X.; ZHANG, X.; CHEN, D.; XU, J.; GU, B. Fertilizer overuse in Chinese smallholders due to lack of fixed inputs. **Journal of Environmental Management**, v. 293, n. 112913, 2021.

RICHARDSON, A.; SIMPSON, R. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. **Plant Physiology**, v. 156, p. 989-996, 2011.

RILLIG, M. C.; RAMSEY, P. W.; MORRIS, S.; PAUL, E. A. Glomalin, an Arbuscular-Mycorrhizal Fungal soil protein, responds to land-use change. **Plant Soil**, v. 253, p. 293-299, 2003.

RILLIG, M.C.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A.; SCHMIDT, W.F.; TORN, M.S. Large contribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant and Soil**, v. 233, p. 167-177, 2001.

ROCHA, I.; MA, Y.; CARVALHO, M. F.; MAGALHÃES, C.; JANOUŠKOVÁ, M.; VOSÁTKA, M.; FREITAS, H.; OLIVEIRA, R. S. Seed coating with inocula of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and plant growth promoting rhizobacteria for nutritional enhancement of maize under different fertilization regimes. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 65, n. 1, p. 31-43, 2018.

RODRIGUES, M.; PAVINATO, P. S.; WITHERS, P. J. A.; TELES, A. P. B.; HERRERA, W. F. B. Legacy phosphorus and no tillage agriculture in tropical oxisols of the Brazilian savanna. **Science of The Total Environment**, v. 542, p. 1050-1061, 2016.

ROSITA, R.; WIDIASTUTI, R.; MANSUR, I.; FAULINA, S. Potential use of *Claroideoglomus etunicatum* to enrich signal grass (*Brachiaria decumbens* Stapf.) for silvopasture preparation. **Menara Perkebunan**, v. 88, n. 1, 2020.

ROY, E. D. Phosphorus recovery and recycling with ecological engineering: A review. **Ecological Engineering**, v. 98, p. 213-227, 2017.

ROY, E. D.; RICHARDS, P. D.; MARTINELLI, L. A.; COLETTA, L. D.; LINS, S. R.; VAZQUEZ, F. F.; WILLIG, E.; SPERA, S. A.; VANWEY, L. K.; PORTER, S. The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. **Nature Plants**, v. 2, n. 5, p. 16043, 2016.

SABOOR, A.; ALI, M.; HUSSAIN, S.; ENSHASY, H.; HUSSAIN, S.; AHMED, N.; GAFUR, A.; SAYYED, R.; FAHAD, S.; DANISH, S.; DATTA, R. Zinc nutrition and arbuscular mycorrhizal symbiosis effects on maize (*Zea mays* L.) growth and productivity. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 11, p. 6339-6351, 2021.

SAEID, A.; PROCHOWNIK, E.; DOBROWOLSKA-IWANEK, J. Phosphorus solubilization

by *Bacillus* species. **Molecules**, v. 23, n. 11, 2018.

SANDMANN, G. Carotenoids and their biosynthesis in Fungi. **Molecules**, v. 27, n. 4, 2022.

SANTANA, L. R.; SILVA, L.N.; TAVARES, G. G.; BATISTA, P. F.; CABRAL, J. S. R.; SOUCHIE, E. L. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with maize plants during hydric deficit. **Scientific Reports**, v. 13, p.1519, 2023.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; ARAUJO FILHO, J. C.; OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed. Brasília: Embrapa. 2018.

SBRANA, C.; PEPE, A.; FERROL, N.; GIOVANNETTI, M. A whole-plant culture method to study structural and functional traits of extraradical mycelium. **Methods in molecular biology**, v. 2146, p. 33-41, 2020.

SHAHID, I.; HAN, J.; HANOOQ, S.; MALIK, K. A.; BORCHERS, C. H.; MEHNAZ, S. Profiling of metabolites of bacillus spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 605195, 2021.

SHAN, X.; ZHAO, Y.; BO, S.; YANG, L.; XIAO, Z.; AN, Q.; ZHAI, S. Magnetic aminated lignin/CeO₂/Fe₃O₄ composites with tailored interfacial chemistry and affinity for selective phosphate removal. **Science of the Total Environment**, v. 796, p. 148984, 2021.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Embrapa Informação Tecnológica. Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 2009. 627 p.

SILVA, A. M. M.; JONES D. L.; CHADWICK, D. R.; QI, X.; COTTA, S. R.; ARAÚJO, V. L. V. P.; MATTEOLI, F. P.; LACERDA-JÚNIOR, G. V. PEREIRA, A. P. A.; FERNANDRES-JÚNIOR, P. I.; CARDOSO, E. J. B. N. Can arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria facilitate 33P uptake in maize plants under water stress? **Microbiological Research**, v. 271, p. 127350, 2023.

SILVESTRINI, G. R.; DA ROSA, E. J.; CORRÊA, H. C.; DAL MAGRO, T.; SILVESTRE, W. P.; PAULETTI, G. F.; CONTE, E. D. Potential use of phosphate-solubilizing bacteria in soybean culture. **AgriEngineering**, v. 5, n. 3, p. 1544-1554, 2023.

SMITH, S.; SMITH, F. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, p. 227-50, 2011.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**, London: Academic Press, 3. ed, 2008. Disponível em: <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1398632>. Acesso em: 14 de maio de 2024.

SONG, C.; SARPONG, C. K.; ZHANG, X.; WANG, W.; WANG, L.; GAN, Y.; YONG, T.; CHANG, X.; WANG, Y.; YANG, W. Mycorrhizosphere bacteria and plant-plant interactions facilitate maize P acquisition in an intercropping system. **Journal of Cleaner Production**, v. 314, p. 127993, 2021.

SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. **Cerrado**: correção do solo e adubação. Brasília: Embrapa Cerrados, 2004. 416 p.

STEINBERG, P. D.; RILLIG, M. C. Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 191-194, 2003.

STOFFEL, S. C. G.; SOARES, C. R. F. S.; MEYER, E.; LOVATO, P. E.; GIACHINI, A. J. Yield increase of corn inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. **Ciência rural**, v. 50, n. 7, 2020.

STUTZ, J.C.; MORTON, J.B. Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 1883-1889, 1996.

SUN, Y.; HAN, Y.; XU, Z.; ZHANG, J.; SHEN, J.; CHENG, L. Phosphorus partitioning contribute to phosphorus use efficiency during grain filling in *Zea mays*. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1223532. 2023.

SYERS, J. K.; JOHNSTON, A.; CURTIN, D. Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use: reconciling changing concepts of soil phosphorus behaviour with agronomic information. **Food and Agricultural Organization of the United Nations**, v. 5, n. 1, 2008.

SZERLAG, K. D.; ELAVARTHI, M.; SIEBECKER, M. G.; GU, C.; MCCRONE, C.; SPARKS, D. L. Systematic study of legacy phosphorus (P) desorption mechanisms in high-p agricultural soils. **Minerals**, v. 12, n. 4, p. 458, 2022.

TIMMUSK, S.; BEHERS, L.; MUTHONI, J.; MURAYA, A.; ARONSSON, A. C. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 49, 2017.

TSOTETSI, T.; NEPHALI, L.; MALEBE, M.; TUGIZIMANA, F. *Bacillus* for plant growth promotion and stress resilience: what have we learned? **Plants**, v. 11, p. 2482, 2022.

UJVÁRI, G.; TURRINI, A.; AVIO, L.; AGNOLUCCI, M. Possible role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and associated bacteria in the recruitment of endophytic bacterial communities by plant roots. **Mycorrhiza**, v. 31, p. 527-544, 2021.

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; NASRULHAQ BOYCE, A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. **Molecules**, v. 21, p. 573, 2016.

VODNIK, D.; GRČMAN, H.; MACEK, I.; VAN ELTEREN, J.T.; KOVACEVIC, M. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. **The Science of the Total Environment**, v. 392, p. 130-136, 2008.

WANG, B.; QIU, Y. L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**, v. 16, n. 5, p. 299-363, 2006.

WELLBURN, A. R. 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**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

WILKES, T.; WARNER, D.; EDMONDS-BROWN, V.; DAVIES, K.; DENHOLM, I. The tripartite rhizobacteria-am fungal-host plant relationship in winter wheat: impact of multi-species inoculation, tillage regime and naturally occurring rhizobacteria species. **Plants**, v. 10, p. 1357, 2021.

WILSON, G. W. T.; RICE, C. W.; RILLIG, M. C.; SPRINGER, A.; HARTNETT, D. C. Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. **Ecology Letters**, v. 12, p. 452-461, 2009.

WITHERS, P. J. A.; RODRIGUES, M.; SOLTANGHEISI, A.; DE CARVALHO, T. S.; GUILHERME, L. R. G.; BENITES, V. M.; GATIBONI, L. C.; DE SOUSA, D. M. G.; NUNES, R. S.; ROSOLEM, C. A.; ANDREOTE, F. D.; OLIVEIRA JR, A.; COUTINHO, E. L. M.; PAVINATO, P. S. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-13, 2018.

WRIGHT, S. F.; FRANKE-SNYDER, M.; MORTON, J. B.; UPADHYAYA, A. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of Arbuscular Mycorrhizal Fungi during active colonization of roots. **Plant and Soil**, v. 181, p. 193-203, 1996.

WRIGHT, S. F., UPADHYAYA, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Soil Science**, v. 161, p. 575-586, 1996.

WRIGHT, S. F.; UPDAHYAYA, A. Microbial biomass and activity in soils as affected by freezing and thawing. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 159-166, 1998.

YANG, X.; POST, W.; THORNTON, P.; JAIN, A. The distribution of soil phosphorus for global biogeochemical modeling. **Biogeosciences**, v. 10, p. 2525-2537, 2012.

YU, L.; ZHANG, H.; ZHANG, W.; LIU, K.; LIU, M.; SHAO, X. Cooperation between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and plant growth-promoting bacteria and their effects on plant growth and soil quality. **PeerJ**, v. 10, p. 13080, 2022.

ZHANG, W.; ZHANG, W.; WANG, X.; LIU, D.; ZOU, C.; CHEN, X. Quantitative evaluation of the grain zinc in cereal crops caused by phosphorus fertilization. A meta-analysis. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 41, p. 6, 2021.

ZHU, X. Q.; WANG, C. Y.; CHEN, H.; TANG, M. Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on photosynthesis, carbon content, and calorific value of black locust seedlings. **Photosynthetica**, v. 52, p. 247-252, 2014.

ANEXOS

Tabela S1 - Resumo da análise de variância para as variáveis comprimento da planta (CP), número de folhas (NF), diâmetro basal do colmo (DBC), massa de matéria seca parte aérea (MSPA), comprimento da raiz (CR), diâmetro médio da raiz (DMR), número médio de ramificações (NMR), área de superfície de raiz (ASR), massa de matéria seca da raiz (MSR), proteína do solo relacionada à glomalina facilmente extraível (PSRG-FE), clorofila *a* (Clob a), clorofila *b* (Clob b), clorofila total (Clob.t), carotenoides (Carot) e temperatura foliar (Tf) de plantas de milho com inoculação isolada (*Bacillus subtilis*, *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglomus etunicatum* e inoculante comercial Rootella BR ULTRA), coinoculações (combinada com cada um dos fungos) e não inoculado, submetidos a diferentes doses de fósforo (0, 50 e 100% da dose recomendada).

FV	GL	CP	NF	DBC	MSPA	CR	DMR	NMR	ASR	MSR	PSRG-FE	Clob a	Clob b	Clob.t	Carot	Tf
Inoculação (IN)	7	12.487*	5.333*	19.922*	19.905*	1.033 ^{ns}	35.606*	120.53 7*	100.752*	17.802*	10.580*	8.577*	23.385*	8.645*	11.796*	7.46*
Dose fósforo (DF)	2	3458.180 *	175.609 *	924.73 3*	9044.533 *	28.063*	380.57 6*	975.86 2*	2830.663 *	982.51 5*	13.813*	1.991 ^{ns}	28.419*	4.183*	16.346*	59.646*
IN x DF	14	13.370*	2.813*	21.156*	9.421*	2.929*	128.29 3*	86.241*	57.748*	5.900*	5.050*	4.019*	7.382*	5.048*	7.006*	4.743*
Bloco	3	0.232 ^{ns}	0.542 ^{ns}	4.070 ^{ns}	0.996 ^{ns}	0.602 ^{ns}	0.424 ^{ns}	1.903 ^{ns}	1.782 ^{ns}	0.322 ^{ns}	3.852 ^{ns}	0.500 ^{ns}	0.116 ^{ns}	0.394 ^{ns}	0.600 ^{ns}	24.281*
Resíduo	69															
Total	95															
CV (%)		6.15	12.15	8.29	4.71	12.92	2.41	7.20	5.92	14.52	15.57	17.39	22.87	17.12	11.25	3.70

*= significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ns = não significativo.

Tabela S2 - Resumo da análise de variância para as variáveis de P parte aérea, P raiz, P total, K parte aérea, K raiz, Ca parte aérea, Ca raiz, Mg parte aérea e Mg raiz de plantas de milho com inoculação isolada (*Bacillus subtilis*, *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglomus etunicatum* e inoculante comercial Rootella BR ULTRA), coinoculações (*B. subtilis* combinada com cada um dos fungos) e não inoculado, submetidos a diferentes doses de fósforo (0, 50 e 100% da dose recomendada).

FV	GL	P parte aérea	P raiz	P total	K parte aérea	K raiz	Ca parte aérea	Ca raiz	Mg parte aérea	Mg raiz
Inoculação (IN)	7	5.613*	19.595*	18.249*	29.869*	123.769 ^{ns}	5.294*	36.987*	6.914*	36.847*
Dose fósforo (DF)	2	1596.304*	1408.794*	2914.883*	3300.151*	1356.258*	775.271*	948.615*	2263.526*	1303.016*
IN x DF	14	8.487*	16.090*	9.349*	52.248*	30.816*	3.824*	25.273*	7.048*	31.794*
Bloco	3	3.770. ^{ns}	2.050. ^{ns}	5.094 ^{ns}	0.572 ^{ns}	3.533 ^{ns}	2.129 ^{ns}	1.466 ^{ns}	1.771 ^{ns}	0.507 ^{ns}
Resíduo	69									
Total	95									
CV (%)		11.07	11.97	7.88	7.41	11.49	15.87	15.10	9.32	13.25

*= significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ns = não significativo.

Tabela S3 - Resumo da análise de variância para as variáveis de Fe parte aérea, Fe raiz, Zn parte aérea, Zn raiz, Mn parte aérea e Mn raiz de plantas de milho com inoculação isolada (*Bacillus subtilis*, *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglomus etunicatum* e inoculante comercial Rootella BR ULTRA), coinoculações (*B. subtilis* combinada com cada um dos fungos) e não inoculado, submetidos a diferentes doses de fósforo (0, 50 e 100% da dose recomendada).

FV	GL	Fe parte aérea	Fe raiz	Zn parte aérea	Zn raiz	Mn parte aérea	Mn raiz
Inoculação (IN)	7	19.366*	13.295*	60.193*	29.131*	21.265*	3.760*
Dose fósforo (DF)	2	1257.181*	414.904*	1473.169*	487.728*	954.877*	293.255*
IN x DF	14	18.942*	3.504*	27.470*	52.271*	81.937*	3.232*
Bloco	2	0.5841 ^{ns}	0.008 ^{ns}	1.2681 ^{ns}	1.072 ^{ns}	1.068 ^{ns}	2.129 ^{ns}
Resíduo	46						
Total	71						
CV (%)		11.49	19.88	10.32	18.16	14.20	24.02

*= significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ns = não significativo.

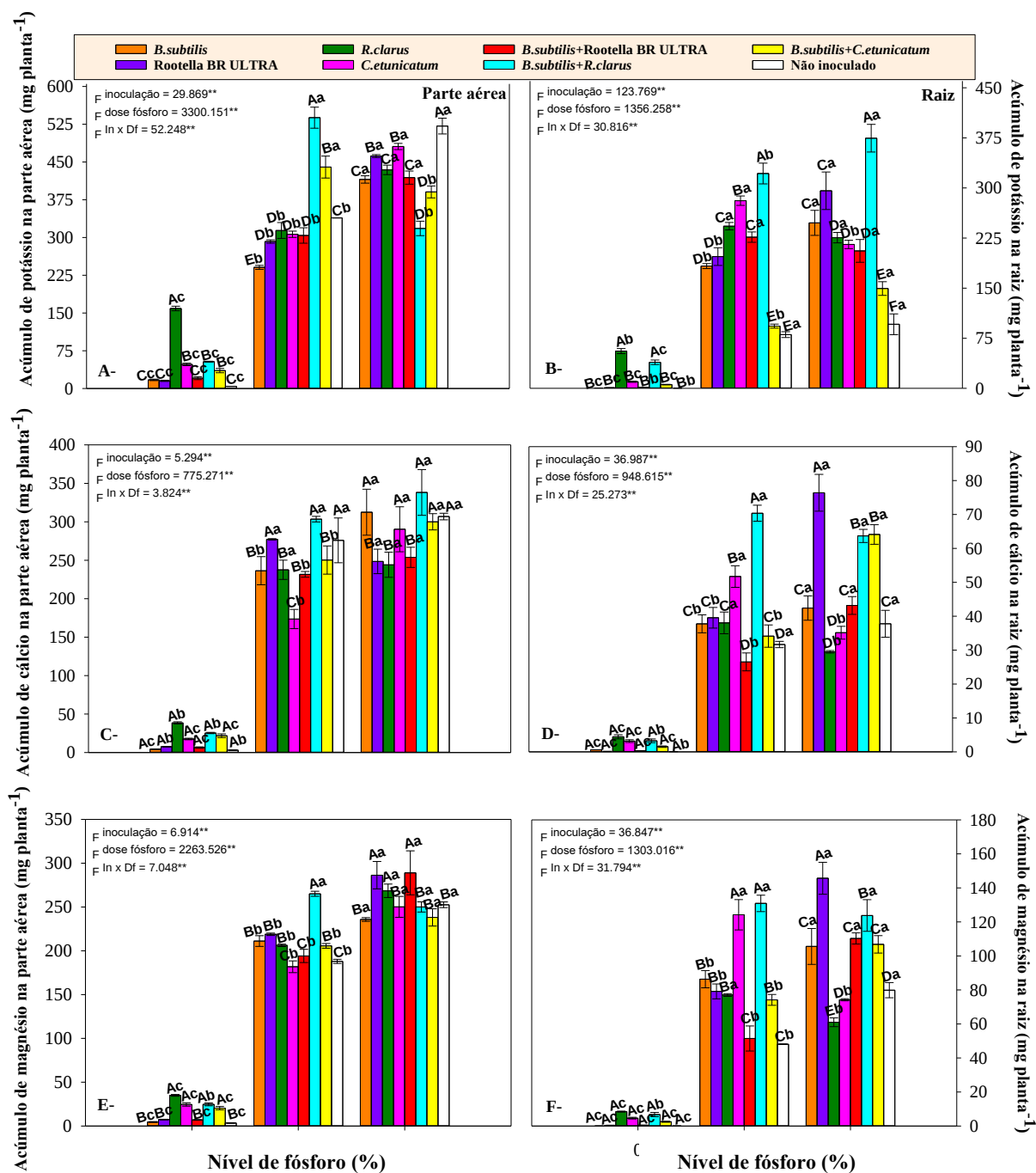


Figura S1 - Acúmulo de potássio na parte aérea (A) e raiz (B), acúmulo de cálcio na parte aérea (C) e raiz (D) e acúmulo de magnésio na parte aérea (E) e raiz (F) de plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, *Rootella BR ULTRA*, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + *Rootella BR ULTRA*, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e tratamento não inoculado) e níveis de fósforo (0, 50 e 100%). Letras maiúsculas comparam inoculações dentro de cada nível de fósforo, e letras minúsculas comparam níveis dentro de cada inoculação. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Valores de F da ANOVA: ** = significativo a 5%; ns = não significativo.

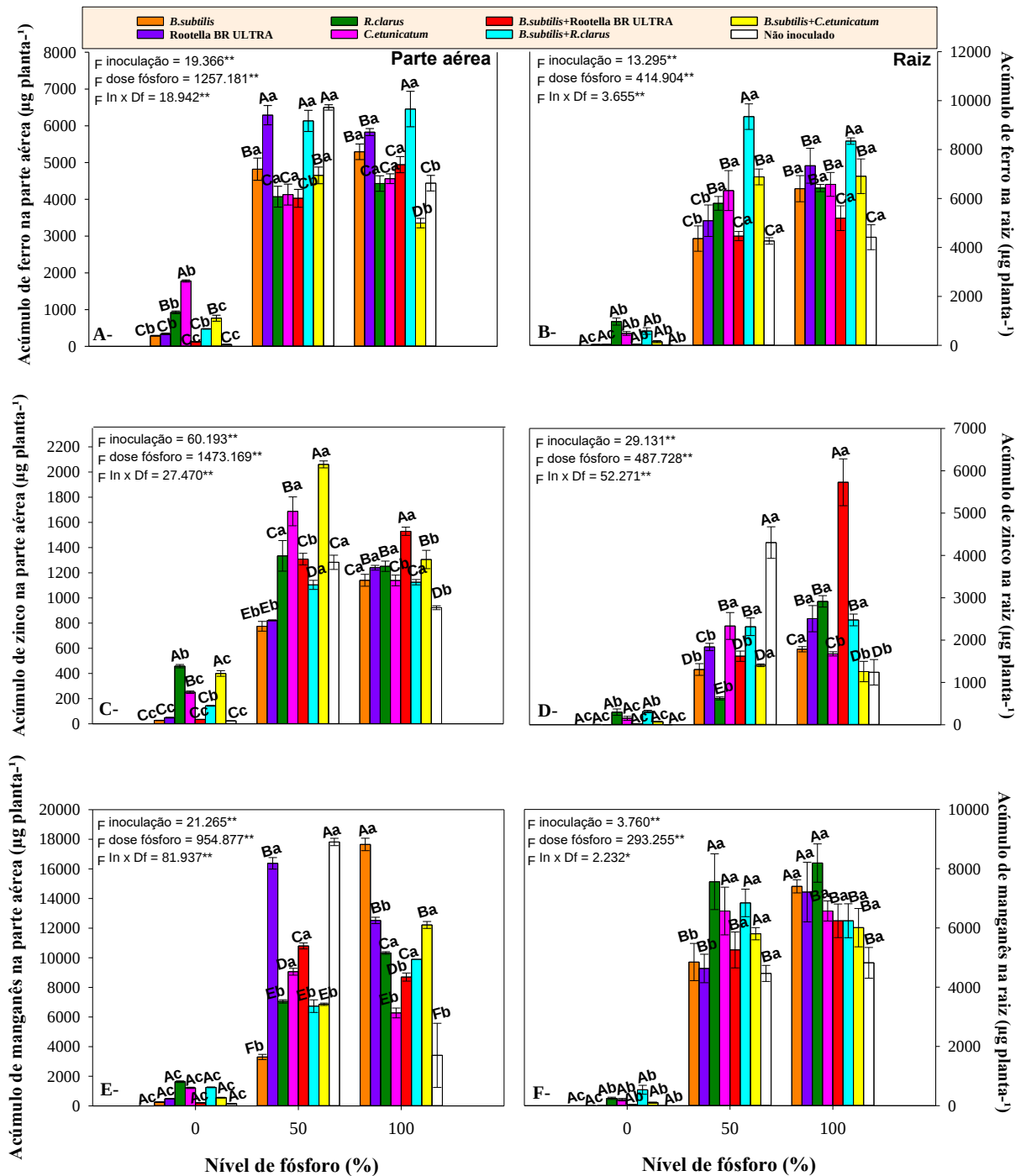


Figura S2 - Acúmulo de ferro na parte aérea (A) e raiz (B), acúmulo de zinco na parte aérea (C) e raiz (D) e acúmulo de manganês na parte aérea (E) e raiz (F) de plantas de milho com diferentes inoculações (*Bacillus subtilis*, *Rootella* BR ULTRA, *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Bacillus subtilis* + *Rootella* BR ULTRA, *Bacillus subtilis* + *Rhizophagus clarus*, *Bacillus subtilis* + *Claroideoglomus etunicatum* e tratamento não inoculado) e níveis de fósforo (0, 50 e 100%). Letras maiúsculas comparam inoculações dentro de cada nível de fósforo, e letras minúsculas comparam níveis dentro de cada inoculação. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Valores de F da ANOVA: ** = significativo a 5%; ns = não significativo.