

Universidade Federal de São João del-Rei
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia

RAQUEL GOMES DE OLIVEIRA

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO
NA PRODUTIVIDADE, ARQUITETURA RADICULAR E MICROBIOMA DE
PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE
FERTILIZAÇÃO FOSFATADA**

SÃO JOÃO DEL-REI
MINAS GERAIS - BRASIL
SETEMBRO DE 2024

RAQUEL GOMES DE OLIVEIRA

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE
FOSFATO NA PRODUTIVIDADE, ARQUITETURA RADICULAR E
MICROBIOMA DE PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO FOSFATADA**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Bioengenharia
da Universidade Federal de São João
del-Rei como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título
de “Doctor Scientiae” (DS).

SÃO JOÃO DEL-REI
MINAS GERAIS - BRASIL
SETEMBRO DE 2024

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O48e Oliveira, Raquel Gomes de.
 EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS
DE FOSFATO NA PRODUTIVIDADE, ARQUITETURA RADICULAR E
MICROBIOMA DE PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS SOB
DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO FOSFATADA /
Raquel Gomes de Oliveira ; orientadora Sylvia Moraes
de Sousa Tinôco; coorientadora Christiane Abreu de
Oliveira Paiva e Flávia Cristina dos Santos . -- São
João del-Rei, 2024.
 105 p.
- Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Bioengenharia - Doutorado) -- Universidade Federal
de São João del-Rei, 2024.
1. Bioinoculante. 2. Diversidade microbiana. 3.
Fertilizantes fosfatados. I. Tinôco, Sylvia Moraes de
Sousa , orient. II. , Christiane Abreu de Oliveira
Paiva e Flávia Cristina dos Santos, co-orient. III.
Título.

		Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia –PPBE UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI - MG		
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO/TESE				
CANDIDATO: Raquel Gomes de Oliveira				
NÍVEL: () Mestrado (X) Doutorado				
DATA DA DEFESA: 03/09/2024				
HORÁRIO DE INÍCIO: 13:00h		LOCAL: meet.google.com/kds-akdt-ufa		
MEMBROS DA BANCA		FUNÇÃO	TÍTULO	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM
NOME COMPLETO	CPF			
Sylvia Morais de Sousa Tinôco	286.650.018-08	Presidente	DS	UFSJ/Embrapa Milho e Sorgo
Christiane Abreu de Oliveira Paiva	980.429.396-04	Coorientador	DS	Embrapa Milho e Sorgo
Flavia Cristina dos Santos	010.692.296-36	Coorientador	DS	Embrapa Milho e Sorgo
Claudia Teixeira Guimarães	674.221.796-00	Membro	DS	UFSJ/Embrapa Milho e Sorgo
Mariana Lourenço Campolino	091.130.086-41	Membro	DS	Novaagrolider/ Angola
Paulo Ivan Fernandes Júnior	051.958.526-77	Membro	DS	Embrapa Semiárido
Cristiane Alcantara dos Santos	044.660.489-59	Membro	DS	UFSJ
Título definitivo da Tese: Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato na produtividade, arquitetura radicular e microbioma de plantas de milho cultivadas sob diferentes condições de fertilização fosfatada				
Em sessão pública após exposição de 38 min. O candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca durante o período de 160 min., tendo a banca chegado ao seguinte resultado:				
(X) Aprovação por unanimidade. () Aprovação somente após satisfazer as exigências que constam na folha de modificações, no prazo fixado pela banca (não superior a quarenta e cinco dias). () Reprovação.				
Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata, que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima relacionada e pelo candidato.				
Local e data: Sete Lagoas, 03 de setembro de 2024,				
Sylvia Morais de Sousa Tinôco (Presidente): _____ Christiane Abreu de Oliveira Paiva (Coorientador): _____ Flavia Cristina dos Santos (Coorientador): _____ Claudia Teixeira Guimarães (Membro 1): _____ Mariana Lourenço Campolino (Membro 2): _____ Paulo Ivan Fernandes Júnior (Membro 3): _____ Cristiane Alcantara dos Santos (Membro 4): _____ Raquel Gomes de Oliveira (Candidato): _____ Coordenador do Programa: _____				
Prof. Dr. Antônio Márcio Rodrigues				



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO
DEL-REI
SISTEMA INTEGRADO DE
PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO E
CONTRATOS

FOLHA DE
ASSINATURAS

Emitido em
03/09/2024

ATA DE DEFESA DE TESE Nº 3/2024 - PPBE (13.03)

(Nº do Protocolo: 23122.027889/2024-77)

(Assinado digitalmente em 06/09/2024 09:47)

ANTONIO MARCIO RODRIGUES

COORDENADOR DE CURSO

PPBE (13.03)

Matrícula: ###876#0

(Assinado digitalmente em 06/09/2024 15:14)

CRISTIANE ALCANTARA DOS SANTOS

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DECEB (12.11)

Matrícula: ###463#0

(Assinado digitalmente em 06/09/2024 09:54)

SYLVIA MORAIS DE SOUSA TINOCO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.018-##

(Assinado digitalmente em 06/09/2024 10:35)

CLAUDIA TEIXEIRA GUIMARÃES

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.796-##

(Assinado digitalmente em 06/09/2024 13:41)

FLAVIA CRISTINA DOS SANTOS

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.296-##

(Assinado digitalmente em 07/09/2024 04:09)

MARIANA LOURENÇO CAMPOLINO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.086-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/> informando seu número: 3, ano: 2024, tipo: ATA DE DEFESA DE TESE, data de emissão: 06/09/2024 e o código de verificação: 4e5c3daf78

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese de doutorado representa o ponto culminante de quatro anos de esforço, dedicação e aprendizados em um projeto que desenvolvi em um novo laboratório, em uma nova cidade e com novos colegas de trabalho. Gostaria, portanto, de expressar meu profundo agradecimento a todos que contribuíram não apenas para este trabalho, mas também pelo ensinamento de vida oferecido, pelos laços criados e pelo suporte constante recebido ao longo dessa jornada.

Primeiramente, agradeço a Deus por Sua sabedoria que me guiou na decisão de iniciar o doutorado, por Sua força que me sustentou nos desafios e por Sua provisão que permitiu o progresso deste estudo.

Aos meus pais Elâine e Sebastião, agradeço pelo amor incondicional, compreensão, pelas orações e apoio nas minhas escolhas. Se sou forte para seguir o meu caminho com responsabilidade e honestidade é porque tenho vocês como pais que me deram o grande exemplo. Agradeço também por me proporcionarem o suporte necessário para que eu pudesse me dedicar inteiramente a este projeto.

Ao meu marido Samuel, agradeço por caminhar ao meu lado me lembrando minha força durante os desafios e me ensinando sobre humildade nas conquistas. Ao longo dessa nossa longa jornada que se iniciou na graduação, tenho para mim a certeza de que juntos somos melhores.

Aos meus irmãos Renata, Rafael e cunhados João e Mary, agradeço pelos conselhos, amizade, cumplicidade, parceria e por torcerem por mim. Ao meu trio predileto Estêvão, Joaquim e Francisco, tão pequenos e, mesmo sem saber, foram fundamentais.

Às amigas que estiveram presentes nos últimos quatro anos Amaia, Ariane, Camila, Carol Oliveira, Gisa, Júlia, Mayra e Thays, agradeço pelo apoio, pelas conversas, conselhos e por todos momentos especiais que compartilhamos. Sinto-me inspirada pelas mulheres incríveis que vocês se tornaram.

Agradeço também aos meus avós pelas orações e aos meus tios e tias que em diversos momentos da vida foram também meus professores das mais variadas

disciplinas, em especial: Afonso, Ana, Anecy, Mônica, Socorro e Terezinha. Obrigada por todos ensinamentos.

À minha orientadora Sylvia Morais de Sousa, por todas oportunidades que me proporcionou, incluindo realizar minha pesquisa no Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa, participações em congressos nacionais e internacionais, atividades em campo nos mais variados locais e o estágio em docência mais enriquecedor que eu poderia ter feito. Obrigada pela confiança em meu trabalho e por todo conhecimento compartilhado.

Ao Ubiraci Gomes de Paula Lana e Mariana Campolino, agradeço por todo o ensinamento, suporte nos experimentos e pelo tempo dedicado à minha pesquisa. Apesar da pandemia, vocês conseguiram me ajudar com todo cuidado e paciência. Também expresso minha gratidão à Josi Santos, Karine da Costa Bernardino, Samuel Galvão, Simara e Douglas pela amizade sincera e madura, por toda troca, experiências, apoio e pelas contribuições nas análises laboratoriais e estatísticas.

Aos demais pesquisadores, técnicos e analistas da Embrapa Milho e Sorgo, por todo auxílio na condução do trabalho. Em especial: Christiane Abreu de Oliveira Paiva, Flávia Cristina dos Santos, Fabiane Ferreira de Souza, Virgínio Gonçalves e Eliane Aparecida Gomes.

À Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), por fazer parte da minha trajetória, sendo a mesma instituição onde me graduei e tive a oportunidade de lecionar por dois anos. Sou imensamente grata!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Milho e Sorgo, pela estrutura e recursos disponibilizados para a realização dessa pesquisa.

A todos que caminharam ao meu lado e torceram por mim, meu sincero agradecimento.

OLIVEIRA, RAQUEL GOMES (DS). Universidade Federal de São João del-Rei, Setembro de 2024. **Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato na produtividade, arquitetura radicular e microbioma de plantas de milho cultivadas sob diferentes condições de fertilização fosfatada.** Orientadora: Sylvia Morais de Sousa Tinôco. Coorientadoras: Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva e Dra. Flávia Cristina dos Santos.

RESUMO

O uso de bioinoculantes está alinhado com os princípios de intensificação ecológica da agricultura. No entanto, é fundamental entender como esses bioinoculantes afetam as plantas e como influenciam a microbiota do solo em diferentes condições de fertilização. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um bioinoculante composto por duas estirpes de bactérias solubilizadoras de fosfato (*Bacillus subtilis* e *Priestia megaterium*) na produtividade, arquitetura radicular e microbioma da rizosfera de milho em solo argiloso. Um genótipo de milho foi cultivado no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo por duas safras, com e sem inoculação, com superfosfato triplo (STP) ou fosfato de rocha reativo nas doses de 0, 60, 120 e 240 kg de P_2O_5 ha⁻¹. Durante a fase de florescimento, foi avaliada a arquitetura do sistema radicular e a diversidade genética por Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP). Ao final do ciclo, foram avaliadas as características agronômicas, a atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina e macronutrientes. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na produtividade dos grãos entre as duas safras e nem incremento para os tratamentos com inoculação. Os valores de P resina, P total do solo, P foliar, N dos grãos e altura das plantas apresentaram valores significativamente maiores na primeira safra enquanto P e K dos grãos e diâmetro da espiga apresentaram valores significativamente maiores na segunda safra. As características da arquitetura radicular como área, largura e densidade de raízes a 90% de profundidade apresentaram maiores valores na primeira safra e o ângulo da raiz apresentou maior valor na segunda safra. Os índices de diversidade da comunidade microbiana da rizosfera de milho foram maiores na primeira safra. As famílias bacterianas mais abundantes nas duas safras foram Streptomycetaceae, Micrococcaceae, Methylobacteriaceae e Bradyrhizobiaceae e as famílias fúngicas mais abundantes

foram Saccharomycetaceae e Tremellaceae. A atividade enzimática da fosfatase ácida foi maior que fosfatase alcalina nas duas safras. Além disso, a maior atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina na segunda safra coincidiu com os maiores índices pluviométricos. A Análise de Componentes Principais indicou que o tratamento não inoculado e com dose 0 kg ha⁻¹ do fertilizante STP apresentou maior produtividade na segunda safra. A alta concentração de P no solo do campo experimental pode ter contribuído para que o potencial produtivo tenha sido alcançado, não permitindo que a adubação fosfatada e a inoculação tivessem efeitos na promoção de crescimento das plantas de milho e que as diferenças entre as características avaliadas tenham sido melhor observadas entre safras do que entre os tratamentos. Portanto, a eficácia na aplicação de fertilizantes e bioinoculantes está relacionada ao genótipo da planta, à estirpe bacteriana inoculada, ao histórico de práticas de manejo do solo e aos fatores ambientais.

Palavras-Chave: Bioinoculante; diversidade genética; fósforo; *Zea mays*, T-RFLP.

OLIVEIRA, RAQUEL GOMES (DS). Universidade Federal de São João del-Rei, September of 2024. **Effect of inoculation of phosphate-solubilizing bacteria on yield, root architecture and microbiome of maize plants grown under different phosphate fertilization conditions.** Advisor: Dra. Sylvia Moraes de Sousa Tinôco. Co-advisors: Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva e Dra. Flávia Cristina dos Santos.

ABSTRACT

The use of bioinoculants aligns with the principles of ecological intensification in agriculture. However, it is crucial to understand how these bioinoculants affect plants and influence soil microbiota under different fertilization conditions. The aim of this study was to evaluate the effect of a bioinoculant composed of two strains of phosphate-solubilizing bacteria (*Bacillus subtilis* and *Priestia megaterium*) on the yield, root architecture, and rhizosphere microbiome of maize in clay soil. A maize genotype was cultivated at the Embrapa Maize and Sorghum experimental field for two seasons, with and without inoculation, using triple superphosphate (TSP) or reactive rock phosphate at doses of 0, 60, 120, and 240 kg of P_2O_5 ha⁻¹. During the flowering time, the root system architecture and genetic diversity were assessed using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). At the end of the cycle, agronomic characteristics, phosphatases, and macronutrients were evaluated. The results showed no significant difference in grain productivity between the two seasons and no increase in the inoculation treatments. Values of P-resin, total soil P, foliar P, grain N, and plant height were significantly higher in the first season, while grain P and K and ear diameter were significantly higher in the second season. Root system architecture traits such as area, width, and root density at 90% depth were higher in the first season, and the root angle was higher in the second season. The diversity indices of the maize rhizosphere microbial community were higher in the first season. The most abundant bacterial families in both seasons were Streptomycetaceae, Micrococcaceae, Methylobacteriaceae, and Bradyrhizobiaceae, and the most abundant fungal families were Saccharomycetaceae and Tremellaceae. Acid phosphatase enzyme activity was higher than alkaline phosphatase in both seasons. Moreover, the higher enzyme activity of acid and alkaline phosphatases in the second season coincided with higher rainfall indices. Principal Component Analysis indicated

that the non-inoculated treatment with a dose of 0 kg ha⁻¹ of TSP fertilizer had higher productivity in the second season. The high concentration of P in the soil of the experimental field may have contributed to achieving the productive potential, preventing phosphate fertilization and inoculation from having responsive effects on the promotion of maize plant growth. Thus, the differences between the evaluated characteristics were more evident between seasons than between treatments. Therefore, the success of fertilizer and bioinoculant application is related to the plant genotype, the bacterial strain inoculated, the history of soil management practices, and environmental factors.

Keywords: Bioinoculant; genetic diversity; phosphorus; *Zea mays*; T-RFLP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Raízes de milho cultivado na safra 2019/2020 sob diferentes tratamentos	49
Figura 2. Raízes de milho cultivado na safra 2020/2021 sob diferentes tratamentos	50
Figura 3. Perfil baseado no escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) utilizando a matriz de distância de Bray-Curtis para todos tratamentos da safra de 2019/2020 para análise da diversidade genética da comunidade microbiana	54
Figura 4. Perfil baseado no escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) utilizando a matriz de distância de Bray-Curtis para todos tratamentos da safra de 2020/2021 para análise da diversidade genética da comunidade microbiana.....	55
Figura 5. Abundância relativa das famílias da comunidade bacteriana na rizosfera de milho nas safras 2019/2020 (A) e 2020/2021 (B) com uma abundância relativa superior a 3%.....	56
Figura 6. Abundância relativa das famílias da comunidade fúngica na rizosfera de milho nas safras 2019/2020 (A) e 2020/2021 (B) com uma abundância relativa superior a 3%	63
Figura 7. Temperatura mínima (Tmin), temperatura máxima (Tmax) e precipitação (P) (Figura 10A e 10B) e atividade enzimática da fosfatase ácida e alcalina (Figura 10C e 10D) nas safras 2019/2020 (A e C) e 2020/2021 (B e D).	70
Figura 8. Análise de componentes principais (ACP) nas safras 2019/2020 (A) e 2020/2021 (B) para as características de arquitetura radicular.	72
Figura 9. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos de variáveis da planta e do solo sobre a variável básica (produtividade de grãos), na cultura do milho DKB390 avaliada nas safras A: 2019/2020 e B: 2020/2021	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das características das raízes de milho de acordo com Bucksch et al., 2014.....	36
Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) dos dados agronômicos de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.	44
Tabela 3. Dados agronômicos de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2019/2020.	46
Tabela 4. Dados agronômicos de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2020/2021.	47
Tabela 5. Características da arquitetura sistema radicular do milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.	51
Tabela 6. Valores médios das características agronômicas do milho nas safras 2019/2020 e 2020/2021.	52
Tabela 7. Valores médios das características da arquitetura do sistema radicular (ASR) do milho nas safras 2019/2020 e 2020/2021.....	53
Tabela 8. Famílias bacterianas mais abundantes na rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2019/2020	58
Tabela 9. Famílias bacterianas mais abundantes na rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de	

fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2020/2021... 59

Tabela 10. Comparativo da abundância relativa (AR) das famílias bacterianas da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado sob fertilização com fosfato de rocha (FNR) ou superfosfato triplo (STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021... 60

Tabela 11. Índices de diversidade de Shannon, Simpson e Chao das famílias bacterianas da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021... 61

Tabela 12. Valores médios dos índices de diversidade de Shannon, Simpson e Chao das famílias bacterianas da rizosfera de milho nas safras 2019/2020 e 2020/2021... 62

Tabela 13. Famílias fúngicas mais abundantes da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.... 65

Tabela 14. Comparativo da abundância relativa (AR) das famílias fúngicas entre as safras 2019/2020 e 2020/2021..... 66

Tabela 15. Índices de diversidade de Shannon, Simpson e Chao das famílias fúngicas da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021..... 67

Tabela 16. Valores médios dos índices de diversidade de Shannon, Simpson e Chao das famílias fúngicas da rizosfera de milho nas safras 2019/2020 e 2020/2021..... 67

Tabela 17. Atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina no solo da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021..... 68

Tabela 18. Comparação entre safras da atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina para os diferentes tratamentos avaliados.....	69
Tabela 19. Contribuição das características da arquitetura do sistema radicular (ASR), diversidade genética de microrganismos e produtividade de milho nas safras 2019/2020 e 2020/2021	73
Tabela S1. Análise de variância (ANOVA) das características do sistema radicular de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.	101
Tabela S2. Valor médio das características do sistema radicular de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra de 2019/2020	102
Tabela S3. Valor médio das características do sistema radicular de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra de 2020/2021	103
Tabela S4. Análise de variância (ANOVA) das famílias bacterianas mais abundantes da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2019/2020.	104
Tabela S5. Análise de variância (ANOVA) das famílias bacterianas mais abundantes da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2020/2021	105
Tabela S6. Análise de variância (ANOVA) das famílias fúngicas mais abundantes da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha ⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021	106

Tabela S7. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos de variáveis da planta e do solo sobre a variável básica (produtividade de grãos), na cultura do milho DKB390 avaliada nas safras 2019/2020 e 2020/2021.	107
---	-----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3. OBJETIVOS	33
4. METODOLOGIA	34
5. RESULTADOS	43
6. DISCUSSÃO	76
7. CONCLUSÃO	81

1. INTRODUÇÃO

O milho é um cereal de importância econômica mundial, utilizado como ração animal, alimento humano e matéria-prima para uma variedade de produtos industriais (García-Lara; Serna-Saldivar, 2019). Na safra 2018/2019, o Brasil foi o terceiro maior produtor mundial de milho, com produção de 100,04 milhões de toneladas e 104 milhões de toneladas na safra 2019/2020. Para a safra 2020/2021 a produção total foi de 108,1 milhões de toneladas, ou seja, aumento de 5,4% em relação à safra anterior. Estima-se que a produção de milho seja de 117,6 milhões de toneladas na safra 2023/2024 (CONAB, 2024).

No entanto, apesar do Brasil apresentar uma crescente produção deste cereal, a maior parte dos solos brasileiros apresentam baixa fertilidade natural, baixo pH e alta saturação de alumínio (Al). O suprimento inadequado de nutrientes, incluindo o fósforo (P), é um dos principais fatores limitantes da produtividade dos cereais. A baixa concentração de P disponível às plantas é frequentemente observada em solos tropicais altamente intemperizados e ácidos (Sánchez e Salinas 1981; Goedert, 1983). Isso pode ser atribuído ao fato de o material de origem dos solos ser pobre neste nutriente, somado à elevada adsorção de fosfato por minerais, como óxidos de ferro (Fe) e Al, nos solos argilosos (Fontes e Weed, 1996; López-Arredondo et al., 2014). Assim, para sustentar a agricultura moderna, uma grande quantidade de fosfato é utilizada na produção de fertilizantes.

As principais fontes de P utilizadas na agricultura brasileira são os superfosfatos e os fosfatos de amônio (Muraoka et al., 2002). Os fertilizantes solúveis são utilizados, normalmente, em elevadas quantidades e apresentam rápida dissolução, favorecendo a absorção pelas plantas, mas podendo também favorecer a interação do elemento com o solo, o que, neste caso, pode reduzir a disponibilidade de P às plantas. Por outro lado, a aplicação excessiva de fertilizantes sintéticos implica em questões importantes sobre sustentabilidade (Tabassum et al., 2017), uma vez que pode contribuir para o acúmulo de nutrientes nos corpos d'água, acelerando o processo de eutrofização (López-Arredondo et al., 2014).

Além de gerar um impacto ambiental negativo quando utilizados em excesso, os fertilizantes fosfatados sintéticos, apresentam um elevado custo, principalmente para pequenos agricultores nos países em desenvolvimento (Wardyn; Russell, 2004). Uma alternativa ao uso de fertilizantes sintéticos é a utilização de fosfatos naturais, que apresentam baixa reatividade, em especial no ano da aplicação. Entretanto, ao longo dos cultivos, a disponibilidade de P pode ser aumentada pela contribuição da microbiota do solo ou pelo uso dos inoculantes microbianos (Zongzheng et al., 2009; Ekundayo et al., 2011; Mendes et al., 2014; Ribeiro et al., 2018).

Inoculante microbiano é todo produto que contém microrganismos favoráveis ao crescimento das plantas. Uma categoria específica desses microrganismos são as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) que atuam liberando reguladores de crescimento e apresentam mecanismos de fixação de nitrogênio (N) e solubilização de P garantindo a disponibilidade e a absorção desses nutrientes. Deste modo, a interação benéfica planta-microrganismo representa uma solução sustentável promissora para a produção agrícola comparada ao uso de fertilizantes sintéticos (Tabassum et al., 2017; Nazir et al., 2018). Os microrganismos capazes de aumentar a disponibilidade de P para as plantas são denominados microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) que incluem espécies de bactérias e alguns fungos filamentosos (Tabassum et al., 2017; Etesami; Maheshwari, 2018).

Em 2019, a Embrapa e a empresa Bioma lançaram um inoculante solubilizador de fosfato para a cultura do milho, chamado BiomaPhos® (<https://www.bioma.ind.br/product/bioma-phos>). Este produto é formulado com estirpes de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119), sendo esta última recentemente nomeada como *Priestia megaterium* (Gupta et al., 2020). As bactérias do bioinoculante fazem parte da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos (CMMF) da Embrapa Milho e Sorgo sendo que a estirpe B119 foi isolada da rizosfera e a estirpe B2084 da endosfera foliar de genótipos de milho tropical (Oliveira et al., 2009; Abreu et al., 2017). Essas bactérias se associam à planta desde o início da formação das raízes e produzem ácidos orgânicos que atuam na porção do solo que se encontra em contato com as raízes das plantas, iniciando assim o processo de solubilização do P que está retido ao Al e ao Fe presentes no solo, deixando-o disponível para a absorção e a assimilação pela planta

(Bioma, 2020; Paiva et al., 2020; Sousa et al., 2020). Essa tecnologia é capaz de aumentar a absorção de P pelas plantas, o que resulta em aumento de produtividade do milho de até 24% (Oliveira-Paiva et al., 2024), contribuindo na mudança do quadro de alta dependência brasileira do mercado internacional de fertilizantes (Oliveira-Paiva et al., 2020).

No entanto é necessário conhecer o efeito do bioinoculante na planta e na microbiota do solo em diferentes condições de fertilização fosfatada. Para isso, algumas técnicas moleculares para a avaliação de comunidades microbianas complexas, como as comunidades da rizosfera das plantas, podem ser utilizadas. A técnica polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição terminal (T-RFLP) pode ser usada para avaliar a diversidade de microrganismos e os efeitos da variação espacial e temporal na estrutura das comunidades microbianas (Liu et al., 1997). O T-RFLP continua a ser amplamente utilizado por sua simplicidade, baixo custo e independência do cultivo de microrganismos, permitindo o monitoramento do efeito de inoculantes bacterianos nas comunidades da rizosfera do milho (Kari et al., 2019).

Dentro deste contexto, esse trabalho visou avaliar o impacto da inoculação com bactérias solubilizadores de fosfato na microbiota da rizosfera e na arquitetura radicular de milho cultivado em diferentes condições de fertilização fosfatada em solo argiloso.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CULTURA DO MILHO NO BRASIL

Em termos de tamanho da área cultivada e da produção, os cereais apresentam elevada importância mundial, sendo consumidos como alimento humano e animal e nas indústrias de papel e energia (Silva et al., 2017; Olanrewaju e Olubukola, 2019). O milho é um dos cereais mais nutritivos e versáteis e um dos principais grãos produzidos pelo Brasil, que se destaca como seu terceiro maior produtor e seu segundo maior exportador. Dessa forma, a cadeia produtiva do milho é de suma importância para o país uma vez que traz desenvolvimento social e econômico (CONAB, 2024).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), houve uma produção recorde de 131,9 milhões de toneladas de milho para a safra 2022/2023. Na safra 2023/2024, as adversidades climáticas, como ondas de calor e a má distribuição das chuvas provocadas pelo “El Niño” resultaram em uma redução na produção. Ainda assim, os dados da demanda doméstica de milho apontam que 84,5 milhões de toneladas de milho deverão ser consumidos internamente ao longo de 2024, ou seja, um aumento de 6,1% comparado à safra anterior (CONAB, 2024).

A agricultura brasileira é responsável pela produção de grãos de milho para milhões de pessoas e para uso na fabricação de ração animal. Para atender à crescente demanda por milho, é preciso aumentar a produção agrícola. No entanto, uma questão econômica e ambiental associada à expansão e intensificação da agricultura brasileira é o aumento substancial no uso de fertilizantes sintéticos para sustentar o rendimento das culturas, pois apesar dos avanços recentes na biotecnologia, o principal fator limitante para o aumento da produção agrícola é a disponibilidade de nutrientes no solo (Muraoka et al., 2002; Pavinato et al., 2020).

2.2. FERTILIZAÇÃO FOSFATADA NA AGRICULTURA BRASILEIRA

O fósforo (P) é um dos nutrientes mais importantes para o crescimento e o metabolismo das plantas desempenhando um papel importante na síntese de DNA, componentes da membrana celular (fosfolípidios), trifosfato de adenosina (ATP),

respiração e fotossíntese. O P está presente no solo em duas formas, P inorgânico e P orgânico. O P inorgânico geralmente existe como fosfatos solúveis e insolúveis. O P insolúvel inclui principalmente os fosfatos de alumínio (Al-P), ferro (Fe-P), magnésio (Mg-P) e fosfato de cálcio (Ca-P), enquanto o P solúvel existe principalmente como íons hidrogenofosfato e dihidrogenofosfato (HPO_4^{2-} e H_2PO_4^-). O P orgânico inclui principalmente compostos orgânicos contendo P, como monoésteres de ortofosfato, diésteres de ortofosfato e polifosfatos orgânicos. O suprimento de P para as plantas se dá essencialmente via sistema radicular e depende da capacidade de fornecimento do solo. Assim, embora o solo contenha uma grande quantidade de P, ele geralmente existe em uma forma que não pode ser utilizada diretamente pelas plantas (Novais e Smyth, 1999; López-Arredondo et al., 2014).

A baixa disponibilidade de P é uma grande restrição para a produção agrícola em diversas regiões do mundo. Em alguns solos nas regiões tropicais o conteúdo total de P pode ser alto (200-800 mg kg⁻¹), porém apenas uma pequena quantidade de P em solução está prontamente disponível para as plantas e sua concentração é geralmente inferior ao necessário para crescimento vegetal, em torno 0,1 mg L⁻¹. Isso ocorre devido a predominância de solos altamente intemperizados, à baixa solubilidade dos compostos fosfatados e alta capacidade de adsorção de fosfato. Uma fração substancial do P total do solo (30-65%) está presente em compostos orgânicos, que podem variar de prontamente disponível (lábil) a não disponível (não lábil) para plantas. Além disso, a disponibilidade de P sofre influência dos teores de argila, de óxidos (Fe e Al) e matéria orgânica nos solos (Pavinato et al., 2021).

A produção em larga escala de milho e outros grãos no Cerrado brasileiro tornou-se viável após o desenvolvimento de tecnologias de melhoria da fertilidade dos solos na região, que visavam a suplementação mineral de P e outros nutrientes. Assim, o uso de fertilizantes fosfatados aumentou expressivamente uma vez que a taxa de recuperação do nutriente pelas plantas é baixa, resultando em uma eficiência de utilização do fertilizante fosfatado de apenas 10–25%. Portanto, grandes quantidades do nutriente devem ser fornecidas nas adubações para atender aos requerimentos nutricionais das culturas (Pang et al., 2024; Resende et al., 2006). A baixa taxa de recuperação do P se deve ao fato de que depois de aplicado nos solos, o P pode ser fixado por adsorção às partículas de argila do solo ou precipitado por

alumínio livre (Al^{+3}) e ferro (Fe^{+3}) em condições de pH mais baixo, ou cálcio (Ca^{+2}) em condições de pH mais elevados, reduzindo a disponibilidade do nutriente para o vegetal (Bedin et al., 2003; Vance et al., 2003; Pavinato et al., 2021).

O crescimento da demanda por fertilizantes fosfatados tem levado ao aumento na diversidade dos fertilizantes produzidos a partir das rochas fosfatadas, que após o processo de fabricação apresentam rotas de produção diferenciadas (Mccauley et al., 2009). Na agricultura brasileira predomina o uso dos fertilizantes fosfatados solúveis em água, obtidos pelo tratamento de rochas fosfatadas com ácidos, como os superfosfatos e os fosfatos de amônio. Para obtenção dos superfosfatos, o tratamento das rochas fosfatadas é realizado com o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido fosfórico (H_3PO_4). O fosfato de amônio é obtido a partir da reação do ácido fosfórico com amônia (Prochnow et al., 2001; Muraoka et al., 2002; Resende et al., 2006; Benedito et al., 2010). Por possuírem maior solubilidade, quando aplicados ao solo, esses fertilizantes liberam prontamente o P, favorecendo a absorção e o aproveitamento do nutriente pelas culturas de ciclo curto (rápido crescimento). Por outro lado, a rápida dissolução favorece a adsorção e precipitação do P pelos componentes do solo, originando compostos fosfatados de baixa solubilidade e reduzindo a disponibilidade para as plantas (Bedin et al., 2003; Resende et al., 2006; Benedito et al., 2010).

Nos sistemas agrícolas, a escolha dos fertilizantes fosfatados baseia-se na eficiência em suprir o nutriente para as plantas e também na relação custo/benefício da adubação. Assim, o elevado custo de produção dos fosfatos solúveis incentivou a utilização de fontes alternativas de P, como dos fosfatos naturais que são obtidos por meio da moagem da rocha fosfatada e apresentam custos por unidade de P mais baixos que os fosfatos solúveis. Por outro lado, esses fertilizantes apresentam baixa disponibilidade de P para as plantas que possuem alta demanda pelo nutriente em um curto espaço de tempo e, além disso, apresentam graus distintos de reatividade no solo de acordo com as características intrínsecas das rochas nas quais são obtidos, influenciando a eficiência agronômica da fertilização (Resende et al., 2006; Foloni et al., 2008; Benedito et al., 2010).

Existe uma preocupação global em relação aos custos envolvidos na mineração do fosfato rochoso e seu transporte dos locais de fabricação para os

campos agrícolas. Para o milho, em sistemas mais tecnificados, os gastos com a fertilização fosfatada representam parte considerável do custo das lavouras na região do Cerrado e variam de acordo com a fonte de P utilizada e com prazo considerado para o retorno do investimento. Além disso, os fertilizantes são derivados de fosfato de rocha que possui um suprimento finito, o que significa que com o aumento da demanda mundial de fertilizantes fosfatos de alta qualidade, estes se tornarão mais restritos e as reservas restantes de P terão qualidade cada vez menor e custos cada vez mais altos para o processo de extração (Qarni et al., 2021; Tonini et al., 2019).

Além do custo associado à fertilização fosfatada, o uso indevido de P na agricultura tem importantes consequências ambientais. A aplicação excessiva do nutriente aumenta o risco de perda do P por escoamento superficial no solo, atingindo os corpos d'água e, consequentemente, acelerando o processo de eutrofização (George et al., 2016; Zhu et al., 2018). Como alternativa sustentável para a agricultura, os bioinoculantes e fertilizantes biológicos, incluindo microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) podem atuar nos fosfatos insolúveis do solo e liberar o P na forma absorvível pelas raízes das plantas (Sharma et al., 2013; Ribeiro et al., 2018).

2.3. INOCULANTES MICROBIANOS OU BIOINOCULANTES

A rizosfera é definida como a região do solo e sua biota residente, juntamente com suas interações, que são influenciadas pelas raízes das plantas (Orozco-Mosqueda et al., 2022). É um ambiente com elevada concentração de nutrientes, o que favorece o crescimento de microrganismos. A rizosfera suporta altas taxas de crescimento microbiano devido ao aumento da disponibilidade de compostos orgânicos solúveis (monômeros de carboidratos, açúcares e aminoácidos) secretados pela exsudação das raízes das plantas. Os microrganismos rizosféricos são geralmente dotados de um amplo espectro de características promotoras do crescimento das plantas podendo ser utilizados na formulação de inoculantes microbianos (Vessey, 2003; Calvo et al., 2014; Tabassum et al., 2017; Nazir et al., 2018; Hassan et al., 2019).

Um inoculante microbiano é um produto que contém microrganismos isolados do solo ou também de plantas, resíduos vegetais e água, e que são aplicados a sementes ou no solo com intuito de estimular os processos naturais de

desenvolvimento das plantas. A maioria dos inoculantes são formulados com bactérias promotoras de crescimento de planta (BPCPs), o que oferece uma solução alternativa ao uso excessivo de fertilizantes sintéticos para aumentar a produtividade das culturas de maneira sustentável (Bashan et al., 2014; Calvo et al., 2014; Maheshwari et al., 2014; Kari et al., 2019).

As BPCPs promovem o crescimento das plantas por meio de mecanismos diretos e indiretos. Nos mecanismos diretos, as bactérias liberam reguladores de crescimento e outras substâncias que afetam diretamente o metabolismo das plantas, como os fitohormônios auxina, giberelina e citocinina. A capacidade de fornecer nutrientes ou favorecer sua absorção também fazem parte da promoção direta de crescimento, como a fixação de N, solubilização de fosfato e sequestro de Fe por sideróforos. Nos mecanismos indiretos as bactérias previnem ou reduzem os efeitos deletérios dos patógenos vegetais (Piromyou et al., 2011; Nazir et al., 2018; Kari et al., 2019).

Dentre os exemplos de mecanismos diretos de promoção de crescimento de plantas, as três estirpes solubilizantes de fosfato, *B. endophyticus*, *B. sphaericus* e *Enterobacter aerogenes* isoladas da rizosfera da cana e duas estirpes, *B. safensis* e *P. megaterium* isoladas da rizosfera do trigo apresentaram capacidade de solubilização do fosfato e contribuíram para o aumento do crescimento do trigo (Mukhtar et al., 2017). As rizobactérias *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, *Aeromonas* sp. e *Pseudomonas* sp. apresentaram os dois tipos de mecanismos sendo capazes de produzir sideróforos e também forte inibição do fitopatógeno *Fusarium solani* (Kumar et al., 2018). Dentre os mecanismos indiretos, por exemplo, *Bacillus subtilis* possui efeito inibitório sobre *Rhizoctonia solani* e outros seis patógenos fúngicos de plantas (Tan et al., 2019). *Paenibacillus* sp. em coinoculação com *Arthrobacter agilis* apresentaram eficiência na proteção contra *Mycosphaerella graminicola*, o agente causal da mancha foliar no trigo (Samain et al., 2023).

Outros microrganismos do solo foram relatados como BPCPs e benéficos ao crescimento de plantas como, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Variovovax*, *Xanthomonas* e *Phyllobacterium* (Bashan et al.,

2014; Nazir et al., 2018). Dentro dessas comunidades microbianas existem estirpes essenciais para a ciclagem do P, nutriente vital necessário para o crescimento das plantas. Esses microrganismos atuam especialmente no processo de solubilização de P insolúvel para absorção do nutriente pelas plantas (Bi et al., 2022).

2.3.1. Microrganismos solubilizadores de fosfato

Os microrganismos conhecidos por aumentarem a disponibilidade de P para as plantas, devido à atividade solubilizadora, são frequentemente denominados microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) que incluem bactérias das espécies *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Burkholderia* e *Bacillus* além de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Os MSF promovem a conversão das formas inorgânicas insolúveis de P em P solúvel por meio da produção de ácidos orgânicos e a dissolução das formas orgânicas de P ocorrem por meio da secreção de enzimas como fosfatase, fosfohidrolase e fitase. Os MSF também auxiliam as plantas na absorção de P fora da rizosfera, desempenhando um papel importante no processo de aquisição de P pelas plantas (Etesami e Maheshwari, 2018; Pang et al., 2024; Qarni et al., 2021; Tian et al., 2021).

Os MSF produzem ácidos orgânicos como os ácidos glucônico, lático, cítrico e oxálico por secreção fisiológica e/ou decomposição da matéria orgânica. Os ácidos produzidos possuem a capacidade de aumentar a disponibilidade de P para a planta transformando o P inorgânico insolúvel em uma forma assimilável. O mecanismo de solubilização do P se baseia na competição dos ânions dos ácidos orgânicos com os íons fosfato pelos locais de ligação nas partículas do solo, reduzindo assim a adsorção de íons fosfato no solo e aumentando o teor efetivo de P no solo (Rawat et al., 2021).

Os fosfatos orgânicos constituem 20–30% do P total do solo e, para que o P orgânico possa ser utilizado pelas plantas ele precisa ser mineralizado em P inorgânico. A hidrólise enzimática é a principal forma de mineralizar o P orgânico sob condições de baixo teor de P disponível. As fosfatases constituem um vasto grupo de enzimas responsáveis pela catalisação da hidrólise de ésteres e anidridos do ácido fosfórico (H_3PO_4). Essas enzimas são categorizadas em fosfomonoesterases, fosfodiesterases e fosfotriesterases. Dentro da categoria das fosfomonoesterases, há uma subdivisão baseada no pH ótimo de atuação das enzimas, sendo classificadas

em fosfatase ácida (com pH ótimo de 6,5) e fosfatase alcalina (com pH ótimo de 11). A fosfatase ácida é produzida tanto por plantas quanto por microrganismos, enquanto a fosfatase alcalina é principalmente de origem microbiana. Estas enzimas desempenham um papel crucial na hidrólise das ligações éster-fosfato presentes no fosfato orgânico insolúvel, facilitando a liberação de fosfato e sua subsequente absorção pelas plantas. As fitases, um tipo específico de fosfomonoesterase, são especializadas na hidrólise de ligações fosfomonoéster do fitato, um composto orgânico abundante no solo que é uma importante fonte de inositol e fosfato armazenados nas sementes (Sharma et al. 2013, Pang et al. 2024, Rawat et al. 2021, Tian et al. 2021, Zhu et al. 2018).

Além da solubilização de P, muitos MSF também são capazes de aumentar a tolerância das plantas a vários estresses abióticos, incluindo a seca, frio, metais pesados e sal (Pang et al., 2024). Neste contexto, sabe-se que existe um interesse crescente à exploração de recursos biológicos, nomeadamente, microrganismos da rizosfera, uma vez que representam uma biotecnologia aliada a sustentabilidade para otimizar a absorção de nutrientes e consequentemente o crescimento e produtividade das plantas (Benmrid et al., 2023). Por outro lado, é necessária uma melhor investigação a respeito do impacto da inoculação na comunidade microbiana nativa da rizosfera e nas plantas.

2.4. IMPACTO DA INOCULAÇÃO NO RIZOBIOMA E NA ARQUITETURA RADICULAR DAS CULTURAS

Embora inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) tenham sido utilizados nas culturas por mais de 120 anos, a eficácia inconsistente desses produtos, especialmente em condições de campo, impede a adoção de inoculantes microbianos como prática agrícola padrão em todo o mundo. O funcionamento de inoculantes microbianos em condições de campo é afetado pelo tipo de solo e genótipo da planta, bem como pelas estirpes de BPCPs utilizadas na formulação dos produtos além dos vários fatores bióticos e abióticos não controlados que podem trabalhar contra a sobrevivência dos microrganismos introduzidos. Além disso, os inoculantes podem ser incompatíveis com outros produtos aplicados nas

lavouras. Deste modo, para utilizar inoculantes microbianos em condições de campo é crucial identificar as funções benéficas dos microrganismos para as plantas, analisar sua compatibilidade com outros produtos utilizados nas lavouras, avaliar seus efeitos na microbiota vegetal nativa, entender sua persistência e realizar a seleção de agentes de bioinoculação bem-sucedidos no futuro (Ferrarezi et al., 2022; Orozco-Mosqueda et al., 2022; Renoud et al., 2022).

Um dos gêneros mais comumente usados em inóculos microbianos é o *Bacillus*. Este é um dos gêneros de BPCP mais versáteis, pois além de promover o crescimento das plantas e aumentar a produtividade das culturas, é capaz de solubilizar potássio e fósforo e de proteger as plantas contra patógenos. Estirpes de *Bacillus* possuem também a capacidade de formar esporos resistentes ao estresse causado por calor ou dessecação, aumentando assim sua adaptação à aplicação em campo e otimizando a formulação comercial de bioinoculantes. No entanto, os efeitos dos bioinoculantes contendo *Bacillus* sobre a comunidade no solo da rizosfera ou sobre a arquitetura radicular de plantas como o milho não são totalmente esclarecidos (Sousa et al., 2020; Jensen et al., 2024; Zhao et al., 2023).

Uma melhor compreensão das consequências da adição de inoculantes formulados com *Bacillus* nas culturas é necessária. O efeito da inoculação de seis estirpes de *Bacillus*, sendo elas *B. subtilis* (B2084, B1920 e B70), *B. megaterium* (B119), *B. pumilus* (B32) e *B. thuringiensis* (B116), foi analisado por Sousa et al. (2020) no crescimento e morfologia da raiz de milho cultivado em hidroponia visando selecionar as estirpes potenciais para experimentos em campo. Os resultados indicaram que plantas de milho inoculadas com estirpes de *Bacillus* capazes de produzir moléculas semelhantes ao ácido indolacético (AIA) e solubilizar fósforo apresentaram sistema radicular aumentado. As plantas inoculadas com as estirpes B2084 e B119 apresentaram maior área de superfície radicular em relação as não inoculadas.

Diferentes biofertilizantes contendo *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* ou uma combinação das três estirpes foram utilizados por Wang et al. (2021) visando avaliar o impacto da inoculação nas propriedades físicas e químicas do solo e na composição bacteriana da rizosfera do milho. A aplicação de *B.*

licheniformis ou *B. amyloliquefaciens* aumentou os teores de matéria orgânica do solo (MOS), nitrogênio total, fósforo total, fósforo disponível e potássio disponível do solo da rizosfera de milho indicando que as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas estimularam a produção de exsudados de raízes, o que aumentou o recrutamento de comunidades benéficas devido aos açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas e polímeros disponíveis. A rizosfera do milho tratado com *B. subtilis* apresentou a maior diversidade e riqueza da comunidade bacteriana comparado ao tratamento com as estirpes bacterianas combinadas. Esses resultados sugerem que diferentes tratamentos com bioinoculantes podem impactar de maneiras variadas a diversidade da comunidade bacteriana na rizosfera das plantas.

O impacto da inoculação individual e mista das bactérias *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* foi avaliada em raízes de brócolis (*Brassica oleracea* L.) mostrando alterações nas comunidades bacterianas endofíticas de acordo com cada espécie inoculada (Gadhav et al., 2018). A inoculação com *Bacillus subtilis* NCD-2 em tomate, berinjela, pimenta, algodão e milho mostrou que a estruturas das comunidades microbianas na rizosfera das diferentes culturas foram significativamente diferentes, indicando que o microbioma da rizosfera é dependente da espécie vegetal. Além disso, a abundância relativa de genes funcionais para transporte e metabolismo de aminoácidos, coenzimas, lipídios, íons inorgânicos e os mecanismos de defesa foi enriquecida principalmente nas rizosferas de pimenta e berinjela (Zhao et al., 2023).

O efeito induzido de *Bacillus pumilus* em plantas de milho em solo contaminado com cádmio (Cd) foi avaliado por Shahzad et al. (2021) e as sementes inoculadas aumentaram significativamente a porcentagem de germinação, altura das plantas, comprimento das folhas e número de folhas. *Bacillus pumilus* também aumentou o peso fresco do milho ao produzir fitohormônios como o ácido indolacético (AIA) resultando também no maior comprimento da raiz da planta.

Ainda não está claro como as BPCPs influenciam a comunidade bacteriana do solo e as funções ecológicas relacionadas. Assim, para melhor compreensão dos efeitos diferenciados que os inoculantes têm no microbioma da rizosfera de plantas,

técnicas moleculares podem ser utilizadas para monitoramento destas comunidades e para avaliar o efeito de diferentes tratamentos como fertilização e inoculação (Cunha et al., 2024; Lahlali et al., 2021)

2.4.1. Uso do Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP) para monitoramento das comunidades microbianas na rizosfera de plantas

As abordagens metagenômicas podem explorar a diversidade funcional e estrutural das comunidades microbianas do solo (Dubey et al., 2020). O efeito da inoculação com microrganismos pode ser mensurado por diferentes técnicas, como sequenciamento de alto rendimento (SAR), que reflete a diversidade taxonômica e identifica espécies dentro de uma comunidade microbiana (Karczewski et al., 2017) e pelo Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição Terminal (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* - T-RFLP) (Liu et al., 1997). O sequenciamento de nova geração (SNG) é uma técnica que vem sendo utilizada para avaliar os efeitos nas comunidades microbianas da rizosfera (Samain et al., 2023, Ferrarezi et al., 2023). O SNG possui um grande potencial para revelar a diversidade das comunidades microbianas do solo uma vez que permite investigações sobre um habitat específico, com alta precisão e gerando uma enorme quantidade de dados (Lahlali et al., 2021).

Embora várias técnicas de sequenciamento como SNG tenham surgido nos últimos anos, o T-RFLP ainda é amplamente utilizado devido a sua simplicidade, custo reduzido e independência de cultivo dos microrganismos. A comparação dos dados do resultado do T-RFLP com os dados do sequenciamento de alto rendimento para avaliar a diversidade e composição de comunidades microbianas em ecossistemas de águas subterrâneas mostrou que a análise do T-RFLP produziu resultados com resolução semelhante, indicando ser útil para triagem de amostras antes do uso de técnicas mais sensíveis e mais caras (Karczewski et al., 2017; Campolino et al., 2022).

O T-RFLP é um método molecular desenvolvido por Liu et al. (1997), aplicado ao estudo da ecologia de microrganismos em sistemas complexos, como o solo. Além disso, é um método reproduzível, robusto e produz um perfil da comunidade, *fingerprinting* (ou “impressões digitais”) que reflete a composição das populações

numericamente dominantes em uma amostra (Liu et al., 1997; Osborn et al., 2000; Caffaro-Filho et al., 2007; Shyu et al., 2007). É caracterizado como uma técnica que visa avaliar a diversidade microbiana e comparar a estrutura comunitária de bactérias em diferentes ambientes permitindo estudar mudanças estruturais na rizosfera da comunidade microbiana sob diferentes condições, incluindo fertilização fosfatada (Campolino et al., 2021), monitorar membros de inoculantes bacterianos tolerantes ao estresse e determinar os efeitos de inoculantes biológicos no microbioma do solo (Kari et al., 2019).

As etapas da análise T-RFLP incluem (1) a coleta da amostra e extração do DNA da comunidade microbiana do solo, (2) amplificação do DNA por PCR utilizando oligonucleotídeos marcados com fluorescência, (3) limpeza de produtos de PCR para remover sais e iniciadores, (4) digestão com endonucleases de restrição capazes de reconhecer sequências específicas de bases na fita dupla de DNA e que clivam em pontos específicos, produzindo diferentes fragmentos terminais (T-RFs), apropriados para o dimensionamento em sistemas de (5) eletroforese automatizados, e (6) análise comparativa com dados de análises *in silico* de bancos de dados para inferir a composição potencial de espécies das amostras (Liu et al., 1997; Tiedje et al., 1999; Osborn et al., 2000).

O método baseia-se na variação da posição dos locais de restrição entre as sequências de DNA e na determinação do comprimento dos T-RFs marcados com fluorescência por eletroforese em gel. Assumindo que cada espécie presente na amostra possua diferenças na sequência gênica amplificada, o T-RF terá um comprimento diferente e pode, portanto, ser separado por eletroforese em gel. Assim, cada banda fluorescente corresponde a uma única população e a intensidade de cada banda é diretamente proporcional à quantidade do produto de PCR, o que fornece uma indicação aproximada da abundância da população na comunidade (Junior et al., 2002; Forney et al., 2004).

Os perfis gerados podem variar de duas maneiras. Primeiro, pode haver variação no número e tamanho (em pares de bases) de T-RFs presentes no perfil e em segundo lugar, a variação pode ser encontrada na altura (e consequentemente na área) de qualquer pico específico. A observação de diferentes picos é indicativa da

presença de fragmentos de diferentes comprimentos, e a abundância relativa de cada fragmento é refletida pela área sob os picos no eletroferograma. É importante ressaltar que os dados são passíveis de análise usando vários métodos estatísticos, como índices de similaridade, algoritmos de agrupamento hierárquico, análises de componentes principais e mapas auto-organizados (Osborn et al., 2000; Forney et al., 2004; Caffaro-Filho et al., 2007).

A técnica de T-RFLP foi utilizada em diferentes estudos sobre a comunidade microbiana. Campolino et al. (2022) avaliaram a diversidade α e β da microbiota da rizosfera de genótipos de milho e sorgo cultivados sob diferentes fontes e doses de fertilizantes fosfatados e seus resultados sugerem que a reatividade da fonte de fósforo é o fator predominante nas estruturas da comunidade bacteriana na rizosfera de milho e sorgo dos genótipos avaliados.

Um sistema de monitoramento de T-RFLP baseado no gene 16S rRNA foi desenvolvido por Kari et al. (2019) a fim de estimar especificamente as mudanças de abundância relativa de membros de inoculantes bacterianos comercializados adaptados ao estresse em ensaios de campo aberto. A partir dessa análise os autores conseguiram distinguir os membros de inoculantes bacterianos comercializados, monitorar as mudanças de abundância relativa do inoculante aplicado e detectar o efeito do inoculante na estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera.

O T-RFLP também foi usado por Chen et al. (2018) para compreender as consequências de diferentes níveis de nitrogênio na estrutura da comunidade microbiana das culturas sob consórcio milho/amendoim. Assim, o T-RFLP pode ser utilizado para fornecer dados quantitativos sobre mudanças na abundância relativa de diferentes táxons bacterianos e grupos funcionais para biomonitoramento de comunidade bacteriana altamente diversa.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito de um bioinoculante formulado com bactérias solubilizadoras de fosfato na produtividade, arquitetura radicular e na microbiota da rizosfera de plantas de milho em diferentes condições de fertilização fosfatada em solo argiloso.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o impacto de um bioinoculante com bactérias solubilizadoras de fosfato na produtividade do milho.

Analisar a arquitetura radicular do milho cultivado em campo com um bioinoculante com bactérias solubilizadoras de fosfato sob diferentes fontes e doses de fosfato.

Avaliar o efeito de um bioinoculante com bactérias solubilizadoras de fosfato na diversidade genética da comunidade bacteriana e fúngica da rizosfera de milho.

4. METODOLOGIA

4.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados na Estação Experimental da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil (latitude 19°28'S, longitude 44°15'W e altitude de 732 metros). O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distroférrico (Latossolo Vermelho), com textura argilosa (66% de argila, 11% de areia e 23% de silte), sob vegetação de Cerrado. Antes da instalação do experimento com a cultura do milho em 2019, a área estava em pousio, no entanto, a área possui alta fertilidade devido aos efeitos residuais de adubação em experimentos anteriores, sendo considerada uma área de fertilidade construída.

A amostragem do solo foi feita antes do plantio em dezembro de 2019 na profundidade de 0-20 cm e avaliada pelo Laboratório de Análise de Solo, Tecido Vegetal e Fertilizante do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. A acidez potencial (H+Al) foi extraída com solução de acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ tamponado a pH 7,0. A avaliação do pH foi feita em água, KCl e CaCl (Relação 1:2,5). Ferro (Fe), Fósforo (P) e Potássio (K) foram avaliados por extrator Mehlich⁻¹. Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg) foram avaliados por extrator KCl (1 mol/L) e o método Walkley-Black foi utilizado na determinação da matéria orgânica (MO). Os parâmetros do solo medidos de 0-20 cm, foram: pH = 6,02, H+Al = 5,8 cmol_c dm⁻³, cálcio (Ca) = 5,51 cmol_c dm⁻³, Fe = 33 cmol_c dm⁻³, Mg = 1,24 cmol_c dm⁻³, P = 21,7 mg dm⁻³, K = 177 mg dm⁻³ e MO = 44,8 g dm⁻³.

Os experimentos de campo foram conduzidos em duas safras (2019/2020 e 2020/2021) com o genótipo de milho DKB390 (Dekalb). Os fertilizantes utilizados foram o superfosfato triplo (STP) contendo 41% de P₂O₅ total (granulado) e o fosfato natural de rocha reativo em pó (FNR) proveniente do “*Office Chérifien des Phosphates*” (OCP) contendo 32% de P₂O₅ total dos quais 3,7% solúveis em ácido cítrico. Os tratamentos foram dispostos em fatorial 2x2x4, sendo com e sem inoculação na semente com BiomaPhos® (fornecido pela empresa Simbiose Company, Inc.) na dose de 100 mL ha⁻¹ e com as fontes STP ou FNR nas doses de 0, 60, 120 ou 240 kg ha⁻¹ de P₂O₅. O experimento foi realizado em blocos casualizados

(DBC) com 4 repetições. Cada parcela foi constituída de quatro linhas de 5 metros de comprimento e espaçamento de 0,50 metros. A irrigação experimental foi realizada sempre que necessário. Não foi aplicado FNR na segunda safra, considerando-se apenas o seu efeito residual.

A produtividade de grãos, P resina, P total do solo, P foliar, N, P e K dos grãos, altura das plantas e diâmetro da espiga foram avaliados para todos tratamentos. Para avaliação da produtividade de grãos (kg ha^{-1}), primeiramente foram coletadas todas as espigas das 4 linhas centrais para avaliação do peso de espigas com palha (peso espiga com palha). Depois foi retirada a palha da espiga, que foi pesada novamente sem a palha (peso espiga sem palha) e realizada a debulha para avaliação do peso de grãos (umidade corrigida para 13%). Para altura das plantas, foi medida a altura de cinco plantas por parcela, do solo até a inserção do pendão e realizada a média. Para medir o diâmetro da espiga, foram coletadas 10 espigas por parcela e medido o diâmetro da espiga com um paquímetro.

Os nutrientes do solo e da planta, P resina, P total do solo, P foliar, N, P e K dos grãos foram avaliados pelo Laboratório Brasileiro de Análises Ambientais e Agrícolas (LABRAS). Os grãos foram utilizados, posteriormente, para avaliação de nutrientes de acordo com Malavolta et al. (1997), sendo realizada digestão sulfúrica para o N com o limite de quantificação (LQ) do N igual a 0,6 g/Kg, e digestão nitro perclórica para P (LQ = 0,01g/Kg) e K (LQ = 0,3 g/Kg) com determinação por espectrometria de emissão atômica com plasma de acoplamento indutivo (ICP-AES). A avaliação P resina foi realizada coletando 4 amostras de solo nas linhas de plantio, por parcela, para formar uma amostra composta, na profundidade de 0-20 cm.

4.2. AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DA ARQUITETURA DO SISTEMA RADICULAR (ASR)

As coroas das raízes de três plantas de milho de cada parcela foram coletadas ao acaso nas fileiras mais externas durante o florescimento, conforme a metodologia Shovelomics descrita por Trachsel et al. (2011). As raízes foram escavadas com pá padrão a cerca de 20 cm ao redor do caule e a uma profundidade de 20 cm, tomando cuidado para não romper o solo aglutinado e o sistema radicular foi ensacado para processamento em laboratório. As raízes foram lavadas, fotografadas e os parâmetros

de arquitetura do sistema radicular (ASR) foram mensurados na plataforma online *Digital Imaging of Root Traits- DIRT 5.2* (Bucksch et al. 2014, Das et al., 2015) com modificações propostas por Campolino et al. (2023).

Para as análises da ASR foram selecionados os tratamentos com as doses 0 kg ha⁻¹ de P₂O₅, como controle, e 120 kg ha⁻¹ de P₂O₅ de STP e FNR que é a dose recomendada agronomicamente. As características ASR obtidas pelo DIRT foram submetidas a uma análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p ≤ 0,05) que foram utilizadas para a realização da filtragem dos dados e seleção de características radiculares sendo que, as características que apresentaram um coeficiente de variação ≤ 20% (Tabela 1), foram selecionadas para as demais análises.

Tabela 1. Descrição das características das raízes de milho de acordo com Bucksch et al., 2014.

Características	Descrição
AREA	Área de raiz projetada
TD_AVG	Diâmetro médio da ponta estimado a partir do círculo medial sobre todas as pontas detectadas
WIDTH_MED	Largura mediana do sistema radicular medida horizontalmente
WIDTH_MAX	Largura máxima do sistema radicular medida horizontalmente
D90	Porcentagem de acúmulo de largura a 90% de profundidade
SKL_WIDTH	Largura do esqueleto calculada a partir do eixo medial
ANG_TOP	<i>Root Top Angle</i> medido entre a linha de ajuste <i>Random Sample Consensus</i> na profundidade do valor D10 e a linha horizontal do solo
NODAL_AVG_DIA	Comprimento do caminho central ao longo da raiz excisada
RTA_MAX	Ângulo máximo do tecido radicular medido sobre todos os RTPs - Número de Caminhos de Ponta Raiz
STA_MAX	Ângulo máximo do tecido do solo medido sobre todos os RTPs
HYP_DIA	Diâmetro do hipocótilo estimado sobre a região do hipocótilo detectada como a média dos diâmetros dos círculos mediais

4.3. EXTRAÇÃO DE DNA DO SOLO E AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA DA COMUNIDADE BACTERIANA E 28S rRNA DE FMA

As raízes de três plantas de milho dos tratamentos 0 kg ha⁻¹ de P₂O₅, (controle) e 120 kg ha⁻¹ de P₂O₅, de STP e FNR para cada uma das três repetições (blocos 1, 2 e 3) foram coletadas durante o florescimento. Após remoção do solo fracamente aderido por agitação manual foram pesados cinco gramas de raízes finas com solo rizosférico aderido. As amostras foram transferidas para tubos cônicos contendo 35 mL de solução de pirofosfato de sódio 0,1% (m/v) e agitadas por 30 minutos em homogeneizador horizontal na velocidade de 130 rpm. As raízes foram removidas, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante descartado. Foram pesados 0,45 gramas de solo, as amostras foram congeladas em N líquido e armazenadas a -80 °C até a extração do DNA. Uma amostra de solo não rizosférico também foi coletada em região próxima a cada um dos três blocos selecionados. Foram pesados 0,45 gramas de solo, as amostras foram congeladas em N líquido e armazenadas a -80 °C até a extração do DNA.

A extração de DNA total do solo rizosférico e não rizosférico foi realizada com o Kit PowerSoil® DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc. EUA). Em seguida, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, EUA) e diluído para concentração de 5,0 ng µL⁻¹. Fragmentos do gene 16S rRNA foram amplificados utilizando os oligonucleotídeos 8F-FAM 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 (Liu et al., 1997, LAMONTAGNE et al., 2001) marcados com fluorescência na posição 5' e 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'(TURNER et al., 1999). Para a reação de PCR foram utilizados 3 µL de DNA (5 ng/µL), 2 µL de cada oligonucleotídeo (5 ng/µL), 10 µL do tampão de reação, 5 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 2 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Promega GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase), em um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada no termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems) na seguinte condição, desnaturação inicial a 95 ° C por 2 min, seguida por 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, anelamento dos oligonucleotídeos a 58 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Para a amplificação do gene 28S rRNA de FMA foi utilizado nested-PCR e os primers LR1 (Tuinen et al., 1998, Trouvelot et al., 1999), FLR2 (Trouvelot et al., 1999), FLR3 (Gollotte et al., 2004) e FLR4 (Gollotte et al., 2004). Para a primeira PCR foram utilizados 15 ng de DNA, 2 µL de primer LR1 (5 ng/µL) (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3'), 2 µL de primer FLR2 (5 ng/µL) (5'-GTCGTTTAAAGCCATTACGTC-3'), 10 µL do tampão de reação, 5 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 2 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Promega GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase), em um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada no termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems) na seguinte condição, desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida por 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, anelamento dos oligonucleotídeos a 58 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Para a segunda PCR foram utilizados 15 ng do produto da primeira PCR, 2 µL do primer FLR3 (5 ng/µL) (5'-[6FAM]TTGAAAGGGAAACGATTGAAGT-3'), 2 µL do primer FLR4 (5 ng/µL) (5'-[HEX]TACGTCAACATCCTTAACGAA-3'), 10 µL do tampão de reação, 5 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 2 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Promega GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase), em um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada no termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems) nas mesmas condições da primeira reação.

Uma alíquota de 1 µL dos produtos de cada PCR foi corada com GelRed (Biotium, Hayward, Califórnia, USA) e submetida a eletroforese em gel de agarose 1% e tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X) utilizando-se como marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies, USA). A visualização do DNA amplificado foi realizada em transluminador sob luz ultravioleta e fotografada no equipamento L-PIX Image EX (Loccus Biotecnologia - Loccus do Brasil, Cotia, SP, Brasil).

4.3.1. Genotipagem por T-RFLP

Os fragmentos amplificados das regiões 16S rDNA (bactérias) e 28S rDNA (fungos micorrízicos arbusculares) foram digeridos com as enzimas de restrição *AluI*, *HaeIII* e *HhaI*. Para a digestão com as enzimas de restrição foram utilizados 10 µL do produto de PCR, 2 µL do tampão da enzima 10 X e 1 µL da enzima 10 U µL⁻¹,

incubados a 37 °C por 4 horas. Para a preparação da reação para genotipagem, 2 µL do produto da digestão foram adicionados a 9,8 µL de formamida deionizada HiDi (Applied Biosystems, EUA) e 0,2 µL de padrão ROX 500 (Applied Biosystems).

Os perfis de digestão foram avaliados no equipamento Genetic Analyzer 3500XL (Applied Biosystems) com o software GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems) e os picos do Fragmento de Restrição Terminal (T-RF) com fragmento entre 30 e 500 bp e intensidades de fluorescência superiores a 40 unidades de fluorescência (altura do pico) foram considerados para análise do perfil. O processo de filtragem dos dados, a remoção de picos falsos e a validação dos fragmentos terminais (T-RFs) foi realizado no software T-REX (Culman et al., 2009). O software Past v.3.25 (Hammer et al. 2001) foi utilizado para calcular a similaridade entre os tamanhos dos fragmentos, utilizando a matriz de distância de Bray-Curtis.

4.3.2. Classificação taxonômica

A diversidade filogenética bacteriana e fúngica da rizosfera do genótipo de milho DKB390 foi analisada. A β -diversidade da comunidade bacteriana foi avaliada com base nos resultados do T-RFLP. Para avaliação da diversidade da comunidade fúngica foi realizada a amplificação do gene 18S rRNA utilizando o par de primers Euk 1a 5'[HEX]CTGGTTGATCCT GCCAG-3' e Euk516r: 5' ACCAG- ACTTGCCCTCC 3' e as enzimas de restrição utilizadas para digestão foram *HhaI*, *MspI*, *BsuRI*.

Os fragmentos obtidos (T-RFs) na análise T-RFLP foram comparados com o comprimento previsto do fragmento de acordo com os perfis de digestão já classificados e depositados em bancos de dados usando o software Microbial Community Analysis III- MiCA 3 (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>) e o banco de dados de referência de solo baseado em RDP r12u10 (Shyu et al., 2007) para bactérias e PHYMYCO-DB *Fungi phylogenetic sequences database* para fungos. A classificação taxonômica foi realizada no NCBI usando a ferramenta de status de taxonomia (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/TaxIdentifier/tax_identifier.cgi) e os resultados obtidos pela digestão das três enzimas foram confrontados.

Além disso, três índices de diversidade alfa, Shannon-Wiener - H' (Shannon e Weaver, 1949), Simpson - D (Simpson, 1949) e Chao (Chao e bunge, 2002) foram

calculados com base nas famílias bacterianas identificadas em cada tratamento, utilizando o software Past v.3.25 (Hammer; Harper, 2001).

4.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FOSFATASE

Para realização da atividade enzimática, o solo rizosférico foi peneirado usando peneira de 2 mm e retirou-se com auxílio de pinças todos os pedaços de raízes, tecidos de plantas e outros materiais orgânicos grosseiros que pudessem interferir na determinação da análise. Pesou-se 0,150 g de solo rizosférico da amostra de cada tratamento e iniciou-se a análise.

Os métodos usados para testar as atividades das enzimas fosfatase foram descritos por Tabatabai (1994). O método envolve extração e determinação quantitativa de p-nitrofenol liberado quando o solo é incubado por uma hora a 37°C com p-nitrofenil fosfato ou bis-p-nitrofenil fosfato em tampão universal modificado ajustado para pH 6,5 e 11 para fosfatase ácida e alcalina, respectivamente. As reações foram interrompidas pela adição de CaCl_2 e NaOH. As soluções foram centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi usado para medições colorimétricas a 400 nm no espectrofotômetro. A concentração de p-nitrofenol presente em cada amostra foi determinada com base na curva padrão (0, 2, 5, 7,5 e 10 g de p-nitrofenol/ml). Os resultados obtidos da atividade das enzimas foram expressos em $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de solo.

Os valores da atividade enzimática foram plotados em conjunto com os dados de temperatura mínima ($T_{\min}$), temperatura máxima ($T_{\max}$) e precipitação (P) ao longo do tempo de cultivo do milho nas duas safras (2019/2020 e 2020/2021), utilizando o pacote ggplot2 (Wickham, 2016) no software R.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados agronômicos do milho e as características da arquitetura do sistema radicular foram submetidas a uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey com nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) utilizando os pacotes "ExpDes.pt" (Ferreira et al. 2021) e "agricolae" (Mendiburu e Yaseen, 2020) no software R. As características da arquitetura do sistema radicular AREA, WIDTH_MAX, D90, SKL_WIDTH e ANG_TOP, juntamente com a produtividade de grãos (GY) foram

utilizados na análise de componentes principais (ACP) para avaliação do efeito de cada tratamento em tais características nas duas safras. Os componentes principais foram extraídos via matriz de correlação de Pearson usando o pacote “factoextra” (Kassambara e Mundt, 2020) do software R.

O efeito dos tratamentos no perfil de β -diversidade genética de bactérias e FMA foi avaliado por escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) baseado na matriz de distância de Bray-Curtis e teste ANOSIM (Análise de similaridade) unidirecional (*one-way*) utilizando o software Past v.3.25 (Hammer et al. 2001). A análise Simper da matriz de distância de Bray-Curtis, após a transformação de Hellinger (Legendre e Gallagher, 2001), foi utilizada para avaliar a contribuição porcentual de cada família identificada para as dissimilaridades entre os tratamentos utilizando o software Past v.3.25 (Hammer et al. 2001).

Após confronto dos resultados obtidos nas digestões com as três enzimas de restrição que são correspondentes a lista de possíveis táxons obtidos em cada amostra gerada no software Mica 3, a abundância relativa (AR) das famílias identificadas em cada tratamento foi calculada de acordo com a razão da quantidade de microrganismos de uma família específica em uma amostra e a quantidade total de microrganismos de todas famílias na mesma amostra. Os valores de AR maiores que 3% foram plotados em um gráfico utilizando os pacotes ggplot2 (Wickham, 2016) e reshape2 (Wickham, 2007) no software R.

O efeito dos tratamentos com diferentes fertilizantes, doses e inoculação sobre a abundância das famílias bacterianas e fúngicas bem como os índices de diversidades de Simpson, Shannon e Chao e os resultados da análise de atividade enzimática foram verificados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey com nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) utilizando os pacotes “ExpDes.pt” (Ferreira et al. 2021) e “agricolae” (Mendiburu e Yaseen, 2020) no software R.

Os desdobramentos das correlações dos dados em efeitos diretos e indiretos foram realizados por meio da análise de trilha utilizando o pacote metan (Multi Environment Trials Analysis) (Olivoto e Lucio, 2020) no software R. Características da planta, dados do solo e índice de diversidade de microrganismos na rizosfera foram utilizados como variáveis explicativas e a produtividade dos grãos como variável

dependente. Para seleção destas variáveis, a função `select()` foi utilizada. As variáveis explicativas utilizadas foram a altura da planta, diâmetro, potássio dos grãos (KG), nitrogênio dos grãos (NG), fósforo dos grãos (PG), fósforo foliar (PFOL), as atividades enzimáticas da fosfatase ácida e alcalina, fósforo total no solo, fósforo resina e índice de Simpson. As matrizes de coeficientes de correlação foram obtidas utilizando a função `cor()`, `rownames()` e `colnames()`. A função `colinddiag()` foi utilizada para realizar o diagnóstico da multicolinearidade das matrizes de correlação. Um diagnóstico completo de colinearidade das matrizes de correlação foi realizado utilizando vários indicadores, como fator de inflação de variação, número de condição (CN) e determinante de matriz.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DO EFEITO DA INOCULAÇÃO E ADUBAÇÃO EM SOLO ARGILOSO COM ALTO TEOR DE FÓSFORO

A análise de variância (ANOVA) mostrou efeito do bloco para produtividade, N e P grãos, P foliar, P resina e P total na primeira safra e P grão e P resina na segunda safra. A fertilização não apresentou efeito significativo para nenhuma das safras. A inoculação apresentou efeito significativo para N grãos na primeira safra e para N grãos e produtividade na segunda safra. Para dose houve efeito significativo para P resina e total na primeira safra e P resina na segunda safra. Na interação fertilização e dose houve efeito significativo para P grãos e P resina na segunda safra. Na interação fertilização, dose e inoculação houve efeito significativo na altura da planta. As demais interações não foram significativas. O coeficiente de variação foi de baixo a médio/alto (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) dos dados agronômicos de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Quadrado Médio											
Safra	GL	Produtividade (kg ha ⁻¹)	K grãos (g kg ⁻¹)	N grãos (g kg ⁻¹)	P grãos (g kg ⁻¹)	Altura plantas (m)	Diâmetro espiga (mm)	P foliar (g kg ⁻¹)	P resina solo (mg dm ⁻³)	P total solo (mg dm ⁻³)	
2019/2020	Bloco	3	2835577**	20,28	1584,65**	53,14**	0,0050	1,8249	0,00306042***	4351,2*	1290583***
	Fertilização	1	93420	25,73	3,98	10,82	0,0019	0,4761	0,0004	6,20	135341
	Dose	3	173965	13,66	210,96	10,82	0,0025	1,3462	0,0001	24238,3***	645478***
	Inoculação	1	1459465	3,57	1583,84*	0,63	0,0070	1,1772	0,0006	5249,0	20331
	Fertilização*Dose	3	310018	22,61	229,42	11,71	0,0065	3,0527	0,0002	637,0	110747
	Fertilização*Inoculação	1	13706	2,89	223,28	0,00	0,0006	4,9173	0,0001	228,8	174338
	Dose*Inoculação	3	444445	22,90	450,31	7,66	0,0041	1,8169	0,0002	544,6	99978
	Fertilização*Dose*Inoculação	3	134888	0,91	51,04	2,06	0,0025	3,1216	0,0001	1567,0	25472
	Total	45									
Coeficiente de variação (%)		7,64	19,24	12,89	20,62	2,55	2,51	5,65	41,54	26,64	
2020/2021	GL	Produtividade (kg ha ⁻¹)	K grãos (g kg ⁻¹)	N grãos (g kg ⁻¹)	P grãos (g kg ⁻¹)	Altura plantas (m)	Diâmetro espiga (mm)	P foliar (g kg ⁻¹)	P resina solo (mg dm ⁻³)	P total solo (mg dm ⁻³)	
	Bloco	3	4095023,31	37,15	1455,00	43,15*	0,03	2,46	0,01	2070,03*	618839,33
	Fertilização	1	174828,52	8,34	88,45	0,03	0,03	2,76	0,00	6648,36	181774,32
	Dose	3	224353,52	4,97	42,83	8,78	0,00	0,78	0,00	1664,24**	69631,55
	Inoculação	1	3278362,90*	18,92	918,99*	11,61	0,00	0,04	0,00	544,64	8276,45
	Fertilização*Dose	3	541381,64	26,06	320,08	22,31*	0,02	0,54	0,00	3201,49**	117341,12
	Fertilização*Inoculação	1	143925,39	6,73	0,01	7,91	0,01	0,03	0,00	28,22	285,61
	Dose*Inoculação	3	738566,02	10,72	233,91	6,22	0,01	0,18	0,00	177,10	7420,01
	Fertilização*Dose*Inoculação	3	106018,10	1,16	108,68	2,83	0,02*	1,61	0,00	583,36	100680,54
	Total	45									
Coeficiente de variação (%)		8,17	10,49	11,1	12,3	3,93	2,54	7,92	45,22	35,39	

***, **, * Significativo a 10%, 5% e 1%

Nas duas safras não houve diferença significativa na produtividade entre as diferentes doses de P_2O_5 (Tabela 3 e 4). A produtividade do milho inoculado foi significativamente diferente na segunda safra para os tratamentos com STP, sendo que para as doses 0, 120 e 240 kg ha⁻¹ o tratamento não inoculado apresentou maior produtividade, enquanto para a dose 60 kg ha⁻¹ o milho inoculado apresentou maior produtividade (Tabela 4). Para a concentração de N, P e K grãos não houve diferença entre milho inoculado e não inoculado, e entre as doses de P_2O_5 para FNR tanto na primeira quanto na segunda safra. Para o milho fertilizado com STP não houve diferença na concentração de N, P e K grãos na primeira safra, no entanto para a segunda safra, os valores de N grãos foram maiores para amostras sem inoculante para todas as doses, e para P grãos, com exceção da dose 0 kg ha⁻¹, os tratamentos não inoculados apresentaram maior concentração do que os inoculados (Tabela 3 e 4). A concentração de K grãos foi maior na dose 0 kg ha⁻¹ de fertilizante STP do que nas demais doses na segunda safra, no entanto, não houve diferença entre tratamentos inoculado e não inoculado (Tabela 4).

A altura das plantas e diâmetro da espiga foram estatisticamente iguais para os tratamentos na primeira (Tabela 3) e segunda (Tabela 4) safras, com exceção, na primeira safra, em que altura das plantas foi maior na dose 0 kg ha⁻¹ de FNR quando comparada à dose 60 kg ha⁻¹ e o diâmetro das espigas foi maior para os tratamentos sem inoculação nas doses 60, 120 e 240 kg ha⁻¹ de FNR (Tabela 3). O valor de P foliar foi maior para os tratamentos não inoculados e com fertilizante STP na primeira safra (Tabela 3) e não houve diferença significativa nos valores de P foliar entre os demais tratamentos na primeira e segunda safras (Tabela 4). O valor de P resina foi maior na dose 240 kg ha⁻¹ do fertilizante STP na primeira safra (Tabela 3). Além disso, o valor de P resina foi maior nas amostras não inoculadas considerando todas as doses de STP na primeira safra (Tabela 3). O valor de P total do solo, na primeira safra, foi maior para os tratamentos com 240 kg ha⁻¹ de FNR e STP quando comparado à dose 0 kg ha⁻¹ (Tabela 3) e não houve diferença entre os tratamentos na segunda safra (Tabela 4).

Tabela 3. Dados agronômicos de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2019/2020.

		Dose P ₂ O ₅ (kg ha ⁻¹) do Fertilizante FNR						Dose P ₂ O ₅ (kg ha ⁻¹) do Fertilizante STP			
		0	60	120	240			0	60	120	240
Produtividade	NI	9378,5 Aa	9298,0 Aa	9663,0 Aa	9740,8 Aa	Produtividade	NI	9340,0 Aa	9387,5 Aa	9452,5 Aa	9477,3 Aa
(kg ha ⁻¹)	I	9299,8 Aa	9163,5 Aa	9065,3 Aa	9226,3 Aa	(kg ha ⁻¹)	I	8966,3 Aa	9726,0 Aa	8652,8 Aa	9221,5 Aa
N dos grãos	NI	144,5 Aa	143,5 Aa	159,0 Aa	146,8 Aa	N dos grãos	NI	144,9 Aa	141,6 Aa	160,1 Aa	164,1 Aa
(g kg ⁻¹)	I	152,7 Aa	138,3 Aa	141,4 Aa	136,5 Aa	(g kg ⁻¹)	I	139,9 Aa	138,9 Aa	135,4 Aa	141,8 Aa
P dos grãos	NI	15,2 Aa	13,7 Aa	15,0 Aa	15,9 Aa	P dos grãos	NI	12,6 Aa	12,7 Aa	16,5 Aa	14,8 Aa
(g kg ⁻¹)	I	15,8 Aa	13,9 Aa	12,9 Aa	16,5 Aa	(g kg ⁻¹)	I	14,8 Aa	12,8 Aa	14,7 Aa	13,4 Aa
K dos grãos	NI	21,6 Aa	22,1 Aa	21,8 Aa	25,2 Aa	K dos grãos	NI	20,5 Aa	19,0 Aa	24,6 Aa	23,2 Aa
(g kg ⁻¹)	I	24,7 Aa	22,2 Aa	20,3 Aa	23,3 Aa	(g kg ⁻¹)	I	22,5 Aa	19,6 Aa	21,8 Aa	19,8 Aa
Altura das	NI	2,4 Aa	2,3 Ba	2,4 ABa	2,4 ABa	Altura das	NI	2,3 Aa	2,4 Aa	2,4 Aa	2,4 Aa
plantas (m)	I	2,4 Aa	2,3 Ba	2,4 ABa	2,3 ABa	plantas (m)	I	2,3 Aa	2,3 Aa	2,3 Aa	2,3 Aa
Diâmetro da	NI	46,8 ABb	46,8 Ba	47,7 ABa	49,2 Aa	Diâmetro da	NI	46,7 Aa	46,8 Aa	47,9 Aa	46,1 Aa
espiga (mm)	I	47,1 ABa	46,0 Bb	47,2 ABb	46,8 Ab	espiga (mm)	I	47,7 Aa	47,3 Aa	46,5 Aa	47,1 Aa
P foliar	NI	0,33 Aa	0,33 Aa	0,34 Aa	0,32 Aa	P foliar	NI	0,33 Aa	0,33 Aa	0,34 Aa	0,34 Aa
(g kg ⁻¹)	I	0,32 Aa	0,33 Aa	0,31 Aa	0,32 Aa	(g kg ⁻¹)	I	0,32 Ab	0,32 Ab	0,33 Ab	0,33 Ab
P resina	NI	53,3 Ba	101,0 Ba	111,6 ABa	132,3 Aa	P resina	NI	65,2 Ba	65,5 Ba	111,7 Ba	173,4 Aa
(mg dm ⁻³)	I	51,9 Ba	61,5 Ba	79,4 ABa	148,1 Aa	(mg dm ⁻³)	I	56,1 Bb	63,5 Bb	78,3 Bb	130,3 Ab
P total solo	NI	816,8 Ba	1393,0 ABa	1176,6 ABa	1623,9 Aa	P total solo (mg	NI	867,7 Ba	895,9 Ba	1109,1 ABa	1352,0 Aa
(mg dm ⁻³)	I	950,1 Ba	1041,1 ABa	1130,8 ABa	1328,0 Aa	dm ⁻³)	I	1020,9 Ba	953,7 Ba	1253,9 ABa	1271,1 Aa

(*) Médias seguidas por letras iguais não diferem para teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas são referentes à comparação estatística entre inoculado e não inoculado e letras maiúsculas entre as doses de P₂O₅.

Tabela 4. Dados agronômicos de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2020/2021.

		Dose P ₂ O ₅ (kg ha ⁻¹) do Fertilizante FNR						Dose P ₂ O ₅ (kg ha ⁻¹) do Fertilizante STP			
		0	60	120	240			0	60	120	240
Produtividade	NI	9387,5 Aa	9332,5 Aa	9716,3 Aa	9665,0 Aa	Produtividade	NI	9656,3 Aa	8817,5 Ab	9435,0 Aa	9395,0 Aa
(kg ha ⁻¹)	I	8881,3 Aa	9152,5 Aa	9117,5 Aa	8760,0 Aa	(kg ha ⁻¹)	I	9490,0 Ab	9191,3 Aa	8645,0 Ab	8546,3 Ab
N grãos	NI	136,5 Aa	133,9 Aa	134,5 Aa	129,3 Aa	N dos grãos	NI	137,8 Aa	124,6 Aa	134,2 Aa	128,2 Aa
(g kg ⁻¹)	I	113,2 Aa	139,2 Aa	129,4 Aa	122,1 Aa	(g kg ⁻¹)	I	127,2 Ab	121,7 Ab	120,2 Ab	125,4 Ab
P grãos	NI	21,4 Aa	21,0 Aa	21,9 Aa	22,9 Aa	P dos grãos	NI	26,3 Aa	21,9 Ba	20,7 Ba	21,2 Ba
(g kg ⁻¹)	I	21,0 Aa	21,5 Aa	23,3 Aa	20,8 Aa	(g kg ⁻¹)	I	22,6 Ab	21,3 Bb	20,3 Bb	19,7 Bb
K grãos	NI	30,3 Aa	30,5 Aa	31,7 Aa	33,3 Aa	K dos grãos	NI	34,1 Aa	30,5 ABa	30,4 ABa	30,6 Ba
(g kg ⁻¹)	I	30,0 Aa	31,7 Aa	32,5 Aa	29,8 Aa	(g kg ⁻¹)	I	32,1 Aa	30,1 ABa	29,1 ABa	27,4 Ba
Altura das	NI	2,1 Aa	2,1 Aa	2,1 Aa	2,1 Aa	Altura das	NI	2,1 Aa	2,1 Aa	2,1 Aa	2,0 Aa
plantas (m)	I	2,1 Aa	2,2 Aa	2,2 Aa	2,1 Aa	plantas (m)	I	2,2 Aa	2,0 Aa	2,0 Aa	2,1 Aa
Diâmetro da	NI	51,0 Aa	51,3 Aa	50,7 Aa	50,2 Aa	Diâmetro da	NI	51,1 Aa	49,8 Aa	50,1 Aa	50,7 Aa
espiga (mm)	I	51,0 Aa	50,3 Aa	50,9 Aa	50,9 Aa	espiga (mm)	I	50,5 Aa	50,6 Aa	49,8 Aa	50,4 Aa
P foliar	NI	0,25 Aa	0,23 Aa	0,24 Aa	0,22 Aa	P foliar	NI	0,25 Aa	0,24 Aa	0,24 Aa	0,23 Aa
(g kg ⁻¹)	I	0,25 Aa	0,25 Aa	0,23 Aa	0,25 Aa	(g kg ⁻¹)	I	0,24 Aa	0,24 Aa	0,24 Aa	0,25 Aa
P resina	NI	53,8 ABa	39,0 ABa	54,5 Aa	38,9 Ba	P resina	NI	35,0 Ba	61,4 ABa	66,9 ABa	99,2 Aa
(mg dm ⁻³)	I	38,5 ABa	57,1 ABa	73,4 Aa	35,4 Ba	(mg dm ⁻³)	I	56,5 Ba	66,2 ABa	70,3 ABa	98,2 Aa
P total solo	NI	754,9 Aa	577,4 Aa	827,9 Aa	530,7 Aa	P total solo	NI	518,8 Aa	835,6 Aa	843,2 Aa	936,6 Aa
(mg dm ⁻³)	I	594,7 Aa	738,3 Aa	878,4 Aa	587,4 Aa	(mg dm ⁻³)	I	821,1 Aa	768,6 Aa	772,0 Aa	846,5 Aa

(*) Médias seguidas por letras iguais não diferem para teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas são referentes à comparação estatística entre inoculado e não inoculado e letras maiúsculas entre as doses de P₂O₅.

5.2. A ARQUITETURA DO SISTEMA RADICULAR DEMONSTROU CONSISTÊNCIA ENTRE OS DIFERENTES TRATAMENTOS E SAFRAS

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a maior parte das características de arquitetura radicular avaliadas, o que pode ser observado na exemplificação das figuras 1 e 2. Na primeira safra, comparando os níveis de cada fator (inoculação, dose e fertilização), observou-se que o diâmetro do hipocótilo (HYP_DIA) foi maior para os tratamentos com dose 0 kg ha⁻¹ de fertilizante e o ângulo máximo do tecido do solo (STA_MAX) foi maior para tratamentos com dose 120 kg ha⁻¹ de fertilizante (Tabela 5). Na segunda safra, a densidade de raízes a 90% de profundidade (D90) foi maior para o tratamento com fertilizante STP (Tabela 5).

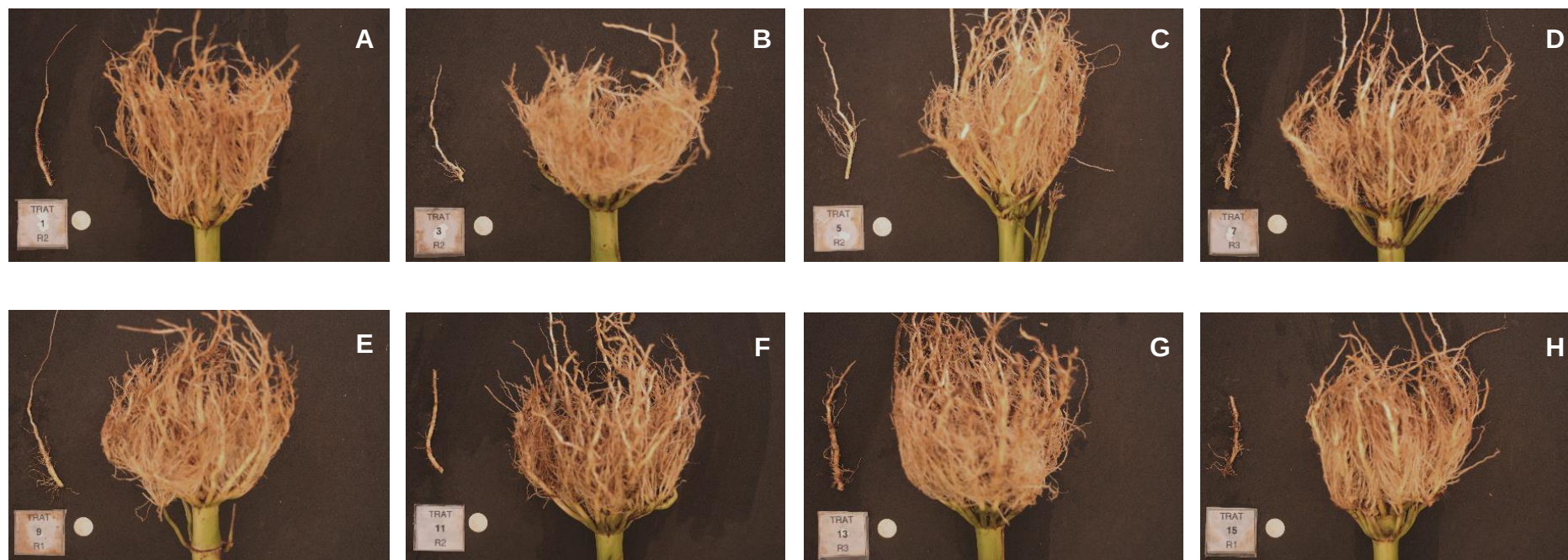


Figura 1. Raízes de milho cultivado na safra 2019/2020 sob diferentes tratamentos: **A:** Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. **B:** Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante **C:** Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. **D:** Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. **E:** Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. **F:** Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. **G:** Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. **H:** Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante.

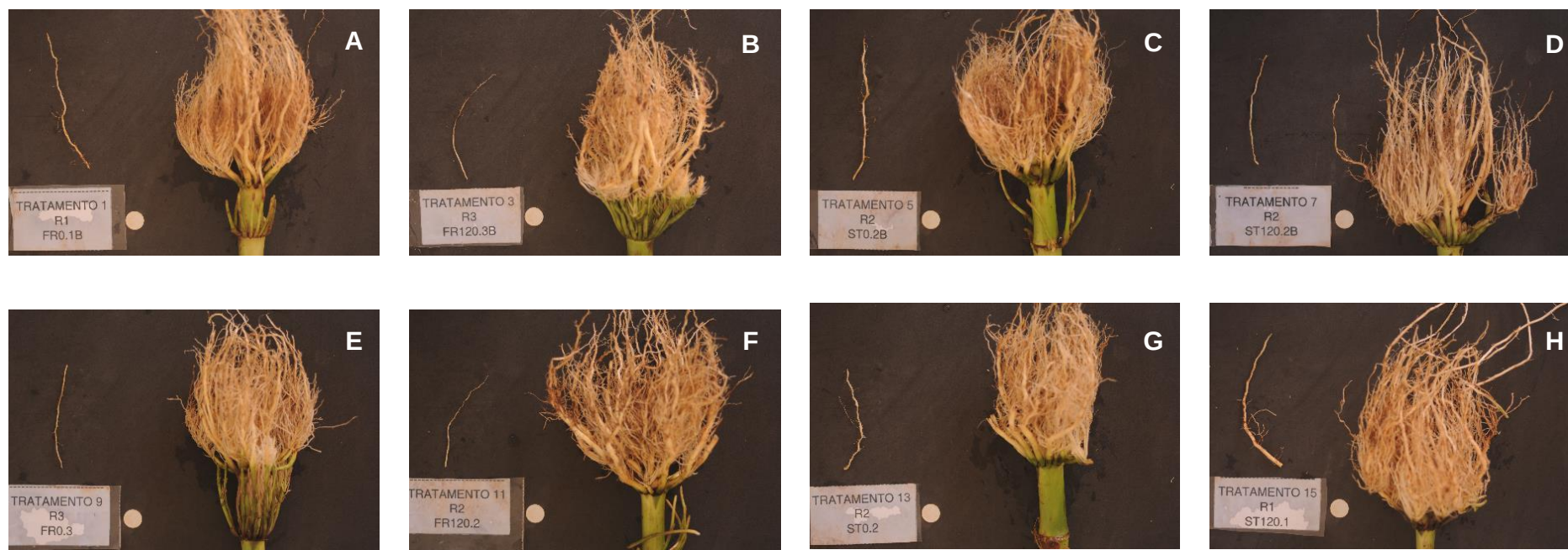


Figura 2. Raízes de milho cultivado na safra 2020/2021 sob diferentes tratamentos: **A:** Fertilizante FNR, dose 0 kg P_2O_5 ha^{-1} , com bioinoculante. **B:** Fertilizante FNR, dose 120 kg P_2O_5 ha^{-1} , com bioinoculante **C:** Fertilizante STP, dose 0 kg P_2O_5 ha^{-1} , com bioinoculante. **D:** Fertilizante STP, dose 120 kg P_2O_5 ha^{-1} , com bioinoculante. **E:** Fertilizante FNR, dose 0 kg P_2O_5 ha^{-1} , sem bioinoculante. **F:** Fertilizante FNR, dose 120 kg P_2O_5 ha^{-1} , sem bioinoculante. **G:** Fertilizante STP, dose 0 kg P_2O_5 ha^{-1} , sem bioinoculante. **H:** Fertilizante STP, dose 120 kg P_2O_5 ha^{-1} , sem bioinoculante.

Tabela 5. Características da arquitetura do sistema radicular do milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Safra	2019/2020						2020/2021					
Característica	Inoculação		Fertilização		Dose		Inoculação		Fertilização		Dose	
	I	NI	FNR	STP	0	120	I	NI	FNR	STP	0	120
AREA (cm ²)	22585,27 a	22491,09 a	21742,04 a	23334,32 a	22981,51 a	22094,85 a	17600,28 a	16676,28 a	17393,34 a	16889,14 a	17104,53 a	17186,20 a
TD_AVG (cm)	0,410 a	0,414 a	0,412 a	0,412 a	0,412 a	0,412 a	0,401 a	0,400 a	0,403 a	0,398 a	0,400 a	0,400 a
WIDTH_MED (cm)	138,58 a	143,77 a	136,16 a	146,19 a	142,82 a	139,53 a	118,15 a	113,17 a	115,39 a	116,01 a	113,06 a	118,41 a
WIDTH_MAX (cm)	197,55 a	198,74 a	194,81 a	201,48 a	197,51 a	198,78 a	169,45 a	157,69 a	164,67 a	162,58 a	163,39 a	163,87 a
SKL_WIDTH (cm)	208,78 a	212,14 a	204,29 a	216,63 a	209,85 a	211,06 a	181,26 a	174,40 a	176,91 a	178,87 a	176,20 a	179,60 a
ANG_TOP (°)	52,98 a	54,31 a	52,69 a	54,60 a	53,58 a	53,70 a	56,90 a	61,05 a	59,31 a	58,56 a	56,90 a	61,05 a
STA_MAX (cm)	89,59 a	89,55 a	89,59 a	89,55 a	89,43 b	89,71 a	89,72 a	89,61 a	89,60 a	89,73 a	89,60 a	89,73 a
RTA_MAX (cm)	82,44 a	82,76 a	82,65 a	82,56 a	81,80 a	83,41 a	82,34 a	83,51 a	83,15 a	82,69 a	82,86 a	82,99 a
HYP_DIA (cm)	2,31 a	2,24 a	2,22 a	2,33 a	2,40 a	2,15 b	1,72 a	1,75 a	1,75 a	1,72 a	1,75 a	1,72 a
NODAL_AVG_DIA (cm)	0,890 a	0,910 a	0,902 a	0,890 a	0,884 a	0,917 a	0,765 a	0,806 a	0,790 a	0,781 a	0,790 a	0,781 a
D90 (cm)	0,871 a	0,883 a	0,870 a	0,884 a	0,879 a	0,875 a	0,867 a	0,865 a	0,850 b	0,882 a	0,866 a	0,866 a

AREA: Área de raiz projetada, TD_AVG: Diâmetro médio da ponta estimado a partir do círculo medial sobre todas as pontas detectadas, WIDTH_MED: Largura mediana do sistema radicular medida horizontalmente, WIDTH_MAX: Largura máxima do sistema radicular medida horizontalmente, D90: Porcentagem de acúmulo de largura a 90% de profundidade, SKL_WIDTH: Largura do esqueleto calculada a partir do eixo medial, ANG_TOP: *Root Top Angle* medido entre a linha de ajuste *Random Sample Consensus* na profundidade do valor D10 e a linha horizontal do solo, NODAL_AVG_DIA: Comprimento do caminho central ao longo da raiz excisada, RTA_MAX: Ângulo máximo do tecido radicular medido sobre todos os RTPs - Número de Caminhos de Ponta Raiz, STA_MAX: Ângulo máximo do tecido do solo medido sobre todos os RTPs, HYP_DIA: Diâmetro do hipocótilo estimado sobre a região do hipocótilo detectada como a média dos diâmetros dos círculos mediais.

5.3. COMPARAÇÃO DOS DADOS AGRONÔMICOS E DA ARQUITETURA RADICULAR ENTRE AS SAFRAS 2019/2020 E 2020/2021

A produtividade média não apresentou diferença entre as duas safras. Por outro lado, P resina, P total do solo, P foliar, N grãos e altura das plantas apresentaram maiores valores médios na primeira safra. A média dos valores de P e K grãos e o diâmetro da espiga foram maiores na segunda safra (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios das características agronômicas do milho nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Dado agrônômico	Safra	Valor	
Produtividade (kg ha ⁻¹)	2019/2020	9316,19	a
	2020/2021	9199,31	a
P resina (mg dm ⁻³)	2019/2020	92,68	a
	2020/2021	59,00	b
P total solo (mg dm ⁻³)	2019/2020	1136,52	a
	2020/2021	739,50	b
P foliar (g kg ⁻¹)	2019/2020	0,33	a
	2020/2021	0,24	b
N grãos (g kg ⁻¹)	2019/2020	145,6	a
	2020/2021	128,6	b
P grãos (g kg ⁻¹)	2019/2020	14,45	b
	2020/2021	21,74	a
K grãos (g kg ⁻¹)	2019/2020	22,01	b
	2020/2021	30,89	a
Altura plantas (m)	2019/2020	2,34	a
	2020/2021	2,10	b
Diâmetro espiga (mm)	2019/2020	47,11	b
	2020/2021	50,60	a

Com relação as características da ASR, os valores da área da raiz, diâmetro e densidade de raízes representados por AREA, TD_AVG, WIDTH_MED, WIDTH_MAX, SKL_WIDTH, HYP_DIA, NODAL_AVG_DIA e D90 foram maiores na

primeira safra, enquanto o ângulo da raiz (ANG_TOP) apresentou maior valor na segunda safra. Não houve diferença significativa nos valores do ângulo máximo do tecido radicular e do solo (RTA_MAX e STA_MAX) entre as safras (Tabela 7).

Tabela 7. Valores médios das características da arquitetura do sistema radicular (ASR) do milho nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Característica da raiz	Safra	Valor	
AREA (cm ²)	2019/2020	22538,18	a
	2020/2021	17138,97	b
TD_AVG (cm)	2019/2020	0,41	a
	2020/2021	0,40	b
WIDTH_MED (cm)	2019/2020	141,17	a
	2020/2021	115,70	b
WIDTH_MAX (cm)	2019/2020	198,14	a
	2020/2021	163,68	b
SKL_WIDTH (cm)	2019/2020	210,46	a
	2020/2021	177,88	b
ANG_TOP (°)	2019/2020	53,64	b
	2020/2021	59,00	a
STA_MAX (cm)	2019/2020	89,57	a
	2020/2021	89,67	a
RTA_MAX (cm)	2019/2020	82,60	a
	2020/2021	82,91	a
HYP_DIA (cm)	2019/2020	2,27	a
	2020/2021	1,74	b
NODAL_AVG_DIA (cm)	2019/2020	0,90	a
	2020/2021	0,79	b
D90 (cm)	2019/2020	0,88	a
	2020/2021	0,87	b

5.4. A INOCULAÇÃO ALTEROU A COMPOSIÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS E FÚNGICAS NA SEGUNDA SAFRA

Após análise da diversidade genética da comunidade microbiana da rizosfera do milho por T-RFLP não foi encontrada nenhuma diferença significativa na comunidade bacteriana ou fúngica na primeira safra (2019/2020) (Figura 3).

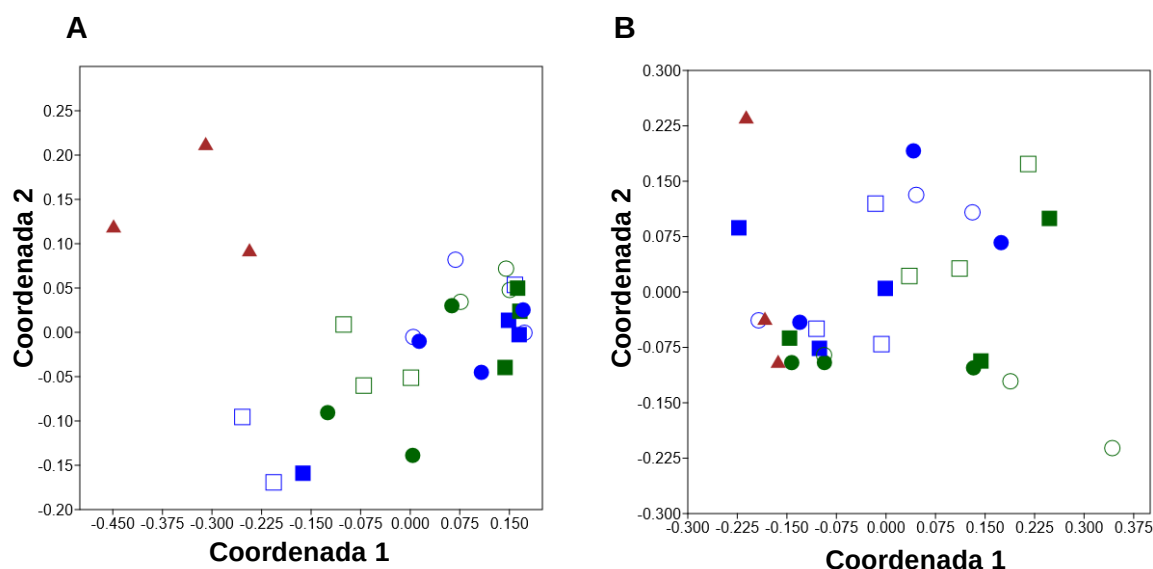


Figura 3. Perfil baseado no escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) utilizando a matriz de distância de Bray-Curtis para todos tratamentos da safra de 2019/2020 para análise da diversidade genética da comunidade (A) bacteriana e (B) fúngica de solo rizosférico de milho em diferentes condições de adubação fosfatada e inoculação. Os pontos coloridos nos perfis NMDS são referentes aos diferentes tratamentos: ■STP, dose 120 kg ha⁻¹, com bioinoculante. ●STP, dose 0 kg ha⁻¹, com bioinoculante. ○STP, dose 0 kg ha⁻¹, sem bioinoculante. □STP, dose 120 kg ha⁻¹, sem bioinoculante. ■FNR, dose 120 kg ha⁻¹, com bioinoculante. ●FNR, dose 0 kg ha⁻¹, com bioinoculante. ○FNR, dose 0 kg ha⁻¹, sem bioinoculante. □FNR, dose 120 kg ha⁻¹, sem bioinoculante. ▲Solo não rizosférico. Stress: 0,09.

Na segunda safra (Figura 4A), houve diferença na comunidade bacteriana entre as amostras inoculadas e não inoculadas para os tratamentos sem fertilizante ($p=0,0032$ e $R=0,5056$) (Figura 4B) e para os tratamentos com 120 kg ha⁻¹ do fertilizante STP ($p=0,098$ e $R=0,5926$) (Figura 4C) a 10% de significância. A comunidade fúngica (Figura 4D) se diferenciou entre as amostras inoculadas e não

inoculadas com BiomaPhos para os tratamentos com dose 120 kg ha⁻¹ de fertilizante (p=0,04 e R=0,1704) (Figura 4E).

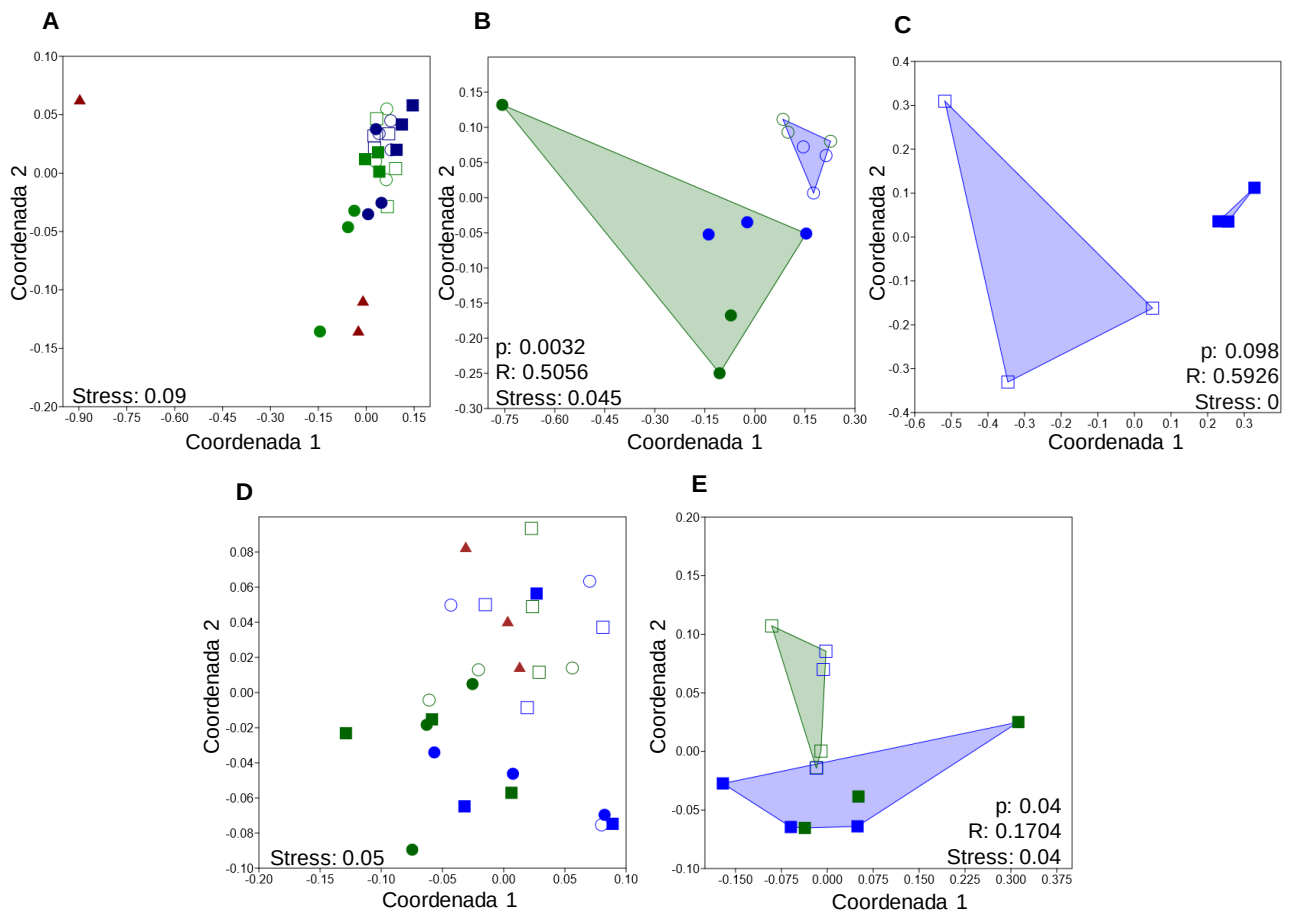


Figura 4. Perfil baseado no escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) utilizando a matriz de distância de Bray-Curtis para todos tratamentos da safra de 2020/2021 para análise da diversidade genética da comunidade (A) bacteriana e (D) fúngica de solo rizosférico de milho em diferentes condições de adubação fosfatada e inoculação. (B) Amostras dos tratamentos sem fertilizante (0 kg ha⁻¹) da comunidade bacteriana. (C) Amostras dos tratamentos com 120 kg ha⁻¹ do fertilizante STP da comunidade bacteriana. (E) Amostras dos tratamentos com 120 kg ha⁻¹ de fertilizante da comunidade fúngica. Os pontos coloridos nos perfis NMDS são referentes aos diferentes tratamentos: ■STP, dose 120 kg ha⁻¹, com bioinoculante. ●STP, dose 0 kg ha⁻¹, com bioinoculante. ○STP, dose 0 kg ha⁻¹, sem bioinoculante. □STP, dose 120 kg ha⁻¹, sem bioinoculante. ■FNR, dose 120 kg ha⁻¹, com bioinoculante. ●FNR, dose 0 kg ha⁻¹, com bioinoculante. ○FNR, dose 0 kg ha⁻¹, sem bioinoculante. □FNR, dose 120 kg ha⁻¹, sem bioinoculante. ▲Solo não rizosférico.

5.5. COMPOSIÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS E FÚNGICAS DA RIZOSFERA DE MILHO

A avaliação da composição bacteriana do solo rizosférico nos tratamentos de milho mostrou que os três filos mais abundantes nas duas safras avaliadas foram Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes. Desses filos, as famílias mais abundantes foram Streptomycetaceae, Micrococcaceae, Methylobacteriaceae e Bradyrhizobiaceae (Figura 5A e 5B).

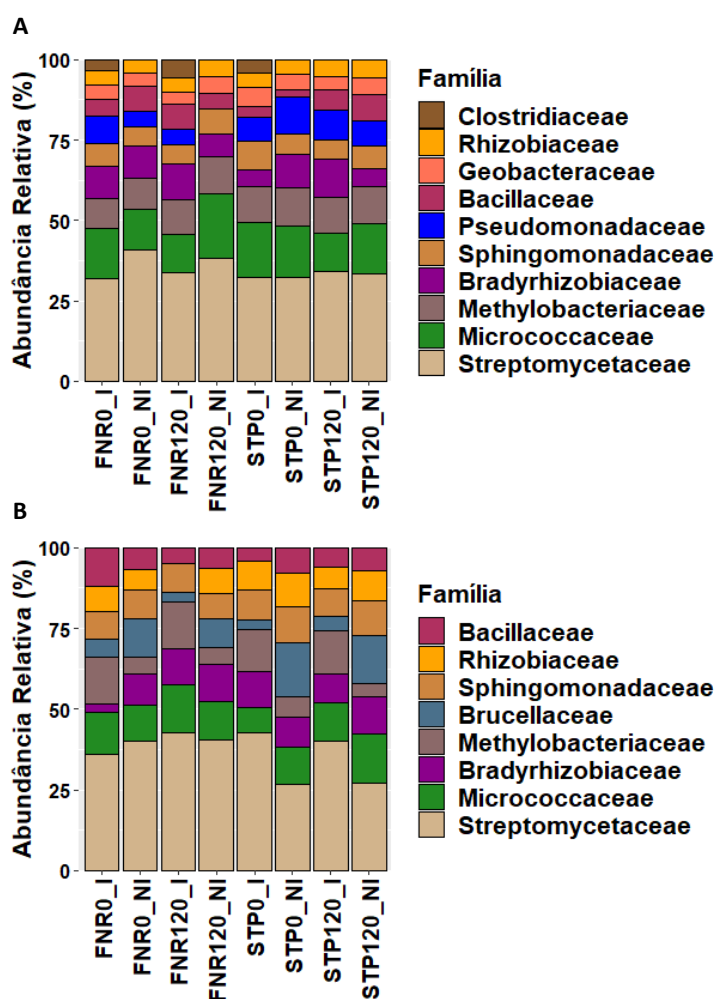


Figura 5. Abundância relativa das famílias da comunidade bacteriana na rizosfera de milho nas safras (A) 2019/2020 e (B) 2020/2021 com uma abundância relativa superior a 3%. FNR0_NI: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante, FNR120_NI: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. FNR0_I: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. FNR120_I: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. STP0_NI: Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP120_NI: Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP0_I: Fertilizante

STP, dose 0 kg P_2O_5 ha⁻¹, com bioinoculante. STP120_I: Fertilizante STP, dose 120 kg P_2O_5 ha⁻¹, com bioinoculante.

Analisando os efeitos da inoculação, dose e fertilização, a família Pseudomonadaceae apresentou maior abundância quando se utilizou o fertilizante STP, na primeira safra (Tabela 8). Para a safra 2020/2021, Rhizobiaceae foi mais abundante nos tratamentos com fertilizante STP. A abundância relativa da família Methylobacteriaceae foi maior para as amostras inoculadas (Tabela 9). A inoculação não resultou em incrementos na abundância relativa das demais famílias bacterianas na primeira e segunda safras.

Tabela 8. Famílias bacterianas mais abundantes na rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2019/2020.

Tratamento		Sphingnomonadaceae	Pseudomonadaceae	Bacillaceae	Geobacteraceae
Inoculação	NI	6,77 a	8,01 a	5,76 a	4,86 a
	I	6,88 a	7,45 a	5,70 a	4,66 a
Fertilização	STP	7,04 a	8,84 a	5,05 a	5,13 a
	FNR	6,60 a	4,62 b	6,42 a	4,40 a
Dose (kg ha⁻¹)	0	6,95 a	8,05 a	4,69 a	4,85 a
	120	6,70 a	5,42 a	6,77 a	4,68 a
		Streptomycetaceae	Micrococcaceae	Methylobacteriaceae	Bradyrhizobiaceae
Inoculação	NI	36,16 a	16,16 a	11,11 a	8,32 a
	I	33,05 a	14,12 a	10,67 a	9,54 a
Fertilização	STP	33,01 a	15,24 a	11,39 a	8,32 a
	FNR	36,21 a	15,03 a	10,38 a	9,52 a
Dose (kg ha⁻¹)	0	34,30 a	15,42 a	10,48 a	8,08 a
	120	34,91 a	14,85 a	11,20 a	8,88 a
		Rhizobiaceae	Clostridiaceae		
Inoculação	NI	4,85 a	0,00 a		
	I	4,54 a	3,37 a		
Fertilização	STP	4,51 a	1,08 a		
	FNR	4,88 a	2,29 a		
Dose (kg ha⁻¹)	0	4,36 a	1,93 a		
	120	5,04 a	1,44 a		

Tabela 9. Famílias bacterianas mais abundantes na rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2020/2021.

Tratamento		Sphingnomonadaceae	Rhizobiaceae	Bacillaceae	Brucellaceae
Inoculação	NI	9,72 a	8,41 a	7,02 a	5,16 a
	I	8,87 a	5,85 a	6,74 a	4,01 a
Fertilização	STP	10,01 a	8,85 a	6,26 a	4,47 a
	FNR	8,57 a	5,41 b	7,50 a	4,62 a
Dose (kg ha⁻¹)	0	9,51 a	8,36 a	7,63 a	4,93 a
	120	9,07 a	5,90 a	6,12 a	4,24 a
		Streptomycetaceae	Micrococcaceae	Methylobacteriaceae	Bradyrhizobiaceae
Inoculação	NI	33,46 a	12,63 a	05,16 b	10,47 a
	I	40,36 a	12,01 a	13,70 a	08,46 a
Fertilização	STP	34,10 a	14,34 a	09,10 a	10,30 a
	FNR	39,72 a	12,21 a	09,78 a	08,63 a
Dose (kg ha⁻¹)	0	36,31 a	14,00 a	09,59 a	08,21 a
	120	37,52 a	12,83 a	09,27 a	10,72 a

Após realizar uma comparação da composição bacteriana entre as duas safras, observou-se que a família Micrococcaceae apresentou maior abundância relativa na primeira safra. Rhizobiaceae e Sphingomonadaceae apresentaram maior abundância relativa na segunda safra. As famílias Clostridiaceae, Geobacteraceae e Pseudomonadaceae foram identificadas apenas na safra 2019/2020 e Brucellaceae foi identificada apenas na safra 2020/2021 (Tabela 10).

Tabela 10. Comparativo da abundância relativa (AR) das famílias bacterianas da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado sob fertilização com fosfato de rocha (FNR) ou superfosfato triplo (STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Família	Safra	AR (%)		Família	Safra	AR (%)	
Bacillaceae	2019/2020	5,73	a	Pseudomonadaceae	2019/2020	6,73	a
	2020/2021	6,88	a		2020/2021	0,00	b
Bradyrhizobiaceae	2019/2020	8,93	a	Rhizobiaceae	2019/2020	4,69	b
	2020/2021	9,47	a		2020/2021	7,13	a
Clostridiaceae	2019/2020	1,68	a	Sphingomonadaceae	2019/2020	6,82	b
	2020/2021	0,00	b		2020/2021	9,29	a
Geobacteraceae	2019/2020	4,76	a	Streptomycetaceae	2019/2020	34,60	a
	2020/2021	0,00	b		2020/2021	36,91	a
Methylobacteriaceae	2019/2020	10,89	a	Micrococcaceae	2019/2020	15,13	a
	2020/2021	9,43	a		2020/2021	12,32	b
Brucellaceae	2019/2020	0,00	b				
	2020/2021	8,57	a				

Como o NMDS indicou que a comunidade bacteriana diferenciou significativamente entre as amostras inoculadas e não inoculadas dos tratamentos sem fertilizante e dos tratamentos com 120 kg ha⁻¹ do fertilizante STP na segunda safra, uma análise de Simper foi realizada para esses tratamentos para identificar as famílias que mais contribuíram para essas dissimilaridades. De acordo com essa análise Streptomycetaceae foi responsável por 40% da dissimilaridade entre as comunidades bacterianas do milho das amostras com 0 kg ha⁻¹ do fertilizante STP. Bradyrhizobiaceae e Streptomycetaceae foram responsáveis por 19,79% e 16,15%, respectivamente, da dissimilaridade entre as comunidades bacterianas do milho das amostras com 0 kg ha⁻¹ do fertilizante FNR e Streptomycetaceae foi responsável por

48,23% da dissimilaridade entre as comunidades bacterianas do milho das amostras com 120 kg ha⁻¹ do fertilizante STP.

Com base nas famílias bacterianas identificadas, o índice de Shannon, Simpson e Chao foram calculados para avaliar a diversidade das comunidades rizosféricas do milho. Na safra 2019/2020 as amostras não inoculadas apresentaram maiores índices de diversidade e os índices de Shannon e Chao foram maiores para os tratamentos com fertilizante FNR (Tabela 11). Na safra 2020/2021, os índices de diversidade foram maiores para os tratamentos com dose 0 kg ha⁻¹ e com o fertilizante STP. Nenhuma diferença significativa nos índices de diversidade foi observada comparando os tratamentos com e sem inoculante (Tabela 11).

Tabela 11. Índices de diversidade de Shannon, Simpson e Chao das famílias bacterianas da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Safr	Tratamento		Índice de Diversidade					
			Shannon		Simpson		Chao	
2019/2020	Inoculação	NI	2,82	a	0,93	a	20,75	a
		I	2,72	b	0,92	b	18,58	b
	Fertilização	STP	2,74	b	0,92	a	19,17	b
		FNR	2,79	a	0,93	a	20,17	a
	Dose (kg ha ⁻¹)	0	2,76	a	0,92	a	19,67	a
		120	2,77	a	0,93	a	19,67	a
2020/2021	Inoculação	NI	1,95	a	0,81	a	12,35	a
		I	2,01	a	0,80	a	13,13	a
	Fertilização	STP	2,05	a	0,82	a	14,06	a
		FNR	1,90	b	0,79	b	11,42	b
	Dose (kg ha ⁻¹)	0	2,03	a	0,82	a	13,43	a
		120	1,92	b	0,79	b	12,05	b

Os valores médios dos índices de diversidade das famílias bacterianas apontam que os índices de Simpson e Chao foram maiores na primeira safra (Tabela 12).

Tabela 12. Valores médios dos índices de diversidade de Shannon, Simpson e Chao das famílias bacterianas da rizosfera de milho nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Índice de diversidade	Safra	Valor	
Shannon	2019/2020	2,77	a
	2020/2021	1,98	a
Simpson	2019/2020	0,92	a
	2020/2021	0,81	b
Chao	2019/2020	19,67	a
	2020/2021	12,74	b

A composição fúngica do solo rizosférico mostrou que os dois filos mais abundantes nas duas safras avaliadas foram Basidiomycota e Ascomycota. Desses filos, as famílias mais abundantes nas duas safras foram Saccharomycetaceae e Tremellaceae (Figura 6A e 6B).

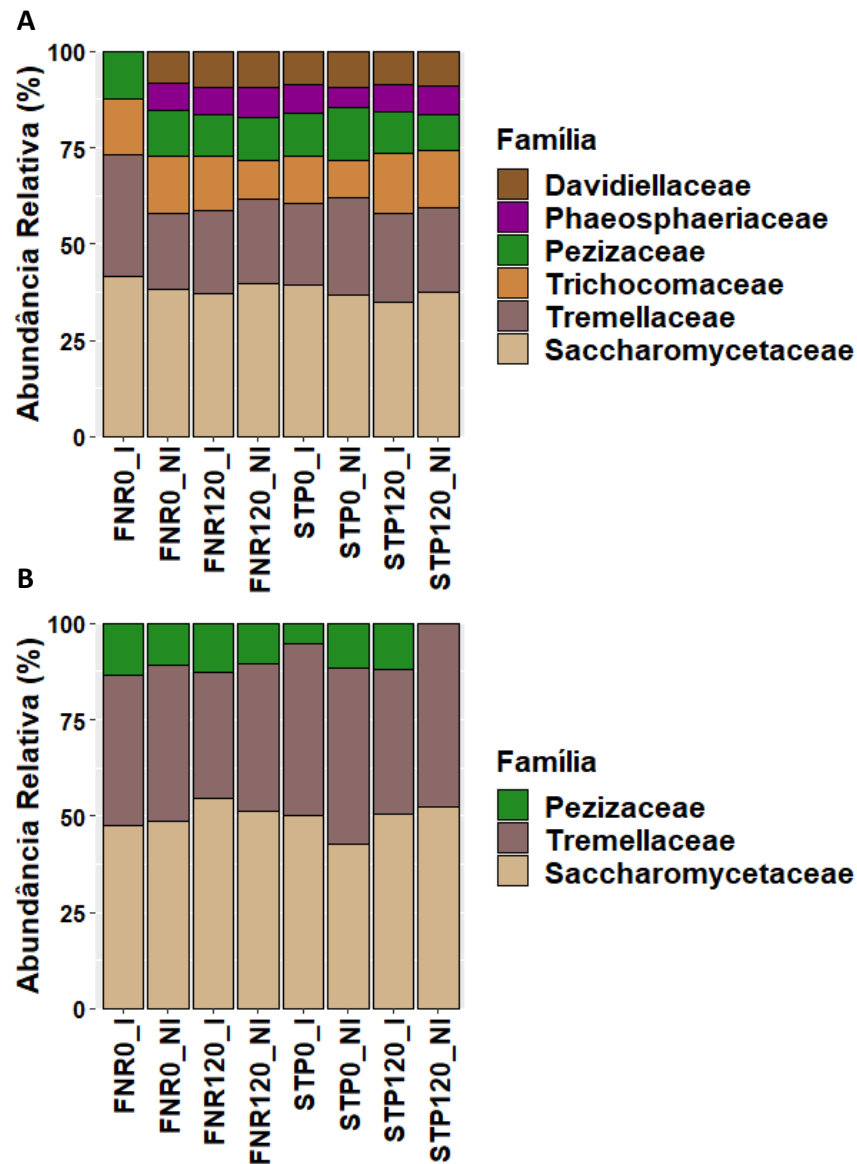


Figura 6. Abundância relativa das famílias da comunidade fúngica na rizosfera de milho nas safras (A) 2019/2020 e (B) 2020/2021 com uma abundância relativa superior a 3%. FNR0_NI: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante, FNR120_NI: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. FNR0_I: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. FNR120_I: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. STP0_NI: Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP120_NI: Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP0_I: Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. STP120_I: Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante.

Observou-se que a família *Pezizaceae* foi mais abundante nas amostras com dose 0 kg ha⁻¹ de fertilizante na safra 2019/2020. Para a safra 2020/2021 a família *Tremellaceae* foi mais abundante nas amostras tratadas com fertilizante STP (Tabela 13). Comparando a composição fúngica das famílias entre as duas safras, observou-se que as famílias *Saccharomycetaceae* e *Tremellaceae* foram mais abundantes na segunda safra. As famílias *Phaeosphaeriaceae*, *Trichocomaceae* e *Davidiellaceae* foram mais abundantes na primeira safra (Tabela 14).

Tabela 13. Famílias fúngicas mais abundantes da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Safra	Tratamento		Saccharomycetaceae	Tremellaceae	Trichocomaceae	Pezizaceae
2019/2020	Inoculação	NI	38,12 a	22,02 a	12,52 a	11,59 a
		I	38,32 a	24,23 a	14,11 a	11,24 a
	Fertilização	STP	37,24 a	22,66 a	13,17 a	11,23 a
		FNR	39,30 a	23,59 a	13,45 a	11,59 a
	Dose (kg ha ⁻¹)	0	39,02 a	24,36 a	12,87 a	12,33 a
		120	37,42 a	21,89 a	13,75 a	10,50 b
			Phaeosphaeriaceae	Davidiellaceae		
	Inoculação	NI	11,59 a	8,93 a		
		I	11,24 a	6,70 a		
	Fertilização	STP	11,23 a	8,89 a		
		FNR	11,60 a	6,73 a		
	Dose (kg ha ⁻¹)	0	12,33 a	6,56 a		
		120	10,50 a	9,07 a		
Safra	Tratamento		Saccharomycetaceae	Tremellaceae	Pezizaceae	
2020/2021	Inoculação	NI	48,78 a	42,97 a	08,25 a	
		I	50,81 a	38,38 a	10,81 a	
	Fertilização	STP	49,02 a	43,70 a	07,28 a	
		FNR	60,57 a	37,66 b	11,77 a	
	Dose (kg ha ⁻¹)	0	47,30 a	42,38 a	10,31 a	
		120	52,28 a	38,98 a	08,74 a	

Tabela 14. Comparativo da abundância relativa (AR) das famílias fúngicas entre as safras 2019/2020 e 2020/2021.

Família	Safra	AR (%)		Família	Safra	AR (%)	
Davidiellaceae	2019/2020	7,81	a	Pezizaceae	2019/2020	11,41	a
	2020/2021	0,00	b		2020/2021	9,53	a
Phaeosphaeriaceae	2019/2020	6,11	a	Saccharomycetaceae	2019/2020	38,22	b
	2020/2021	0,00	b		2020/2021	49,79	a
Tremellaceae	2019/2020	23,12	b	Trichocomaceae	2019/2020	13,31	a
	2020/2021	40,68	a		2020/2021	0,00	b

Como o NMDS indicou algumas diferenças na composição da comunidade fúngica entre as amostras inoculadas e não inoculadas dos tratamentos com dose 120 kg ha⁻¹ de fertilizante FNR ou STP na segunda safra, realizou-se a análise de Simper para estes tratamentos visando identificar as famílias fúngicas que mais contribuíram para as dissimilaridades. De acordo com essa análise, Saccharomycetaceae foi responsável por 62,48 % da dissimilaridade entre as comunidades fúngicas entre as amostras inoculadas e não inoculadas dos tratamentos com 120 kg P₂O₅ ha⁻¹ de FNR. Pezizaceae foi responsável por 55,62% e Saccharomycetaceae foi responsável por 40,71% da dissimilaridade nas comunidades fúngicas entre as amostras inoculadas e não inoculadas dos tratamentos com 120 kg P₂O₅ ha⁻¹ de STP.

Com base nas famílias fúngicas identificadas, o índice de Shannon, Simpson e Chao foram calculados para avaliar a diversidade das comunidades rizosféricas do milho. Na safra de 2019/2020 (Tabela 15) os índices de Shannon e Simpson foram maiores para os tratamentos com 120 kg ha⁻¹ de fertilizante. Na safra 2020/2021 (Tabela 15) nenhuma diferença significativa foi observada nos índices de diversidade em relação aos níveis de cada tratamento.

Tabela 15. Índices de diversidade de Shannon, Simpson e Chao das famílias fúngicas da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Safra	Tratamento		Índice de Diversidade					
			Shannon		Simpson		Chao	
2019/2020	Inoculação	NI	2,65	a	0,88	a	37,46	a
		I	2,65	a	0,87	a	38,78	a
	Fertilização	STP	2,68	a	0,88	a	40,55	a
		FNR	2,63	a	0,87	a	35,69	a
	Dose (kg ha ⁻¹)	0	2,52	b	0,86	b	36,03	a
		120	2,79	a	0,89	a	40,22	a
2020/2021	Inoculação	NI	1,43	a	0,68	a	11,25	a
		I	1,50	a	0,69	a	11,79	a
	Fertilização	STP	1,43	a	0,68	a	11,37	a
		FNR	1,50	a	0,69	a	11,67	a
	Dose (kg ha ⁻¹)	0	1,48	a	0,69	a	11,60	a
		120	1,45	a	0,68	a	11,44	a

Os valores médios dos índices de diversidade das famílias fúngicas apontam que os índices de diversidade foram maiores na primeira safra (Tabela 16).

Tabela 16. Valores médios dos índices de diversidade de Shannon, Simpson e Chao das famílias fúngicas da rizosfera de milho nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Índice de diversidade	Safra	Valor
Shannon	2019/2020	3,03 a
	2020/2021	1,83 b
Simpson	2019/2020	0,94 a
	2020/2021	0,81 b
Chao	2019/2020	25,08 a
	2020/2021	7,79 b

5.6. AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA FORAM DIFERENTES ENTRE AS DUAS SAFRAS

A atividade da fosfatase alcalina foi maior nos tratamentos com FNR na safra 2019/2020 (Tabela 17).

Tabela 17. Atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina no solo da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Safr	Tratamento		Atividade Enzimática (µg pnitrofenol h ⁻¹ g ⁻¹ de solo)			
			Fosfatase ácida		Fosfatase alcalina	
2019/2020	Inoculação	NI	376,3	a	260,8	a
		I	392,3	a	272,4	a
	Fertilização	STP	390,3	a	238,2	b
		FNR	378,3	a	295,2	a
	Dose (kg ha ⁻¹)	0	391,2	a	275,3	a
		120	377,2	a	257,9	a
2020/2021	Inoculação	NI	711,9	a	403,4	a
		I	690,2	a	406,0	a
	Fertilização	STP	691,9	a	406,5	a
		FNR	710,3	a	402,9	a
	Dose (kg ha ⁻¹)	0	698,8	a	429,2	a
		120	703,4	a	380,3	a

Observou-se que, para a todos os tratamentos avaliados, os valores das atividades enzimáticas da fosfatase ácida e fosfatase alcalina foram maiores na segunda safra (Tabela 18).

Tabela 18. Comparação entre safras da atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina para os diferentes tratamentos avaliados.

Tratamento	Atividade Enzimática (μg pnitrofenol $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de solo)							
	Fosfatase Ácida				Fosfatase Alcalina			
	2019/2020		2020/2021		2019/2020		2020/2021	
FNR0_I	314,6	b	737,2	a	284,9	b	395,6	a
FNR120_I	444,3	b	671,5	a	304,9	a	401,8	a
STP0_I	443,6	a	667,9	a	261,3	b	446,5	a
STP120_I	302,7	b	684,3	a	238,5	b	380,1	a
FNR0_NI	359,6	b	710,6	a	308,2	a	445,4	a
FNR120_NI	393,9	b	722,4	a	282,3	b	368,9	a
STP0_NI	446,9	a	680,1	a	246,8	b	429,2	a
STP120_NI	367,9	b	735,3	a	206,1	b	370,4	a

FNR0_NI: Fertilizante FNR, dose 0 kg $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$, sem bioinoculante, FNR120_NI: Fertilizante FNR, dose 120 kg $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$, sem bioinoculante., FNR0_I: Fertilizante FNR, dose 0 kg $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$, com bioinoculante, FNR120_I: Fertilizante FNR, dose 120 kg $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$, com bioinoculante, STP0_NI: Fertilizante STP, dose 0 kg $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$, sem bioinoculante, STP120_NI: Fertilizante STP, dose 120 kg $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$, sem bioinoculante, STP0_I: Fertilizante STP, dose 0 kg $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$, com bioinoculante, STP120_I: Fertilizante STP, dose 120 kg $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$, com bioinoculante,

O índice pluviométrico médio da segunda safra (13,2 mm) foi maior que na primeira safra (9,3 mm), o que pode ter influenciado nos maiores valores de atividade enzimática na safra 2020/2021 (Figura 7). A temperatura mínima apresentou maior valor médio na primeira safra.

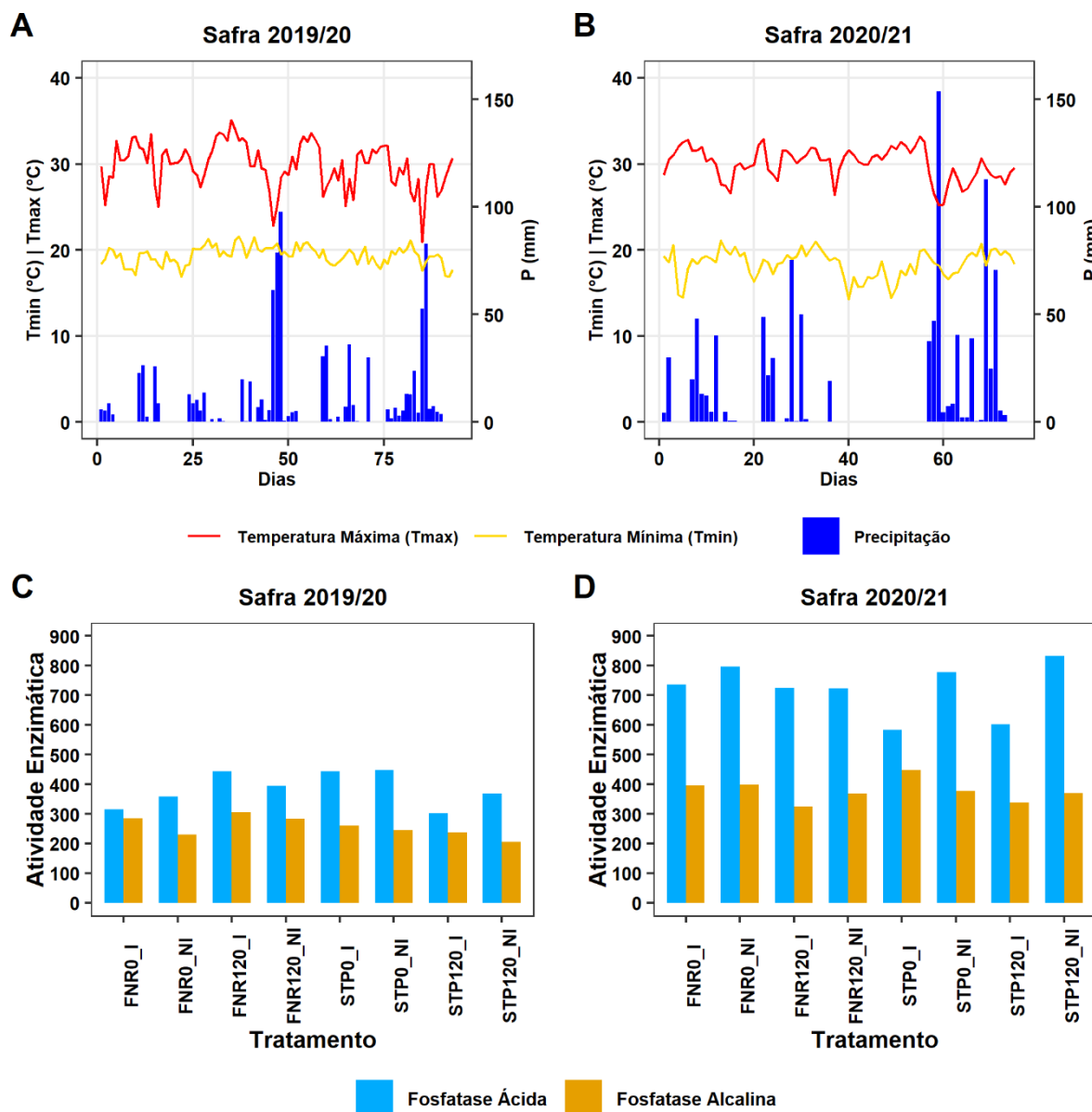


Figura 7. Temperatura mínima (Tmin), temperatura máxima (Tmax) e precipitação (P) (Figura 10A e 10B) e atividade enzimática da fosfatase ácida e alcalina (Figura 10C e 10D) nas safras (A e C) 2019/2020 e (B e D) 2020/2021. FNR0_NI: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante, FNR120_NI: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. FNR0_I: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. FNR120_I: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. STP0_NI: Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP120_NI: Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP0_I: Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. STP120_I: Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante.

5.7. EFEITO DOS TRATAMENTOS NA ARQUITETURA RADICULAR DO MILHO, NOS ÍNDICES DE DIVERSIDADE E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS

A análise de componentes principais (ACP) revelou que, na primeira safra (Figura 8A), o primeiro componente principal (CP1) e segundo componente principal (CP2) juntos corresponderam a 77,1% das variações observadas (Tabela 19), sendo que a área da raiz (AREA) e a largura da raiz derivada de uma transformação do eixo medial (SKL_WIDTH) foram as variáveis que mais contribuíram para explicação dos dados com contribuições iguais a 13% e 14,1%, respectivamente. Na segunda safra (Figura 8B), o primeiro componente principal (CP1) e segundo componente principal (CP2) juntos responderam por 77,8% das variações (Tabela 19). A largura máxima da raiz (WIDTH_MAX) e SKL_WIDTH foram as variáveis que mais contribuíram para explicação dos dados com contribuições iguais a 13,6 e 12,2%, respectivamente (Tabela 19).

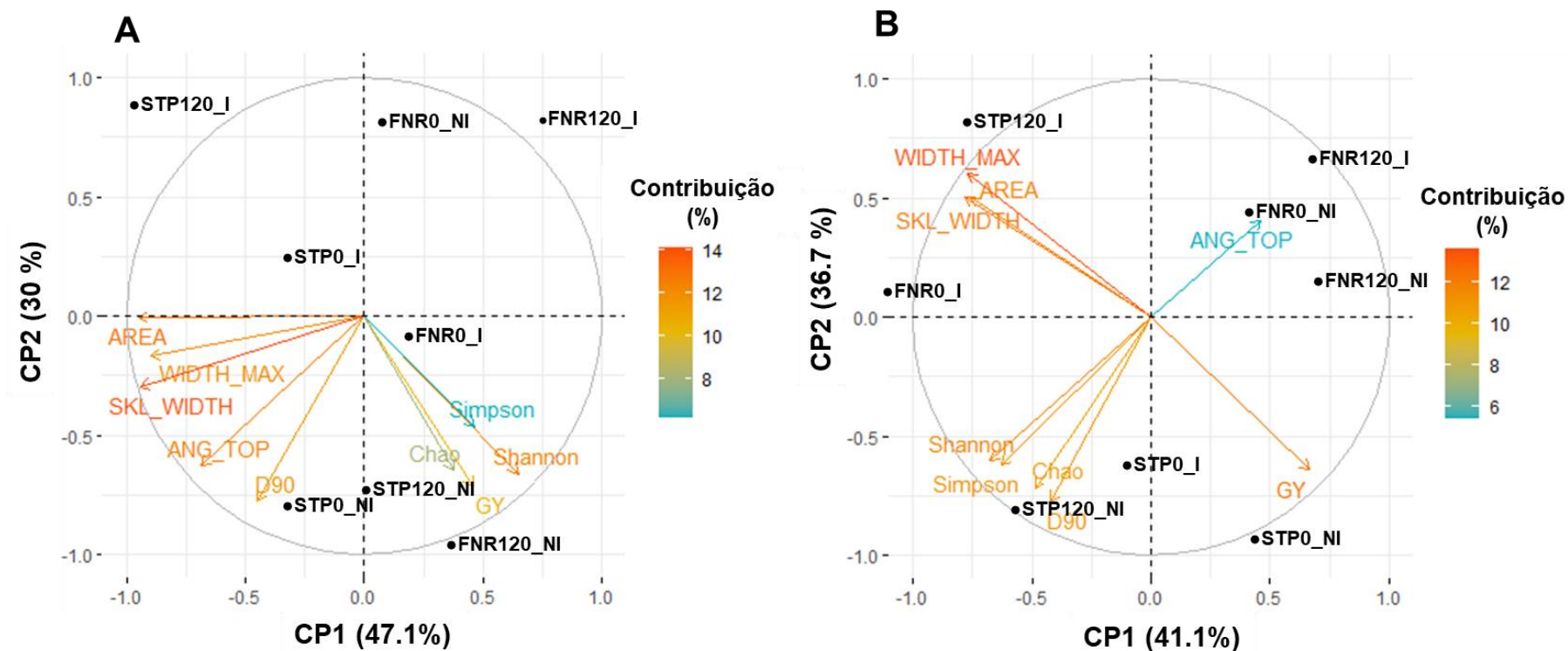


Figura 8. Análise de componentes principais (ACP) nas safras (A) 2019/2020 e (B) 2020/2021 para as características: Largura máxima do sistema radicular medida horizontalmente (WIDTH_MAX), Largura do esqueleto calculada a partir do eixo medial (SKL_WIDTH), *Root Top Angle* medido entre a linha de ajuste *Random Sample Consensus* na profundidade do valor D10 e a linha horizontal do solo (ANG_TOP), Área Raiz Projetada (AREA), Porcentagem de acúmulo de largura a 90% de profundidade (D90), índice de diversidade (Shannon), Índice de dominância (Simpson) Estimativa de riqueza (Chao), produtividade da safra (GY). FNR0_NI: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante, FNR120_NI: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. FNR0_I: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. FNR120_I: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. STP0_NI: Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP120_NI: Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP0_I: Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. STP120_I: Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante.

Tabela 19 Contribuição das características da arquitetura do sistema radicular (ASR), diversidade genética de microrganismos e produtividade de milho nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

2019/2020				2020/2021			
Característica ASR	CP1	CP2	Contribuição (%)	Característica ASR	CP1	CP2	Contribuição (%)
AREA	-0,94	-0,003	13,0	AREA	-0,75	0,50	11,8
WIDTH_MAX	-0,89	-0,16	12,0	WIDTH_MAX	-0,76	0,60	13,6
D90	-0,44	-0,77	11,6	D90	-0,42	-0,77	11,1
SKL_WIDTH	-0,94	-0,29	14,1	SKL_WIDTH	-0,78	0,50	12,3
ANG_TOP	-0,68	-0,62	12,5	ANG_TOP	0,46	0,40	5,4
Shannon	0,64	-0,66	12,3	Shannon	-0,67	-0,60	11,7
Simpson	0,46	-0,46	6,2	Simpson	-0,62	-0,62	11,1
Chao	0,37	-0,67	8,1	Chao	-0,48	-0,71	10,8
Produtividade	0,45	-0,71	10,4	Produtividade	0,66	-0,64	12,2
Autovalor	4,24	2,70		Autovalor	3,7	3,3	
Variância acumulada (%)	47,1	29,98		Variância acumulada (%)	41,1	36,73	

Na primeira safra os tratamentos não inoculados e com dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹ do fertilizante FNR ficaram no quadrante inferior direito e mostraram maiores índices de diversidade (Figura 8A). A produtividade também ficou localizada nesse quadrante, mas resultados anteriores indicaram que não houve diferença significativa nos valores da produtividade entre os diferentes tratamentos (Tabela 3). O tratamento STP0_NI (Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹ e sem bioinoculante) ficou no quadrante inferior esquerdo juntamente com as características ASR, porém estas características não se diferenciaram entre os tratamentos na safra 2019/2020 (Tabela 5). As características da ASR apresentaram correlação positiva entre si e as características AREA, WIDTH_MAX e SKL_WIDTH apresentaram correlação negativa com a produtividade e com os índices de diversidade (Figura 8A).

Na segunda safra o tratamento com dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹ do fertilizante STP e com inoculante (STP120_I) ficou no quadrante superior esquerdo juntamente com a área e largura da raiz representadas por (AREA, WIDTH_MAX e SKL_WIDTH) (Figura 8B). A maioria dos tratamentos com fertilizante FNR ficaram no quadrante superior direito (FNR0_NI, FNR120_NI e FNR120_I) juntamente com o ângulo da raiz

(ANG_TOP). O tratamento STP120_NI ficou no quadrante inferior esquerdo e mostrou maiores índices de diversidade (maiores nos tratamentos com fertilizante STP e com dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹) e maior densidade de raízes (D90 maior nos tratamentos com fertilizante STP). O tratamento não inoculado e com dose 0 do fertilizante STP ficou no quadrante inferior direito apresentando maior produtividade (Figura 8B). Assim como na primeira safra, as características da ASR AREA, WIDTH_MAX e SKL_WIDTH apresentaram correlação negativa com a produtividade e com os índices de diversidade (Figura 8B). No entanto houve um remodelamento na segunda safra de forma que a área e largura das raízes apresentaram correlação negativa com as outras características da ASR, a densidade de raízes a 90 cm de profundidade e o ângulo da raiz.

5.8. O NITROGÊNIO DOS GRÃOS APRESENTOU O MAIOR EFEITO POSITIVO DIRETO NA PRODUTIVIDADE NAS DUAS SAFRAS

As estimativas dos efeitos diretos e indiretos de variáveis primárias da planta e do solo sobre a variável básica (produtividade de grãos) na cultura do milho DKB390 na primeira (2019/2020) e segunda (2020/2021) safras (Figura 9) indicaram que a área da raiz (AREA) e o N grãos (NG) foram as variáveis que apresentaram maior efeito positivo direto na produtividade na primeira safra (Figura 9A). Assim, quanto maiores a área da raiz e as concentrações de nitrogênio nos grãos, maior a produtividade. Outros efeitos diretos positivos na produtividade foram observados para as fosfatases, K grãos (KG) e índice de diversidade de Simpson (SIMPSON_DI). A largura da raiz (WIDTH_MAX), o ângulo da raiz (ANG_TOP) e P grãos (PG) apresentaram um efeito direto negativo na produtividade na primeira safra.

Na segunda safra (Figura 9B), N grãos (NG) apresentou efeito positivo direto na produtividade. Outros efeitos diretos positivos na produtividade foram observados para as variáveis diâmetro da espiga (DIAM), AREA e ANG_TOP, SIMPSON_DI, PG e fosfatase alcalina (ALP). A largura da raiz (WIDTH_MAX), fosfatase ácida (AP) e potássio dos grãos (KG) apresentaram um efeito direto negativo na produtividade na segunda safra. Tanto na primeira quanto na segunda safras, a maioria das variáveis analisadas apresentaram efeito positivo indiretamente sobre a produtividade através do nitrogênio dos grãos (Tabela S7).

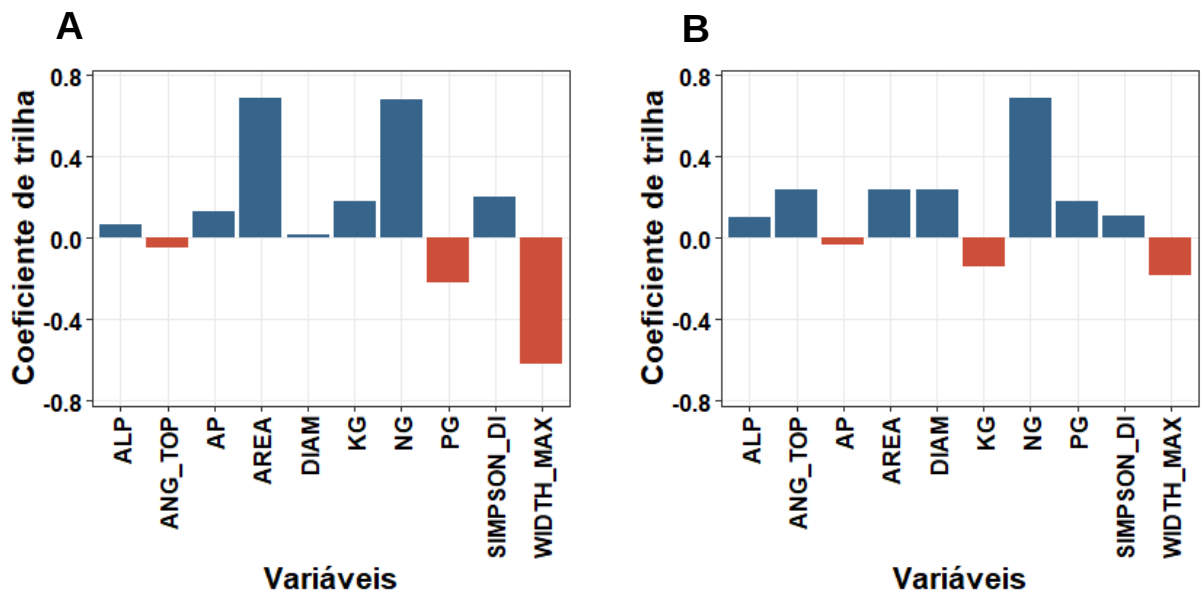


Figura 9. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos de variáveis da planta e do solo sobre a variável básica (produtividade de grãos), na cultura do milho DKB390 avaliada nas safras **A:** 2019/2020 e **B:** 2020/2021. ALP: Atividade enzimática da fosfatase alcalina, AP: Atividade enzimática da fosfatase ácida, DIAM: Diâmetro da espiga, KP: Potássio nos grãos, NG: Nitrogênio nos grãos, PG: Fósforo nos grãos, WIDTH_MAX: Largura máxima do sistema radicular medida horizontalmente, ANG_TOP: *Root Top Angle* medido entre a linha de ajuste *Random Sample Consensus* na profundidade do valor D10 e a linha horizontal do solo, ÁREA: Área Raiz Projetada, Simpson_DI: Índice de dominância, GY: produtividade da safra.

6. DISCUSSÃO

O solo do campo experimental utilizado possui histórico de sucessivas aplicações de fertilizantes. Assim, a análise inicial do solo indicou que a área do campo experimental apresentou alta concentração de fósforo no solo, provavelmente pelo efeito residual cumulativo de experimentos anteriores, que contribuíram para a sua alta fertilidade. Diante disso, a produtividade média de grãos de milho foi estatisticamente igual entre a maioria dos tratamentos analisados (Tabelas 3 e 4). Por outro lado, a produtividade foi próxima a observada em outros estudos (Cardoso et al., 2011; Carvalho et al., 2011; Campolino, 2021), indicando que o híbrido pode ter atingido o seu potencial produtivo para a região.

Há evidências de que as plantas respondem melhor a inoculação em condições de baixa fertilidade ou estresse. Leggett et al. (2015) observaram que a inoculação com *Penicillium bilaiae* foi mais eficaz no aumento da produtividade do milho em solos com níveis baixos ou muito baixos de fósforo. Em solos com baixa fertilidade de fósforo, a inoculação com as bactérias *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Priestia megaterium* (CNPMS B119) levou a um aumento significativo na produtividade de grãos. Em solos com altos níveis de fósforo, a estirpe B119 exibiu maior capacidade de aumentar a produtividade de grãos em comparação com a estirpe B2084, especialmente quando adubadas com TSP (Oliveira-Paiva et al., 2024). A inoculação com as bactérias *P. fluorescens* S3X e *C. necator* 1C2 melhoraram o crescimento do milho e a eficiência no uso de nitrogênio e fósforo em condições de déficit hídrico (Pereira et al., 2020) e as estirpes *Sinorhizobium* sp. A15, *Bacillus* sp. A28, *Sphingomonas* sp. A55 e *Enterobacter* sp. P24 aumentaram o rendimento de grãos de milho em solos com baixo teor de nitrogênio e deficientes em fósforo (Chen et al., 2021).

Os resultados indicaram que apesar de haver algumas diferenças fenotípicas nas plantas de milho entre as safras, elas não impactaram na produção. O fertilizante fosfato de rocha (FNR) apresentou eficiência agrônômica similar à obtida com o STP na primeira safra, sendo superior quando considerados os efeitos residuais na segunda safra. Cabe ressaltar, que o fertilizante FNR não foi reaplicado em 2020/2021, não sendo repostado o P retirado pelas plantas na primeira safra para este

tratamento, visando a avaliação do seu efeito residual. O uso de FNR pode contribuir para fertilização das culturas, sendo a sua disponibilização aumentada com o uso de bioinoculantes, como os que contêm bactérias solubilizadoras de fosfato ou com a ação da microbiota endêmica. Portanto, fontes menos reativas de fertilizante fosfatado e inoculantes biológicos combinados ao uso de genótipos de plantas mais eficientes e responsivos à inoculação, podem permitir a redução da quantidade de fertilizantes fosfatados aplicados anualmente nas áreas agrícolas.

Os tratamentos com inoculante biológico e com diferentes doses de adubação fosfatada não apresentaram diferença nas características da arquitetura radicular (Tabela 5). Em um estudo em condições controladas, a inoculação com as mesmas estirpes de *Bacillus* levou ao aumento na área total da superfície da raiz de plântulas de milho (Sousa et al., 2021). A arquitetura radicular pode variar com a concentração de P disponível, tipo de solo, tempo de amostragem, espécie da planta e genótipo (Liu, 2021). O crescimento das raízes é vital para as plantas, no entanto a expansão radicular demanda gasto energético (Herrmann e Colombi, 2019). Assim, o alto teor de fósforo no solo pode ter sido fator importante para que não tenha ocorrido resposta positiva à inoculação e/ou à adubação fosfatada.

Os tratamentos de fertilização e inoculação aplicados não influenciaram de maneira relevante os valores das abundâncias relativas das famílias bacterianas (Tabelas 8 e 9) e fúngicas (Tabelas 13), indicando uma estabilidade na composição microbiana em resposta às condições experimentais. Esses achados corroboram com os resultados de Ferrarezi et al. 2022, em que os tratamentos com inoculante bacteriano não tiveram efeito significativo sobre a abundância bacteriana associada às raízes do mesmo genótipo de milho utilizado neste estudo (DKB390).

A família bacteriana Streptomycetaceae foi a mais abundante nas duas safras (Figura 5) e Saccharomycetaceae foi a família fúngica mais abundante (Figura 6). Essas duas famílias apresentam diferentes espécies que possuem genes que codificam para as enzimas fosfatases (Tabassum et al., 2017, Nahas et al., 2018, Bousselham et al., 2022). Recentemente, pesquisas mostraram que *Streptomyces* sp. são produtoras de metabólitos bioativos que ajudam a melhorar a fertilidade do solo, promovem o crescimento e desenvolvimento das plantas, fornecem defesa contra

fitopatógenos e têm a capacidade de resistir a vários estresses ambientais (Bousselham et al., 2022). *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, é considerado um fungo leveduriforme promissor para promover o crescimento de plantas de diferentes culturas. Devido ao seu conteúdo de citocinina e triptofano (um precursor do ácido indolacético), a levedura desempenha um papel benéfico na divisão e crescimento celular e no crescimento vegetativo da planta. A levedura também é considerada um microrganismo promotor de crescimento por melhorar a absorção de P e manganês pelas raízes das plantas e devido ao seu uso potencial como agente de biocontrole de patógenos de plantas (Karajeh, 2013).

Observou-se que a abundância relativa das famílias fúngicas Saccharomycetaceae e Tremellaceae foram significativamente maiores em 2020/2021 em comparação com a safra 2019/2020 (Tabela 14). Além disso, Saccharomycetaceae, Pezizaceae e Tremellaceae foram as únicas famílias fúngicas que prevaleceram na segunda safra. Essas três famílias pertencem a filos diferentes: Saccharomycetaceae e Pezizaceae pertencem ao filo Ascomycota e Tremellaceae pertence ao filo Basidiomycota. No entanto, esses fungos se reproduzem através da produção de esporos, o que pode ter contribuído para dispersão e sobrevivência dos mesmos, resultando em maior abundância na segunda safra.

As maiores abundâncias relativas das famílias Streptomycetaceae e Saccharomycetaceae na safra 2020/2021 condisseram com o aumento das atividades enzimáticas da fosfatase ácida e alcalina da primeira para a segunda safra (Tabela 18). As enzimas fosfatase são produzidas por bactérias, fungos e raízes de plantas e servem para separar o grupamento fosfato de seus substratos, transformando formas complexas e às vezes indisponíveis de P orgânico em fosfato inorgânico assimilável. Assim, a produção de fosfatase depende de uma combinação de demanda de P pelas plantas e microrganismos, do substrato de P orgânico disponível e limitação de P do solo, do pH do solo e da disponibilidade de água, sendo que a falta de água pode ser responsável pelos níveis extremamente baixos de biomassa microbiana e atividade da fosfatase (Daunoras et al., 2024; Margalef et al., 2017).

Observou-se também que os valores de atividade enzimática da fosfatase ácida foram maiores que fosfatase alcalina nas duas safras (Figura 7) uma vez que o solo

do campo experimental é um solo ácido (Rojo et al., 1990). A fosfatase ácida é produzida tanto por plantas quanto microrganismos e a fosfatase alcalina é produzida exclusivamente pela atividade microbiana (Oberson et al., 1996). Além disso, a maior atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina na segunda safra coincidiu com os maiores índices pluviométricos na segunda safra (Figura 7). Mudanças climáticas alteram a composição das comunidades microbianas e afetam as atividades enzimáticas pois as enzimas são muito sensíveis às mudanças de temperatura, umidade e às suas interações com seus substratos. A disponibilidade de água no solo, por exemplo, influencia tanto a atividade microbiana quanto a difusão de nutrientes solúveis e razões baixas de água no solo podem limitar o processo de difusão e a disponibilidade de substrato para as enzimas (Siddique et al., 2023). Assim, nossos resultados corroboraram com os resultados de Huang et al., 2011 em que a atividade das fosfatases foram impulsionadas pela sazonalidade da precipitação, com valores de atividade da fosfatase ácida significativamente maiores em condição de maior precipitação. Margalef et al., 2017 também verificaram que temperaturas e precipitações mais altas estão positivamente associadas à atividade da fosfatase.

A diversidade alfa, avaliada com base nas famílias bactérias e fúngicas, mostrou índices de diversidade mais baixos na segunda safra. Esse fenômeno pode estar relacionado aos maiores índices de pluviométricos. A precipitação é um fator ambiental importante que afeta as comunidades microbianas da rizosfera, pois os microrganismos do solo são sensíveis a alterações no ambiente. Mudanças na precipitação impactam diretamente a umidade do solo, podendo alterar, assim, a abundância e composição dos microrganismos presentes. No entanto, ainda não existe um consenso sobre a resposta da diversidade microbiana do solo em relação às alterações da precipitação (Yang et al., 2021; Dong et al., 2024). Além disso, os índices de Simpson calculados para comunidade bacteriana e fúngica apresentaram valores próximos de 1 e os índices de Shannon foram moderados, indicando uma comunidade menos diversa e com maior dominância em ambas as safras (He e Hu, 2005). Provavelmente a dominância das famílias mais abundantes está relacionada a uma maior adaptação as mudanças climáticas observadas do que aos tratamentos de fertilização e inoculação avaliados.

Inúmeros fatores afetam o desenvolvimento das plantas e o sucesso da associação de plantas com microrganismos depende do genótipo da planta utilizada, da estirpe bacteriana inoculada, manejo do solo e dos fatores ambientais. Os resultados indicaram que uma planta já adaptada ao clima da região e crescendo em um solo que possui nutrientes disponíveis, não precisa investir no aumento do sistema radicular. Portanto, uma vez atingido o potencial produtivo do cultivar na região, nem a aplicação de fertilizantes e nem a inoculação resultam no aumento da produtividade, indicando que é necessário o monitoramento de fertilidade das áreas com precisão visando uma maior sustentabilidade ambiental e econômica.

7. CONCLUSÃO

Não foram encontradas diferenças significativas na produtividade dos grãos de milho entre as duas safras nem benefícios adicionais com o uso de fertilizantes e bioinoculante. A comunidade microbiana da rizosfera e as características da arquitetura do sistema radicular não apresentaram variações entre os tratamentos com e sem bioinoculante, nem entre os diferentes tipos de fertilizantes utilizados, muito provavelmente devido as características intrínsecas do genótipo DKB390, já adaptado a região do Cerrado e não responsivo a inoculação, e a alta fertilidade do solo cultivado.

Os resultados evidenciaram a importância de investigar o efeito de diferentes tipos de fertilizantes e bioinoculantes em várias espécies de plantas, bem como em diferentes tipos de solo e regiões edafoclimáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, C. S., Figueiredo, J. E. F., Oliveira, C. A., Santos, V. L., Gomes, E. A., Ribeiro, V. P., Barros, B. B., Lana, U. G. P., Marriel, I. E. 2017. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genet. Mol.* <https://doi.org/10.4238/gmr16019294>.
- Bashan, Y., Bashan, L. E., Prabhu, S. R., Hernandez, J. P., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, v. 378, n. 1–2, p. 1–33, <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>.
- Bedin, I., Neto, A. E., Resende, A. V., Faquin, V., Tokura, A. M., Santos, J. Z. L. 2003. Fertilizantes fosfatados e produção da soja em solos com diferentes capacidades tampão de fosfato. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 27, n. 4, p. 639–646. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832003000400008>.
- Benedito, D. S., Prochnow, L. I., Silverol, A. C., Toledo, M. C. M. 2010. Eficiência agrônômica de compostos organominerais obtidos pelo processo humifert. *Bragantia*, v. 69, n. 1, p. 191–199. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052010000100024>.
- Benmrid, B., Ghoulam, C., Zeroual, Y., Kouisni, L., Bargaz, A. 2023. Bioinoculants as a means of increasing crop tolerance to drought and phosphorus deficiency in legume-cereal intercropping systems. *Communications Biology*, v. 6, n. 1, p. 1016, 2023. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05399-5>.
- Bi, W., Weng, B., Denghua, Yan., Hao, W., Mengke, W., Siying, Y., Jing, L., Liu, T., Wenjuan, C. 2022. Responses of phosphate-solubilizing microorganisms mediated phosphorus cycling to drought-flood abrupt alternation in summer maize field soil. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 768921. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.768921>.
- Bioma. BiomaPhos. Disponível em: <<https://www.bioma.ind.br>>. Acesso em 31 de Janeiro de 2024.
- Bousselham, M., Lemriss, S., Dhiba, D., Aallam, Y., Souiri, A., Abbas, Y., Saidi, N., Boukcim, H., Hamdali, H. 2022. Streptomycetaceae and Promicromonosporaceae: Two Actinomycetes Families from Moroccan Oat Soils Enhancing Solubilization of Natural Phosphate. *Microorganisms*, 10(6), 1116,

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10061116>.

Bucksch, A., Burrridge, J., York, L. M., Das, A., Nord, E., Weitz, J. S. 2014. Image-based high-throughput field phenotyping of crop roots. *Plant Physiol*, n. 166, p.470–486, <https://doi.org/10.1104/pp.114.243519>.

Caffaro-Filho, R. A., Fantinatti-Garboggini, F., Durrant, L. R. 2007. Quantitative analysis of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) microbial community profiles: Peak height data showed to be more reproducible than peak area. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 4, p. 736–738. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400027>.

Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J. W. 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, v. 383, n. 1–2, p. 3–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>.

Campolino, M. L. Comunidade microbiana rizosférica e morfo-fisiologia de raízes de genótipos de milho e sorgo adubados com fosfatos de diferentes reatividades e doses de fósforo. Tese (Doutorado em Bioengenharia). Universidade Federal de São João Del-Rei. 2021.

Campolino, M. L., Paula, U. G. L., Gomes, E. A., Coelho, A. M., DE SOUSA, S. M, 2022. Phosphate fertilization affects rhizosphere microbiome of maize and sorghum genotypes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-13, <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00747-9>.

Campolino, M. L., Santos, T. T., Lana, U. G. P., Gomes, E. A., Guilhen, J. H. S., Pastina, M. M., Coelho, A. M., Sousa, S. M. 2023. Crop type determines the relation between root system architecture and microbial diversity indices in different phosphate fertilization conditions. *Field Crops Research*, v. 295, p. 108893. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2023.108893>.

Cardoso, M. J., de Carvalho, H. W. L., Pacheco, C. A. P., Rocha, L. M. P., Guimarães, L. J. M., Guimaraes, P. D. O., Oliveira, I. R. 2011. Rendimento de grãos de híbridos comerciais de milho nas regiões Sul, Centro-Sul e Leste Maranhense. Comunicado Técnico (CPAMN).

Carvalho, R. P., Von Pinho, R. G., Davide, L. M. C. 2011. Desempenho de cultivares de milho quanto à eficiência de utilização de nitrogênio. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 10, n. 2, p. 108-120. <http://dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v10n2p108-120>.

Chao, A., Bunge, J. 2002. Estimating the number of species in a stochastic abundance model. *Biometrics* 58, 531-539, <https://doi.org/10.1111/j.0006-341x.2002.00531.x>.

Chen, J., Arafat, Y., Wu, L., Xiao, Z., Li, Q., Khan, M. A., Khan, M. U., Lin, S., Lin, W. 2018. Shifts in soil microbial community, soil enzymes and crop yield under peanut/maize intercropping with reduced nitrogen levels. *Applied Soil Ecology*, v. 124, n. November, p. 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.11.010>.

Chen, L., Li, K., Shang, J., Wu, Y., Chen, T., Wanyan, Y., Wang, E., Tian, C., Chen, W., Chen, W., Chen, W., Mi, G., Sui, X. 2021. Plant growth–promoting bacteria improve maize growth through reshaping the rhizobacterial community in low-nitrogen and low-phosphorus soil. *Biology and Fertility of Soils*, 57, 1075-1088.

Companhia Nacional De Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2023/24: sexto levantamento. Brasília, DF: Conab, v. 11, n. 6, 2024. 105 p. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 20 de Março de 2024.

Culman, S. W., Bukowski, R., Gauch, H. G., Cadillo-Quiroz, H., Buckley, D. H. 2009. T-REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC bioinformatics*, v. 10, n. 1, p. 1-10, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-171>.

Cunha, I., C. M. Silva, A. V. R., Boleta, E. H. M., Pellegrinetti, T. A., Zagatto, L. F. G., Zagatto, S. S. S., Chaves, M. G., Mendes, R., Patreze, C. M., Tsai, S. M., Mendes, L. W. 2024. The interplay between the inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria and the rhizosphere microbiome and their impact on plant phenotype. *Microbiological Research*, 283, 1-14. <https://doi:10.1016/j.micres.2024.127706>.

Das, A., Schneider, H., Burrridge, J., Ascanio, A. K. M., Wojciechowski, T., Topp, C. N., Bucksch, A. 2015. Digital imaging of root traits (DIRT): a high-throughput computing and collaboration platform for field-based root phenomics. *Plant Methods*, v.11, n.51,

<https://doi.org/10.1186/s13007-015-0093-3>.

Daunoras, J., Kačergius, A., Gudiukaitė, R. 2024. Role of Soil Microbiota Enzymes in Soil Health and Activity Changes Depending on Climate Change and the Type of Soil Ecosystem. *Biology*, v. 13, n. 2, p. 85. <https://doi.org/10.3390/biology13020085>.

Dong, L., Bai, X., Hu, S., Zhang, M., Wang, Y., Yu, X. 2024. Effects of Soil Bacterial Taxa under Different Precipitation Gradients on the Multi-Functionality of the Rhizosphere Soils under *Caragana intermedia* Forests. *Sustainability*, 16(14), 6032. <https://doi.org/10.3390/su16146032>.

Dubey, R. K., Tripathi, V., Prabha, R., Chaurasia, R., Singh, D. P., Rao, C. S., El-Keblawe, A., Abhilash, P. C. 2020. Methods for exploring soil microbial diversity. Unravelling the soil microbiome: Perspectives for environmental sustainability, p. 23-32. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15516-2_3.

Ekundayo, E. A., Adetuyi, F. C., Ekundayo, F. O. 2011. In Vitro Antifungal Activities of Bacteria Associated with Maize Husks and Cobs. *Research journal of microbiology*, v. 6, n. 4, p. 418. <https://doi.org/10.3923/jm.2011.418.424>

Etesami, H., Maheshwari, D. K. 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 156, p. 225-246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>.

Ferrarezi, J. A., Carvalho-Estrada, P. A., Batista, B. D., Aniceto, R. M., Tschoeke, B. A. P., Andrade, P. A. M., Lopes, B. De M., Bonatelli, M. L., Odisi, E. J., Azevedo, J. L., Quecine, M. C. 2022. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria from the Brazilian Amazon on the bacterial community associated with maize in field. *Applied Soil Ecology*, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104297>.

Ferrarezi, J. A., Defant, H., Souza, L. F., Azevedo, J. L., Hungria, M., Quecine, M. C. 2023. Meta-omics integration approach reveals the effect of soil native microbiome diversity in the performance of inoculant *Azospirillum brasilense*. *Frontiers in Plant Science*, v. 14, p. 1172839. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1172839>.

Foloni, J. S. S., Tiritan, C. S., Calonego, C. J., Junior, J. A. 2008. Aplicação de fosfato natural e reciclagem de fósforo por milheto, braquiária, milho e soja. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, v. 32, n. 3, p. 1147–1155, <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000300023>.

Fontes, M. P. F., Weed, S. B. 1996. Phosphate adsorption by clays from Brazilian Oxisols: Relationships with specific surface area and mineralogy. *Geoderma*, v. 72, n. 1–2, p. 37–51. [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(96\)00010-9](https://doi.org/10.1016/0016-7061(96)00010-9).

Forney, L. J., Zhou, X., Brown, C. J. 2004. Molecular microbial ecology: Land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, n. 3, p. 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.015>.

Gadhav, K. R., Devlin, P. F., Ebertz, A., Ross, A., Gange, A. C. 2018. Soil inoculation with *Bacillus* spp. modifies root endophytic bacterial diversity, evenness, and community composition in a context-specific manner. *Microbial Ecology*, v. 76, p. 741–75. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1160-x>.

García-Lara, S., Serna-Saldivar, S. O. 2019. Corn History and Culture. *Corn*. AACC International Press, p. 1–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00001-2>.

George, T. S., Hinsinger, P., Turner, B. L. 2016. Phosphorus in soils and plants – facing phosphorus scarcity. *Plant and Soil*, v. 401, n. 1–2. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2846-9>.

Goedert, W. J. 1983. Management of the Cerrado soils of Brazil: a review. *Journal of Soil Science*, v. 34, n. 3, p. 405–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1983.tb01045.x>.

Gollotte, A., Van Tuinen, D., Atkinson, D. 2004. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza*. 14: 111–117, <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0244-7>.

Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., and Chen, S. 2020. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov.

and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the subtilis and Cereus clades of species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 5753–5798. doi: 10.1099/ijsem.0.004475.

Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P. D. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. v. 4, n. 1, p. 9.

Hassan, M. K., McInroy, J. A., Kloepper, J. W. 2019. The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: a review. *Agriculture*, v. 9, n. 7, p. 142. <https://doi.org/10.3390/agriculture9070142>.

He, F., Hu, X. S. 2005. Hubbell's fundamental biodiversity parameter and the Simpson diversity index. *Ecol Lett* 8:386–390. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00729.x>.

Herrmann, A. M., Colombi, T. 2019. Energy use efficiency of root growth—a theoretical bioenergetics framework. *Plant signaling & behavior*. *Plant signaling & behavior*, v. 14, n. 12, p. 1685147. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1685147>.

Huang, W., Liu, J., Zhou, G., Zhang, D., Deng, Q. 2011. Effects of precipitation on soil acid phosphatase activity in three successional forests in southern China. *Biogeosciences*, 8(7), 1901-1910. <https://doi.org/10.5194/bg-8-1901-2011>.

Jensen, C. N. G., Pang, J. K. Y., Hahn, C. M., Gottardi, M., Husted, S., Moelbak, L., Schulz, A. 2024. Differential influence of *Bacillus subtilis* strains on *Arabidopsis* root architecture through common and distinct plant hormonal pathways. *Plant Science*, v. 339, p. 111936. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111936>.

Junior, F. B. R, Mendes, I. D. C., Teixeira, K. R. S., Reis, V, M. 2002. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. Embrapa Cerrados-Documents (INFOTEC-A-E).

Karajeh, M. R., 2013. Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* on controlling the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) infection and promoting cucumber growth and yield under laboratory and field conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(20), 2492-2500, <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.799819>.

Karczewski, K., Riss, H. W., Meyer, E. I. 2017. Comparison of DNA-fingerprinting (T-RFLP) and high-throughput sequencing (HTS) to assess the diversity and composition of microbial communities in groundwater ecosystems. *Limnologica*, 67, 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.10.001>.

Kari, A., Nagymáte, Z., Romsics, C., Vajna, B., Kutasi, J., Puspán, I., Kárpati, E., Kovács, R., Márialigete, K. 2019. Monitoring of soil microbial inoculants and their impact on maize (*Zea mays* L.) rhizosphere using T-RFLP molecular fingerprint method. *Applied Soil Ecology*, v. 138, p. 233–244, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.03.010>.

Kassambara, A., Mundt, F. 2020. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>.

Kumar, P., Thakur, S., Dhingra, G. K., Singh, A., Pal, M. K., Harshvardhan, K., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K. 2018. Inoculation of siderophore producing rhizobacteria and their consortium for growth enhancement of wheat plant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 15, p. 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.019>.

Lahlali, R., Ibrahim, D. S. S., Belabess, Z., Roni, M. Z. K., Radouane, N., Vicente, C. S. L., Menéndez, E., Mokri, F., Barka, E. A., Mota, M. G. M., Peng, G. 2021. High-throughput molecular technologies for unraveling the mystery of soil microbial community: Challenges and future prospects. *Heliyon*, v. 7, n. 10. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08142>.

Liu, D. 2021. Root developmental responses to phosphorus nutrition. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(6), <https://doi.org/10.1111/jipb.13090>.

Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 11, p. 4516–4522. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4516-4522.1997>.

López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., Gonzalez-Morales, S. I., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L. 2014. Phosphate Nutrition: Improving Low-Phosphate

Tolerance in Crops. Annual Review of Plant Biology, v. 65, n. 1, p. 95–123. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035949>.

Ma, X., Liu, Y., Shen, W., Kuzyakov, Y., 2021. Phosphatase activity and acidification in lupine and maize rhizosphere depend on phosphorus availability and root properties: Coupling zymography with planar optodes. Applied Soil Ecology, 167, 104029, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104029>.

Maheshwari, D. K., Aeron, A., Dubey, R. C., Agarwal, M., Dheeman, S., Shukla, S. 2014. Multifaceted Beneficial Associations with Pseudomonas and Rhizobia on Growth Promotion of *Mucuna pruriens* L. v. 8, n. 6, p. 4637-4667.

Malavolta, E., Vitti, G. C., Oliveira, S. A. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: POTAFOS.

Margalef, O., Sardans, J., Fernández-Martínez, M., Molowny-Horas, R., Janssens, I. A., Ciais, P., Goll, D., Richter, A., Obersteiner, M., Asensio, D., Peñuelas, J. 2017. Global patterns of phosphatase activity in natural soils. Scientific reports, v. 7, n. 1, p. 1337. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01418-8>.

Mccauley, A., Jones, C., Jacobsen, J. 2009. Commercial fertilizers and soil amendments. Nutrient Management-A self-study course from MSU extension continuing education series, p. 449-510.

Mendes, G. O, Freitas, A. L. M., Pereira, O. P., Silva, I. R., Vassilev, N. B., Costa, M. D. 2014. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. Annals of Microbiology, v. 64, n. 1, p. 239–249. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>.

Mendiburu, F., Yaseen, M. 2020. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.4.

Mukhtar, S., Shahid, I., Mehnaz, S., Malik, K. A. 2017. Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). Microbiological research, 205, 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.011>.

Muraoka, T., Boaretto, A. E., Scivittaro, W. B., Brasil, E. C. 2002. Availability of P from phosphate rock, thermophosphate and triple superphosphate after different incubation periods. Assessment of soil phosphorus status and management of phosphatic fertilisers to optimise crop production. p. 473. Disponível em: http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/te_1272_prn.pdf. Acesso em: 20 de março de 2024.

Nahas, J. V., Iosue, C. L., Shaik, N. F., Selhorst, K., He, B. Z., Wykoff, D. D. 2018. Dynamic changes in yeast phosphatase families allow for specialization in phosphate and thiamine starvation. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(7), 2333-2343, <https://doi.org/10.1534/g3.118.200303>.

Nazir, N., Kamili, A. N., Shah, D. 2018. Mechanism of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in enhancing plant growth – A Review. *International Journal of Management, Technology and Engineering*, v. 8, n. 7, p. 709–721.

Novais, R. F., Smyth, T.J. 1999. Phosphorus in plant and soil under tropical conditions. UFV, Viçosa, 399p.

Oberson, A., Besson, J. M., Maire, N., Sticher, H. 1996. Microbiological processes in soil organic phosphorus transformations in conventional and biological cropping systems. *Biology and fertility of soils*, 21, 138-148. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000192>.

Olanrewaju, O., Olubukola, O. B. 2019. Bacterial consortium for improved maize (*Zea mays* L.) production. *Microorganisms*. v. 7, n. 11, p. 519. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110519>.

Oliveira, C. A., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Scotti, M. R., Carneiro, N. P., Guimarães, C. T., Schaffert, R. E., Sá, N. M. H. 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado biome. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1782–1787. <https://10.1016/j.soilbio.2008.01.012>.

Oliveira-Paiva, C. A., Bini, D., de Sousa, S. M., Ribeiro, V. P., Dos Santos, F. C., de Paula Lana, U. G., Souza, F. F., Gomes, E. A., Marriel, I. E. 2024. Inoculation with

Bacillus megaterium CNPMS B119 and *Bacillus subtilis* CNPMS B2084 improve P-acquisition and maize yield in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1426166.

Oliveira-Paiva, C. A., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Cota, L. V., Santos, F. C., Tinoco, S. M. S., Lana, U. G. P., Oliveira, M. C., Mattos, B. B., Alves, V. M. C., Ribeiro, C. P., Junior, R. V. 2020. Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) na cultura do milho. Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E).

Olivoto, T., Lúcio, A. D. 2020. “metan: An R package for multi-environment trial analysis.” *Methods in Ecology and Evolution*, 11(6), 783-789. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13384>.

Orozco-Mosqueda, M. D. C., Fadji, A. E., Babalola, O. O., Glick, B. R., Santoyo, G. 2022. Rhizobiome engineering: Unveiling complex rhizosphere interactions to enhance plant growth and health. *Microbiological Research*, v. 263, p. 127137. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127137>.

Osborn, A. M., Moore, E. R. B., Timmis, K. N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, v. 2, n. 1, p. 39–50. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00081.x>.

Pang, F., Li, Q., Solanki, M. K., Wang, Z., Xing, Y. X., Dong, D. F. 2024. Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1383813. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1383813>.

Pavinato, P. S., Cherubin, M. R., Soltangheisi, A., Rocha, G. C., Chadwick, D. R., Jones, D. L. 2020. Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72302-1>.

Pavinato, P. S., Rocha, G. C., Cherubin, M. R., Harris, I., Jones, D. L., Withers, P. J. A. 2021. Map of total phosphorus content in native soils of Brazil. *Scientia Agricola*, v. 78, n. 6. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2020-0077>.

Pereira, S. I. A., Abreu, D., Moreira, H., Vega, A., Castro, P. M. L. 2020. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and nutrient use efficiency in maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. *Heliyon*, 6(10).

Piromyong, P., Buranababun, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teamroong, N. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology*, v. 47, n. 1, p. 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.004>.

Prochnow, L. I., Cunha, J. F., Ventimiglia, A. F. C. 2001. Field evaluation of water or citrate soluble phosphorus in modified phosphate rocks for soybean. *Scientia Agricola*, v. 58, n. 1, p. 165–170. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000100025>.

Qarni, A., Billah, M., Hussain, K., Shah, S. H., Ahmed, W., Alam, S., Sheikh, A. A., Jfri, L., Munir, A., Malik, K. M., Khan, N. 2021. Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from rock phosphate mines and their potential effect for sustainable agriculture. *Sustainability*, 13(4), 2151. <https://doi.org/10.3390/su13042151>.

Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., Shankhdhar, S. C. 2021. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. v. 21, n. 1, p. 49-68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>.

Renoud, S., Abrouk, D., Prigent-Combaret, C., Wisniewski-Dyé, F., Legendre, L., Moënné-Loccoz, Y., Muller, D. 2022. Effect of Inoculation Level on the Impact of the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on Selected Microbial Functional Groups in the Rhizosphere of Field Maize. *Microorganisms*, 10(2).

Resende, A. V., Neto, A. E. F., Alves, M. C., Muniz, J. A., Curi, N., Faquin, V., Kimpara, D. I., Santos, J. Z. L., Carneiro, L. F. 2006. Resposta do milho a fontes e modos de aplicação de fósforo durante três cultivos sucessivos em solo da região do Cerrado. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, n. 3, p. 458–466, <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000300011>.

Ribeiro, V. P., Marriel, I. E., Sousa, S. M., Lana, U. G. P., Mattos, B. B., Oliveira, C. A., Gomes, E. A. 2018. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. Brazilian Journal of Microbiology, v. 49, p. 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>.

Rojo, M. J., Carcedo, S. G., Mateos, M. P. 1990. Distribution and characterization of phosphatase and organic phosphorus in soil fractions. Soil Biology and Biochemistry, 22(2), 169-174. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90082-B](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90082-B).

Samain, E., Duclercq, J., Barka, E. A., Eickermann, M., Ernenwein, C., Mazoyon, C., Sarazin, V., Dubois, F., Aussenac, T., Selim, S. 2023. PGPR-Soil Microbial Communities' Interactions and Their Influence on Wheat Growth Promotion and Resistance Induction against *Mycosphaerella graminicola*. Biology, v. 12, n. 11, p. 1416. <https://doi.org/10.3390/biology12111416>.

Sánchez, P. A., Salinas, J. G. 1981. Low-input technology for managing oxisols and ultisols in tropical america. Advances in Agronomy, v. 34, n. C, p. 279–406. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60889-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60889-5).

Shahzad, A., Qin, M., Elahie, M., Naeem, M., Bashir, T., Yasmin, H., Younas, M., Areeb, A., Irfan, M., Billah, M., Shakoor, A., Zulfiqar, S. 2021. *Bacillus pumilus* induced tolerance of Maize (*Zea mays L.*) against Cadmium (Cd) stress. Scientific Reports, v. 11, n. 1, p. 17196. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96786-7>.

Shannon, C. E., Weaver, W. 1949. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., Gobi, T. A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, v. 2, n. 1, p. 1–14. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.

Shyu, C., Soule, T., Bent, S. J., Foster, J. A., Forney, L. J. 2007. MiCA: A web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. Microbial Ecology, 53(4), 562–570. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9106-0>

Siddique, M. B. A., Khalid, A., Ditta, A., Mahmood, S., Alataway, A., Dewidar, A. Z., Mattar, M. A. 2023. Climate change variables modify microbial community structure and soil enzymes involved in nitrogen and phosphorus metabolism. *Rhizosphere*. v. 28, p. 100793. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100793>.

Silva, U. C., Medeiros, J. D., Leite, L. R., Morais, D. K., Cuadros-Orellana, S., Oliveira, C. A., Lana, U. G. P., Gomes, E. A. Santos, V. L. 2017. Long-term rock phosphate fertilization impacts the microbial communities of maize rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01266>.

Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688. <http://dx.doi.org/10.1038/163688a0>.

Sousa, S. M., Oliveira, C. A., Andrade, D. L., Carvalho, C. G., Ribeiro, V. P., Pastina, M. M., Marriel, I. E., Lana, U. G. P., Gomes, E. A. 2020. Tropical *Bacillus* strains inoculation enhances maize root surface area, dry weight, nutrient uptake and grain yield. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(2), 867-877. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10146-9>.

Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Khan, M. S. I., Shahid, N., Aaliya, K. 2017. Bottlenecks in commercialization and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*, v. 121, n. October, p. 102–117. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030>.

Tan, T., Zhu, J., Shen, A., Li, J., Yu, Y., Zhang, M., Zhao, M., Li, Z., Chen, J., Gao, C., Cheng, Y., Guo, L., Yan, L., Sun, X., Zeng, L., Yan, Z. 2019. Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* HZ-72 exhibiting biocontrol activity against flax seedling blight. *European Journal of Plant Pathology*, v. 153, n. 3, p. 825–836. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1595-4>.

Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., Liu, X. 2021. Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology*, 10(2), 158. <https://doi.org/10.3390/biology10020158>.

Tiedje, J. M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, v. 13. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(99\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00026-8).

Tonini, D., Saveyn, H. G., Huygens, D. 2019. Environmental and health co-benefits for advanced phosphorus recovery. *Nature Sustainability*, 2(11), 1051-1061. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0416-x>.

Trachsel, S., Kaeppler, S. M., Brown, K. M., Lynch, J. P. 2011. Shovelomics: high throughput phenotyping of maize (*Zea mays* L.) root architecture in the field. *Plant and soil*, v. 341, p. 75-87.

Trouvelot, S. Tuinen, D., Hijri, M., Gianinazzi-Pearson, V. 1999. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 8:203–206. <https://doi.org/10.1007/s005720050235>

Tuinen, D., Zhao, B. Gianinazzi-Pearson V. 1998. PCR in studies of AM fungi: from primers to application. In Varma AK (Eds): *Mycorrhiza Manuel*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 387-400. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-60268-9_24.

United State Department Of Agricultural. Available at: <https://www.worldcornproduction.com/>. Acesso em 18 de outubro de 2022.

Vance, C. P., Uhde-Stone, C., Allan, D. L. 2003. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, v. 157, n. 3, p. 423–447. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x>.

Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, v. 255, n. 2, p. 571–586. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1026037216893>.

Wang, J., Liu, L., Gao, X., Hao, J., Wang, M. 2021. Elucidating the effect of biofertilizers on bacterial diversity in maize rhizosphere soil. *PloS one*, v. 16, n. 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249834>.

Wardyn, B. M., Russell, W. K. 2004. Resource allocation in a breeding program for phosphorus concentration in maize grain. *Crop Science*, v. 44, n. 3, p. 753–757. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0753>.

Wickham, H. 2007. Reshaping data with the reshape package. *Journal of statistical software*. <https://doi.org/10.18637/jss.v021.i12>.

Wickham, H. 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.

Yang, Y., Li, T., Wang, Y., Cheng, H., Chang, S. X., Liang, C., An, S. 2021. Negative effects of multiple global change factors on soil microbial diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, 156.

Zhao, W., Ban, Y., Su, Z., Li, S., Liu, X., Guo, Q., Ma, P. 2023. Colonization ability of *Bacillus subtilis* NCD-2 in different crops and its effect on rhizosphere microorganisms. *Microorganisms*, v. 11, n. 3, p. 776. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030776>.

Zhu, J., Li, M., Whelan, M. 2018. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of the Total Environment*, v. 612, p. 522–537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>.

Zongzheng, Y., Xin, L., Zhong, L., Jinzhao, P., Jin, Q., Wenyan, Y. Effect of *Bacillus Subtilis* SY1 on antifungal activity and plant growth. 2009. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, v. 2, n. 4, p. 55–61. <https://doi.org/10.3965/j.issn.1934-6344.2009.04.055-061>.

ANEXO I

Tabela S1. Análise de variância (ANOVA) das características do sistema radicular de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Quadrado médio													
Safra		GL	AREA (cm²)	TD_AVG (cm)	WIDTH_ MED (cm)	WIDTH_ MAX (cm)	SKL_WIDTH (cm)	ANG_ TOP (°)	STA_MAX (cm)	RTA_MAX (cm)	HYP_DIA (cm)	NODAL_AVG_DIA (cm)	D90 (cm)
2019/2020	Bloco	2	19790645,6**	4e-05	790,0***	598,1	690,0	7,9	0,12	6,39	0,009	0,001	0,0007
	Fertilização	1	15212123,2	0	604,4	266,8	914,7	21,8	0,007	0,05	0,065	0,0019	0,001
	Dose	1	4717015,9	0	64,9	9,6	8,8	0,08	0,48**	15,71	0,37**	0,0064	0,0001
	Inoculação	1	53217,5	6e-05	161,1	8,5	67,5	10,5	0,008	0,61	0,03	0,0019	0,0009
	Fertilização*Dose	1	877072,2	0	0,7	222,3	148,3	5,5	0,025	0,25	0,0005	0,0004	0,0003
	Fertilização*Inoculação	1	3704619,7	4e-05	20,5	46,3	100,9	2,2	0,026	11,55	0,056	0,015**	0,0004
	Dose*Inoculação	1	1524640,5	0,0001	20,5	33,9	0,3	3,6	0,028	2,54	0,012	0,0007	0,0022
	Fertilização*Dose*Inoculação	1	8113911,7	4e-05	133,0	805,8	627,3	12,6	0,030	13,58	0,1138	1e-04	0,0005
	Coeficiente de variação (%)		10,2	3,62	10,95	9,82	9,67	7,2	0,33	2,83	10,9	6,28	2,56
		GL	AREA (cm²)	TD_AVG (cm)	WIDTH_ MED (cm)	WIDTH_ MAX (cm)	SKL_WIDTH (cm)	ANG_ TOP (°)	STA_MAX (cm)	RTA_MAX (cm)	HYP_DIA (cm)	NODAL_AVG_DIA (cm)	D90 (cm)
2020/2021	Bloco	2	17465084,24	0,00013	185,45	167,32	124,69	60,58	0,088	3,8590	0,1465	0,01267	0,00055
	Fertilização	1	1552861,78	0,00018	2,39	23,86	21,87	2,20	0,105	1,3664	0,1630**	0,01145	0,00647*
	Dose	1	28471,80	0	168,47	2,02	66,90	107,03	0,095	0,0587	0,0039	0,00035	1e-05
	Inoculação	1	5107313,15	2e-05	143,81	798,58***	275,40	106,89	0,06243	7,5895***	0,01	0,01066	1e-05
	Fertilização*Dose	1	6739093,71	0,00011	97,13	1109,11**	1091,38***	0,8025	0,0352	0,00015	0,07162	0,00111	4e-05
	Fertilização*Inoculação	1	31313,71	0	18,54	0,2251	125,39	93,15	0,0254	0,2494	0,3352*	0,00575	0,0017
	Dose*Inoculação	1	2623802,98	0	48,16	12,88	6,01	124,12	0,0656	1,8240	0,0034	0,03544***	0,0010
	Fertilização*Dose*Inoculação	1	2715829,23	7e-05	59,64	22,93	126,27	93,29	0,1260	0,2697	0,00092	0,07054	2e-05
	Coeficiente de variação (%)		12,76	2,04	8,25	9,45	10,35	14,7	0,4	1,87	9,81	12,66	2,98

***, **, * Significativo a 10%, 5% e 1%

ANEXO II

Tabela S2. Valor médio das características do sistema radicular de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2019/2020.

Tratamento	AREA	TD_AVG	WIDTH_MED	WIDTH_MAX	D90	SKL_WIDTH	STA_MAX	RTA_MAX	HYP_DIA	NODAL_AVG_DIA	ANG_TOP
FNR0_I	22360,14 a	0,41 a	137,74 a	199,84 a	0,87 a	207,67 a	89,46 a	81,19 a	2,43 a	0,87 a	53,86 a
FNR120_I	20432,34 a	0,41 a	127,55 a	185,81 a	0,85 a	193,45 a	89,82 a	85,17 a	1,99 a	0,88 a	50,80 a
STP0_I	23425,08 a	0,41 a	147,62 a	195,83 a	0,89 a	214,66 a	89,39 a	81,99 a	2,47 a	0,89 a	53,79 a
STP120_I	24355,62 a	0,41 a	144,48 a	212,93 a	0,87 a	225,09 a	89,71 a	81,99 a	2,34 a	0,92 a	54,51 a
FNR0_NI	22392,93 a	0,42 a	138,21 a	194,60 a	0,86 a	204,67 a	89,50 a	82,28 a	2,27 a	0,92 a	52,35 a
FNR120_NI	21782,74 a	0,41 a	141,14 a	198,99 a	0,90 a	211,36 a	89,57 a	81,95 a	2,20 a	0,96 a	53,75 a
STP0_NI	23980,00 a	0,41 a	150,76 a	203,99 a	0,89 a	218,16 a	89,39 a	82,28 a	2,41 a	0,85 a	55,37 a
STP120_NI	21808,69 a	0,41 a	144,96 a	197,38 a	0,89 a	214,35 a	89,74 a	84,55 a	2,07 a	0,90 a	55,76 a

FNR0_NI: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante, FNR120_NI: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. FNR0_I: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. FNR120_I: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. STP0_NI: Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP120_NI: Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP0_I: Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. STP120_I: Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante.

ANEXO III

Tabela S3. Valor médio das características do sistema radicular de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2020/2021.

Tratamento	AREA	TD_AVG	WIDTH_MED	WIDTH_MAX	D90	SKL_WIDTH	STA_MAX	RTA_MAX	HYP_DIA	NODAL_AVG_DIA	ANG_TOP
FNR0_I	18981,02 a	0,41 a	116,48 a	177,30 a	0,86 a	185,88 a	89,64 a	82,82 a	1,98 a	0,86 a	52,63 a
FNR120_I	16656,03 a	0,40 a	117,44 a	163,79 a	0,85 a	170,15 a	89,60 a	82,15 a	1,86 a	0,66 a	57,83 a
STP0_I	16811,94 a	0,39 a	111,69 a	159,56 a	0,88 a	174,29 a	89,77 a	82,33 a	1,46 a	0,75 a	52,39 a
STP120_I	17952,13 a	0,40 a	127,00 a	177,15 a	0,87 a	194,70 a	89,86 a	82,09 a	1,58 a	0,79 a	64,74 a
FNR0_NI	16796,58 a	0,40 a	113,02 a	165,08 a	0,83 a	178,09 a	89,36 a	83,38 a	1,80 a	0,69 a	61,40 a
FNR120_NI	17139,73 a	0,40 a	114,62 a	152,55 a	0,85 a	173,53 a	89,81 a	84,24 a	1,65 a	0,85 a	65,39 a
STP0_NI	15828,58 a	0,40 a	111,03 a	151,63 a	0,89 a	166,53 a	89,65 a	82,91 a	1,77 a	0,86 a	61,16 a
STP120_NI	16973,24 a	0,40 a	114,12 a	162,01 a	0,90 a	180,09 a	89,65 a	83,53 a	1,80 a	0,83 a	55,63 a

FNR0_NI: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante, FNR120_NI: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. FNR0_I: Fertilizante FNR, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. FNR120_I: Fertilizante FNR, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. STP0_NI: Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP120_NI: Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, sem bioinoculante. STP0_I: Fertilizante STP, dose 0 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante. STP120_I: Fertilizante STP, dose 120 kg P₂O₅ ha⁻¹, com bioinoculante.

ANEXO IV

Tabela S4. Análise de variância (ANOVA) das famílias bacterianas mais abundantes da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2019/2020.

Safra	Fonte de variação	GL	Bacillaceae	Bradyrhizobiaceae	Methylobacteriaceae	Micrococcaceae	Rhizobiaceae
2019/2020	Bloco	2	15,47	2,45	0,60	4,03	1,06
	Dose	1	26,09	0,06	4,10	1,97	2,80***
	Inoculação	1	0,0	8,90	1,17	24,97	0,56
	Fertilizante	1	11,28	8,62	6,09	0,27	0,83
	Inoculação*Dose	1	2,51	95,61	0,20	81,83	0,60
	Fertilizante*Dose	1	29,97	6,83	6,72	29,56	0,73
	Fertilizante*Inoculação	1	0,54	3,94**	0,01	2,52*	0,004
	Fertilizante*Dose*Inoculação	1	25,20	22,03	0,002	16,72	0,89
Coefficiente de Variação (%)			79,88	33,25	21,65	22,41	17,04
Safra	Fonte de variação	GL	Sphingomonadaceae	Streptomyetaceae	Pseudomonadaceae	Clostridiaceae	Geobacteraceae
2019/2020	Bloco	2	5,41	50,45	26,71	0,21	0,32
	Dose	1	0,37	2,25	41,34***	1,49	0,16
	Inoculação	1	0,07	57,68	12,47	68,12***	0,23
	Fertilizante	1	1,14	61,44	106,65	8,69*	3,19
	Inoculação*Dose	1	20,29*	7,70	17,73	1,49*	5,49
	Fertilizante*Dose	1	4,93	5,43	19,19	16,66***	1,75
	Fertilizante*Inoculação	1	3,21	73,27	49,41	8,69*	0,55
	Fertilizante*Dose*Inoculação	1	0,47	4,84	8,52	16,66*	0,51
Coefficiente de Variação (%)			20,55	28,83	81,85	39,13	29,53

***, **, * Significativo a 10%, 5% e 1%

ANEXO V

Tabela S5. Análise de variância (ANOVA) das famílias bacterianas mais abundantes da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) na safra 2020/2021.

Safra	Fonte de variação	GL	Bacillaceae	Bradyrhizobiaceae	Methylobacteriaceae	Micrococcaceae	Brucellaceae
2020/2021	Bloco	2	19,28	25,36	4,69	4,68	38,16
	Dose	1	13,63	37,77	0,62	38,96	14,27***
	Inoculação	1	0,45	24,30	437,16*	2,29	498,95*
	Fertilizante	1	9,29	16,68	3,04	10,37	32,83*
	Inoculação*Dose	1	8,38	3,77	1,35	0,25	5,59
	Fertilizante*Dose	1	26,10	39,14	1,25	10,35	9,69
	Fertilizante*Inoculação	1	27,11	17,02	4,07	52,21	50,89*
	Fertilizante*Dose*Inoculação	1	31,85	42,48	3,15	0,21	2,50
Coefficiente de Variação (%)			61,35	42,02	23,69	33,35	22,32
Safra	Fonte de variação	GL	Sphingomonadaceae	Streptomycetaceae	Rhizobiaceae		
2020/2021	Bloco	2	4,85	200,01	28,99		
	Dose	1	1,13	8,82	36,38***		
	Inoculação	1	4,33	285,18	39,14***		
	Fertilizante	1	12,44	189,11	70,89*		
	Inoculação*Dose	1	0,36	4,55	33,82***		
	Fertilizante*Dose	1	0,08	33,82	4,14		
	Fertilizante*Inoculação	1	8,93	360,76	2,08		
	Fertilizante*Dose*Inoculação	1	1,31	33,68	24,30		
Coefficiente de Variação (%)			26,16	29,44	43,15		

***, **, * Significativo a 10%, 5% e 1%

ANEXO VI

Tabela S6. Análise de variância (ANOVA) das famílias fúngicas mais abundantes da rizosfera de milho inoculado (I) e não inoculado (NI) cultivado com diferentes doses (0 e 120 kg ha⁻¹) e tipos de fertilização fosfatada (fosfato de rocha - FNR e superfosfato triplo - STP) nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Safra	Fonte de variação	GL	Saccharomycetaceae	Tremellaceae	Trichocomaceae	Pezizaceae
2019/2020	Bloco	2	71,80	0,38	47,55	3,00
	Dose	1	15,36	36,67	4,65	20,19
	Inoculação	1	0,24	29,31	15,15	0,74
	Fertilizante	1	22,82	5,13	0,43	0,80
	Inoculação*Dose	1	48,18	19,48	4,20	3,21
	Fertilizante*Dose	1	0,61	19,88**	69,31	3,28
	Fertilizante*Inoculação	1	0,46	78,21	0,04	0,95
	Fertilizante*Dose*Inoculação	1	0,13	122,10	14,07	7,22
	Coefficiente de Variação (%)		15,49	16,25	51,75	12,75
2020/2021	Fonte de variação		Pezizaceae	Saccharomycetaceae	Tremellaceae	
	Bloco	2	4,76	11,23	3,36	
	Dose	1	14,98	148,70*	69,29	
	Inoculação	1	39,47	24,69	126,60	
	Fertilizante	1	121,05	14,32	218,65**	
	Inoculação*Dose	1	120,34	7,96	66,38	
	Fertilizante*Dose	1	6,24	0,13	4,57	
	Fertilizante*Inoculação	1	0,41	4,84	8,08	
	Fertilizante*Dose*Inoculação	1	130,31	75,24	7,51	
	Coefficiente de Variação (%)		72,07	7,16	16,1	

ANEXO VII

Tabela S7. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos de variáveis da planta e do solo sobre a variável básica (produtividade de grãos), na cultura do milho DKB390 avaliada nas safras 2019/2020 e 2020/2021.

Caráter	Efeito	Estimativa Safr 2019/2020	Estimativa Safr 2020/2021
Fosfatase ácida	Direto	0,134	-0,032
	Indireto via ângulo da raiz	0,009	0,003
	Indireto via largura da raiz	0,094	-0,033
	Indireto via diâmetro da espiga	0,004	-0,058
	Indireto via área da raiz	-0,196	0,070
	Indireto via Fosfatase alcalina	0,016	0,049
	Indireto via fósforo dos grãos	0,099	0,024
	Indireto via nitrogênio dos grãos	0,139	0,137
	Indireto via potássio dos grãos	-0,037	-0,014
	Indireto via índice de Simpson	0,046	0,011
Fosfatase alcalina	Direto	0,065	0,104
	Indireto via ângulo da raiz	0,002	-0,026
	Indireto via largura da raiz	0,063	-0,027
	Indireto via diâmetro da espiga	0,004	0,027
	Indireto via Fosfatase ácida	0,033	-0,015
	Indireto via área da raiz	-0,105	0,020
	Indireto via fósforo dos grãos	0,074	0,043
	Indireto via nitrogênio dos grãos	0,133	0,200
	Indireto via potássio dos grãos	-0,037	-0,033
	Indireto via índice de Simpson	0,023	-0,024
Fósforo dos grãos	Direto	-0,221	0,175
	Indireto via ângulo da raiz	-0,001	-0,048
	Indireto via largura da raiz	-0,194	-0,014
	Indireto via diâmetro da espiga	-0,003	0,074
	Indireto via fosfatase ácida	-0,060	-0,004
	Indireto via fosfatase alcalina	-0,021	0,025
	Indireto via área da raiz	0,251	0,023
	Indireto via nitrogênio dos grãos	-0,075	0,509
	Indireto via potássio dos grãos	0,119	-0,128
	Indireto via índice de Simpson	-0,025	0,014
Nitrogênio dos grãos	Direto	0,679	0,693
	Indireto via ângulo da raiz	-0,011	0,033
	Indireto via largura da raiz	-0,179	-0,045
	Indireto via diâmetro da espiga	0,010	0,079
	Indireto via área da raiz	0,103	0,026
	Indireto via fosfatase alcalina	0,013	0,030
	Indireto via fósforo dos grãos	0,024	0,128
	Indireto via fosfatase ácida	0,027	-0,006
	Indireto via potássio dos grãos	0,023	-0,099
	Indireto via índice de Simpson	0,042	-0,012

Caráter	Efeito	Estimativa Safr 2019/2020	Estimativa Safr 2020/2021
Ângulo da raiz	Direto	-0,054	0,237
	Indireto via Área da raiz	0,195	-0,018
	Indireto via largura da raiz	-0,227	-0,073
	Indireto via diâmetro da espiga	0,000	-0,029
	Indireto via Fosfatase ácida	-0,023	-0,000
	Indireto via Fosfatase alcalina	-0,002	-0,011
	Indireto via fósforo dos grãos	-0,005	-0,036
	Indireto via nitrogênio dos grãos	0,135	0,097
	Indireto via potássio dos grãos	0,025	0,016
	Indireto via índice de Simpson	-0,000	-0,036
Área da raiz	Direto	0,685	0,237
	Indireto via ângulo da raiz	-0,015	-0,018
	Indireto via largura da raiz	-0,536	-0,103
	Indireto via diâmetro da espiga	0,001	-0,067
	Indireto via Fosfatase ácida	-0,038	-0,009
	Indireto via Fosfatase alcalina	-0,010	0,009
	Indireto via fósforo dos grãos	-0,081	0,017
	Indireto via nitrogênio dos grãos	0,102	0,076
	Indireto via potássio dos grãos	0,023	-0,005
	Indireto via índice de Simpson	-0,044	-0,004
Largura da raiz	Direto	-0,624	-0,184
	Indireto via Área da raiz	0,589	0,133
	Indireto via ângulo da raiz	-0,020	0,095
	Indireto via diâmetro da espiga	0,002	-0,047
	Indireto via Fosfatase ácida	-0,020	-0,006
	Indireto via Fosfatase alcalina	-0,007	0,015
	Indireto via fósforo dos grãos	-0,069	0,013
	Indireto via nitrogênio dos grãos	0,195	0,168
	Indireto via potássio dos grãos	0,018	-0,003
	Indireto via índice de Simpson	-0,031	-0,022

Caráter	Efeito	Estimativa Safr 2019/2020	Estimativa Safr 2020/2021
Potássio dos grãos	Direto	0,180	-0,136
	Indireto via ângulo da raiz	-0,008	-0,027
	Indireto via largura da raiz	-0,064	-0,003
	Indireto via diâmetro da espiga	-0,001	0,088
	Indireto via fosfatase ácida	-0,028	-0,003
	Indireto via área da raiz	0,089	0,009
	Indireto via fósforo dos grãos	-0,147	0,165
	Indireto via nitrogênio dos grãos	0,087	0,504
	Indireto via fosfatase alcalina	-0,013	0,025
	Indireto via índice de Simpson	0,009	0,015
Índice de Simpson	Direto	0,204	0,114
	Indireto via ângulo da raiz	0,000	-0,070
	Indireto via largura da raiz	0,094	0,035
	Indireto via diâmetro da espiga	0,002	-0,028
	Indireto via fosfatase ácida	0,030	-0,003
	Indireto via fosfatase alcalina	0,007	-0,022
	Indireto via área da raiz	-0,147	-0,008
	Indireto via nitrogênio dos grãos	0,142	-0,075
	Indireto via potássio dos grãos	0,008	-0,018
	Indireto via fósforo dos grãos	0,027	0,022
Diâmetro da espiga	Direto	0,015	0,240
	Indireto via Área da raiz	0,051	-0,067
	Indireto via largura da raiz	-0,085	0,036
	Indireto via ângulo da raiz	-0,002	-0,028
	Indireto via Fosfatase ácida	0,039	0,008
	Indireto via Fosfatase alcalina	0,018	0,012
	Indireto via fósforo dos grãos	0,050	0,054
	Indireto via nitrogênio dos grãos	0,449	0,228
	Indireto via potássio dos grãos	-0,015	-0,050
	Indireto via índice de Simpson	0,025	-0,013