



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LEONARDO SOUZA DE ANDRADE

**POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE FÓSFORO DE FONTES ORGÂNICAS EM
Eucalyptus grandis E *E. globulus*: INFLUÊNCIA DA MICORRIZA ARBUSCULAR**

CAMPINAS

2023

LEONARDO SOUZA DE ANDRADE

POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE FÓSFORO DE FONTES ORGÂNICAS EM
Eucalyptus grandis E *E. globulus*: INFLUÊNCIA DA MICORRIZA ARBUSCULAR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre
em Biologia Vegetal

ORIENTADORA: PROF. DRA. SARA
ADRIÁN LÓPEZ DE ANDRADE

ESTE ARQUIVO DIGITAL
CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO LEONARDO SOUZA DE
ANDRADE E ORIENTADO POR SARA
ADRIÁN LÓPEZ DE ANDRADE

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

An24p Andrade, Leonardo Souza de, 1998-
Potencial de utilização de fósforo de fontes orgânicas em *Eucalyptus grandis* e *E. globulus* : influência da micorriza arbuscular / Leonardo Souza de Andrade. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Sara Adrián López de Andrade.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fosfatase ácida. 2. Fitase. 3. Ácido fítico. 4. Micélio. I. Andrade, Sara Adrián López de, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Potential of phosphorus utilisation from organic sources in *Eucalyptus grandis* and *E. globulus* : arbuscular mycorrhiza influence

Palavras-chave em inglês:

Acid phosphatase

Phytases

Phytic acid

Mycelium

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Sara Adrián López de Andrade [Orientador]

Fernando César Bachiega Zambrosi

Matheus Aparecido Pereira Cipriano

Data de defesa: 05-09-2023

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3775-3538>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1919139557127925>

Campinas, 5 de Setembro de 2023

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Sara Adrián López de Andrade

Prof. Dr. Fernando César Bachiega Zambrosi

Dr. Matheus Aparecido Pereira Cipriano

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Sara Adrián por ter sido minha guia com tanto afinho e amor pelo que faz nessa minha jornada na fisiologia vegetal.

Agradeço a todos os amigos que me ajudaram, ensinaram e fizeram companhia durante esses últimos dois anos no LaFiMP: Jucilene Teté, Vinícius de Oliveira, Ana Isa Marquês, Gabrielle Inácio, Luana e Maristela.

Agradeço à minha banca de qualificação constituída pelos Prof. Drs. Paulo Mazzafera e Fernando César Bachiega Zambrosi, bem como à minha banca de acompanhamento de teses na qual a Prof. Dra. Adriana Parada Dias da Silveira tanto contribuiu.

Obrigado ao meu marido Thomás pelo apoio em todo o percurso que fizemos até ingressar na UNICAMP e começar uma vida juntos fazendo o que nos faz feliz.

Obrigado a minha mãe, por nunca ter desistido de mim mesmo nos tempos mais difíceis de sua vida.

Obrigado à UNICAMP e seu Instituto de Biologia, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal que tanto contribuíram para a minha formação científica nesta jornada do mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2021/05815-9.

Obrigado a FAPESP e a CAPES pelas bolsas de estudo e apoio financeiro e pelo suporte inestimável à produção científica brasileira, mesmo em tempos em que o conhecimento científico é tão desvalorizado e desvalidado.

*“After sleeping through a hundred million centuries
We have finally opened our eyes on a sumptuous planet, sparkling with color, bountiful with life
Within decades we must close our eyes again
Isn't it a noble and enlightened way of spending our brief time in the sun
To work at understanding the universe and how we have come to wake up in it?”*

(Música The Greatest Show on Earth – Nightwish & Richard Dawkins)

RESUMO

O fósforo (P) é um recurso finito que frequentemente limita a produção vegetal, uma vez que a disponibilidade deste nutriente no solo é frequentemente baixa. O P orgânico (P_o) pode compreender mais de 50% do P total de solos naturais e não pode ser diretamente absorvido por raízes de plantas, precisando ser mineralizado. Este processo é desempenhado por diferentes enzimas fosfatases, que são capazes de hidrolisar o P ligado a compostos orgânicos, e podem ser secretadas pelas raízes e pela microbiota do solo constituída de bactérias, fungos e outros microrganismos. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são organismos biotróficos obrigatórios que se associam às raízes de plantas e desempenham papel importante na aquisição de P pelas plantas hospedeiras. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de duas espécies de eucalipto em utilizar P de fontes orgânicas ou pouco solúveis, assim como avaliar a contribuição da simbiose com o FMA *Rhizophagus intraradices* na aquisição de P destas fontes. Foram realizados concomitantemente dois experimentos em esquema fatorial 7 × 2, com dez repetições, totalizando 140 parcelas experimentais cada um. O experimento 1, teve como planta estudo *Eucalyptus globulus* (Gl) e o experimento 2 plantas de *E. grandis* (Gr). Os fatores em estudo foram: as sete diferentes fontes de P: glucose-6-fosfato (G); fitato (F); RNA de levedura torula (R); ATP (A); necromassa de *Pseudomonas putida* (N); fosfato de potássio (C) e fosfato de ferro III (Fe) e a inoculação (M) ou não (NM) do FMA. Para as sete fontes, a concentração de P foi de 0,1 mM. As plantas foram crescidas por 12 semanas e irrigadas diariamente. Avaliamos a produção de biomassa de parte aérea e raiz, a atividade fitase e fosfatase radicular (rAPase) e do micélio externo (mAPase), o comprimento do micélio externo, a concentração e conteúdo de P das plantas, bem como eficiência de absorção (PUpE) e de uso de P (PUE). Observamos que plantas de *E. globulus* foram mais eficientes no uso e na absorção de P que plantas de *E. grandis*. A inoculação do FMA aumentou o PUpE e o conteúdo de P das plantas hospedeiras em geral, além de ter aumentado a atividade fitase e APase das plantas sob algumas fontes de P, como fitato. Plantas que receberam fitato e fosfato de ferro tiveram menos conteúdo de P e produziram menor biomassa, apesar da intensa atividade APase, indicando resposta da planta à baixa concentração de P, e a recalcitrância dessas duas fontes de P. No entanto, as fontes de G6P e fosfato de potássio se mostraram mais suscetíveis à utilização pelas plantas de eucalipto. A necromassa bacteriana teve grande influência no aumento da extensão do micélio externo, bem como na mAPase, possivelmente devido a presença de outros nutrientes capazes de contribuir na melhora do status nutricional das plantas e possivelmente no recrutamento de microrganismos com atividade fosfatase. Concluímos que as espécies de plantas diferem na capacidade de utilizar as diferentes fontes de P e isso está relacionado com suas atividades enzimáticas radiculares; o FMA contribui de forma importante na aquisição de P de fontes orgânicas pelas plantas de eucalipto associadas, conferindo maior PUpE da planta; e que a necromassa bacteriana pode fornecer elementos como N, P e C influenciando a atividade das hifas fúngicas e, possivelmente, de microrganismos associados ao micélio, contribuindo positivamente com a mAPase e o crescimento do micélio do FMA associados às plantas de eucalipto.

ABSTRACT

Phosphorus (P) is a finite resource that often limits agricultural production since most of this element is in forms unavailable to plants. Organic P (P_o) can constitute up to 50% of the total P in natural soils and cannot be directly absorbed by plant roots. P_o needs to undergo a mineralization process carried out by phosphatase enzymes (APases) or phytases, which are capable of hydrolyzing P from phytate molecules, and which can be secreted by the plant roots themselves and/or by the soil microbiota constituted of bacteria, fungi, and other microorganisms. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMFs) are obligate biotrophic organisms which associates with plant roots and play an important role in the P nutrition of host plants while receiving photoassimilates that ensure the symbiotic relationship. In this work, we aimed to evaluate the ability of two eucalyptus species to use P from organic or poorly soluble sources, as well as to evaluate the contribution of symbiosis with AMF *Rhizophagus intraradices* in the acquisition of P from these sources. Two experiments were carried out concomitantly in a 7×2 factorial scheme, with ten replications, totaling 140 experimental plots each. Experiment 1 had as study plant *Eucalyptus globulus* (Gl) and experiment 2 plants of *E. grandis* (Gr). The factors under study were: 7 sources of P: glucose-6-phosphate (G); phytate (F); torula yeast RNA (R); ATP (A); *Pseudomonas putida* necromass (N); potassium phosphate (C) and iron phosphate (Fe) and inoculation (M) or not (NM) of AMF. For all P sources, P concentration was 0.1 mM. The plants were grown for 12 weeks and daily irrigated. We evaluated the production of shoot and root biomass, root phytase and phosphatase activity (rAPase) besides external mycelium phosphatase activity (mAPase), outer mycelium length, plants P concentration and content, as well as plants P uptake efficiency (PUpE) and use (PUE). We observed that *E. globulus* plants were more efficient in P use and absorption than *E. grandis* plants. AMF inoculation influenced the increase of PUpE and P content of host plants in general, in addition to increasing the phytase and APase activity of plants under some P sources, such as phytate. Plants which received phytate and iron phosphate accumulated less P content and biomass, despite intense APase activity, indicating plant response to low P concentration and the recalcitrance of these two P sources. However, the sources of G6P and potassium phosphate were more susceptible to be used by eucalyptus plants. Bacterial necromass had a great influence on the increase in the extension of the outer mycelium, as well as the APase of the mycelium, possibly due to the large amount of nutrients other than P in this P_o source, capable of contributing to the nutritional status of plants and in the recruitment of microorganisms with APases to the hyphosphere. We conclude that plant species differ in their ability to utilize different P sources, and this is related to their root enzymatic activities; AMF plays an important role in the P acquisition from organic sources to the associated eucalyptus plants, improving plants PUpE and that bacterial necromass can provide elements such as N, P and C influencing mycelium and possibly, associated mycelium microorganisms activities, contributing positively to the mAPase and to the growth of the AMF mycelium associated with eucalyptus plants.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.2. <i>Fósforo no solo.....</i>	11
1.2.1. <i>Fósforo inorgânico do solo.....</i>	11
1.2.2. <i>Fósforo orgânico do solo.....</i>	12
1.2.3. <i>Ciclagem de P no solo.....</i>	15
1.3. <i>P nas plantas.....</i>	16
1.3.1. <i>Resposta à deficiência de P.....</i>	18
1.4. <i>Aquisição de P por raízes.....</i>	21
1.4.1. <i>Exsudação radicular.....</i>	22
1.4.2. <i>Enzimas extracelulares secretadas pelas raízes.....</i>	24
1.4.3. <i>Absorção de formas orgânicas de nutrientes pelas plantas.....</i>	28
1.5. <i>Microrganismos rizosféricos: solubilização e mineralização do P_o.....</i>	30
1.5.2. <i>Fungos Micorrízicos Arbusculares: absorção e mobilização de P_i e P_o.....</i>	33
1.6. <i>Eucalyptus: origem, importância comercial e ecológica.....</i>	37
2. Objetivos.....	39
3. Hipóteses.....	39
4. Materiais e Métodos.....	39
4.1. <i>Instalação e condução do experimento.....</i>	39
4.2. <i>Obtenção de necromassa bacteriana.....</i>	41
4.3. <i>Preparo das soluções de fontes de P.....</i>	42
4.4. <i>Determinação da produção de biomassa de parte aérea e raiz.....</i>	42
4.5. <i>Análise dos parâmetros morfológicos da raiz.....</i>	43
4.6. <i>Avaliação de pigmentos das folhas.....</i>	43
4.7. <i>Avaliação da colonização micorrízica.....</i>	43
4.8. <i>Quantificação do comprimento do micélio externo.....</i>	43
4.9. <i>Determinação da concentração de P na parte aérea.....</i>	44
4.10. <i>Determinação do conteúdo de N das plantas.....</i>	45
4.11. <i>Avaliação da atividade fitase extracelular nas raízes.....</i>	45
4.12. <i>Avaliação da atividade fosfatase secretada nas raízes (rAPase).....</i>	45
4.13. <i>Avaliação da atividade fosfatase do micélio externo (mAPase).....</i>	46
4.14. <i>Análise estatística.....</i>	47
5. Resultados.....	47
5.1. <i>Produção de biomassa da parte aérea e raiz.....</i>	47
5.2. <i>Características morfológicas do sistema radicular.....</i>	52
5.3. <i>Conteúdo de pigmentos foliares e índice de balanço de nitrogênio (NBI).....</i>	55
5.4. <i>Colonização Micorrízica.....</i>	59
5.5. <i>Comprimento do micélio externo do FMA.....</i>	62
5.6. <i>Concentração de P na parte aérea.....</i>	62
5.7. <i>Conteúdo de P nas plantas.....</i>	63
5.8. <i>Eficiência de absorção de P (PUPE).....</i>	65
5.9. <i>Eficiência de uso de P (PUE).....</i>	66
5.10. <i>Conteúdo de N.....</i>	67
5.11. <i>Atividade fitase extracelular em raízes.....</i>	68
5.12. <i>Atividade fosfatase ácida secretada nas raízes (rAPase).....</i>	69
5.13. <i>Atividade fosfatase ácida do micélio externo (mAPase).....</i>	70
5.14. <i>Análise de correlação de Pearson e PCA.....</i>	71

6. Discussão.....	75
6.1. <i>Capacidade de uso de P por plântulas de eucalipto: influência da espécie, fonte de P e micorrização.....</i>	<i>75</i>
6.1. <i>Avaliação da eficácia das plantas em utilizar fontes orgânicas de P: impacto na nutrição fosfatada e interação com FMA.....</i>	<i>79</i>
6.3. <i>Conclusão.....</i>	<i>85</i>
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO I: Declaração de Bioética.....	116
ANEXO II: Declaração de Direitos Autorais.....	117

1. Introdução

1.2. Fósforo no solo

1.2.1. Fósforo inorgânico do solo

No geral, o fósforo (P) do solo tem sua origem nas rochas parentais que através da chuva, sol e vento, no processo de intemperismo, liberam formas inorgânicas de P de forma muito lenta e que podem ser utilizadas diretamente por raízes de plantas e outros organismos (Lambers, 2022). O P inorgânico (P_i) pode ser encontrado em várias formas no solo (Tiessen & Moir, 2008; Richardson & Simpson 2011; Yang & Huang 2014) incluindo:

- Ortofosfato ($H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-}) – É a forma mais comum de P_i no solo, e é a forma primária de P absorvida pelas plantas. O ortofosfato é solúvel na água do solo e é a forma de P mais suscetível à lixiviação e escoamento superficial. O $H_2PO_4^-$ se movimenta no solo por meio de difusão, em um processo muito lento de apenas $10^{-15} \text{ m s}^{-1}$ sendo a concentração de P_i na solução do solo relativamente baixa, entre 2 e 10 μM (Lewis & Quirk, 1967; Gebrim et al., 2010).
- Polifosfato – os polifosfatos são polímeros de moléculas de ortofosfato que podem conter de dezenas a centenas de grupos fosfato unidos por átomos de oxigênio em ligações fosfoanidridas, as quais são consideradas ligações de “alta energia”. Os polifosfatos podem ser moléculas lineares, ramificadas ou cíclicas (Marschner, 2023).
- Minerais de fosfato - O P_i também pode estar presente no solo na forma de vários minerais, incluindo, por exemplo, apatita, variscita, vivianita e strengita. Esses minerais contêm formas relativamente insolúveis de P que não estão prontamente disponíveis para as plantas.

No solo, a disponibilidade de P_i para as plantas varia de acordo com o pH, umidade e conteúdo de matéria orgânica do solo, por exemplo (Lambers et al., 2015). Componentes da matéria orgânica podem conter P em sua composição, ligado a cadeias de carbono, sendo então conhecido como P orgânico (P_o) (Lambers et al., 2015). Assim, a concentração de P total em solos naturais depende da concentração de P das rochas parentais e de suas transformações químicas e biológicas, em um processo natural e de longo prazo conhecido como pedogênese (Turner & Cordon,

2013). O processo de pedogênese é caracterizado pela rápida depleção de minerais de P e pelo simultâneo acúmulo de P_o e de minerais secundários de P que estão retidos em óxidos e hidróxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al) (Figura 1). O processo de pedogênese, a longo prazo, pode levar à acidificação do solo e, conseqüentemente, a um declínio na concentração total de P de um solo, o que pode ser mais evidente em solos tropicais, altamente intemperizados e que resulta frequentemente em solos com concentrações de P disponível menores do que 10 mg kg^{-1} (Marschner, 2011; Yang & Post, 2011). Assim, solos mais jovens se mostram geralmente mais ricos em P do que solos antigos (Marschner, 2011; Yang & Post, 2011).

Em solos tropicais, que são altamente intemperizados e ácidos, há uma grande taxa de adsorção de P nas superfícies minerais que incluem óxidos e hidróxidos de Fe e Al, adsorvendo o P na forma de fosfato de Fe, fosfato de Al ou ainda como fosfato de manganês (Mn); em solos mais alcalinos o P é fixado na forma de fosfatos de cálcio (Ca) (Figura 1) (Lambers et al., 2015). A alta taxa de adsorção do P em formas não solúveis no solo interfere diretamente na nutrição fosfatada das plantas, considerando que as raízes absorvem o elemento apenas na forma inorgânica como ortofosfato ou dihidrogênio fosfato (H_2PO_4^-) (Hanyabui et al., 2020; Lambers et al., 2015).

1.2.2. Fósforo orgânico do solo

O P ainda pode ser encontrado em formas orgânicas no solo, que podem ser relativamente mais móveis que formas de P_i , e com maior risco de lixiviação (Hedin et al., 2003). Annaheim et al., (2015) observaram, por exemplo, que a adição de fertilizantes orgânicos por longos períodos teve pouco efeito sobre o perfil de P_o do solo provavelmente devido sua perda por lixiviação. O P_o no solo tem sua origem em organismos vivos que geram resíduos ricos no elemento, estes resíduos podem ser provenientes de folhas de árvores ou mesmo de outros tecidos degradados por fungos e bactérias presentes no solo (Lambers et al., 2015). O P_o no solo é encontrado em uma variedade de formas que incluem:

- Fitatos – São a forma mais abundante de P_o no solo, variando de 5% a 80% da fração de P total dos solos (Giles et al., 2017). Estão presentes em tecidos vegetais, resíduos vegetais e animais, e são lentamente mineralizados, principalmente, por microrganismos do solo. O fitato é relativamente imóvel no

solo (Anderson et al., 1974), e constitui uma importante fonte de P para plantas e microrganismos. A estrutura complexa do fitato o torna bastante resistente à quebra enzimática e, portanto, é uma forma de P menos disponível para plantas do que as formas inorgânicas de P (Giles et al., 2017). Além de seu papel como fonte de P, o fitato também pode influenciar a fertilidade do solo ao formar complexos com metais como ferro (Fe), zinco (Zn) e cálcio (Ca), o que pode afetar sua disponibilidade para absorção pelas plantas (López-Arredondo et al., 2014). Compreender a dinâmica do fitato no solo e os fatores que influenciam sua mineralização pode contribuir com o desenvolvimento de práticas de manejo de nutrientes e promover uma agricultura mais sustentável.

- Fosfolipídios – São compostos orgânicos da classe dos lipídeos que contêm P na forma de fosfato, o que lhes confere seu caráter anfifílico. Os fosfolipídeos são componentes importantes das membranas celulares dos organismos vivos. Os fosfolipídios estão presentes na microbiota do solo e contribuem para o pool de P_o no solo (Joergensen, 2022).
- Ácidos nucleicos - Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) e os nucleotídeos (ATP, UTP, ADP, entre outros) contêm P na forma de grupos fosfato ligados por ligações fosfodiéster a pentose do nucleosídeo. Esses tipos de compostos estão presentes em resíduos vegetais, animais e microbianos no solo, e são lentamente mineralizados por enzimas (nucleases) presentes em microrganismos do solo (Persoh et al., 2008).
- Fosfoproteínas - São proteínas que contêm P e estão presentes em resíduos vegetais e microbianos no solo. Elas são lentamente mineralizadas por microrganismos do solo (Ghahremani & Plaxton, 2020).
- Fosfonatos - São compostos orgânicos que contêm um grupo funcional fosfonato ($-PO_3H_2$) e são comumente encontrados em solos. Os fosfonatos são menos solúveis na água do solo e menos prontamente disponíveis para as plantas do que o ortofosfato (Kononova & Nesmeyanova, 2002).
- Outros compostos orgânicos - O P_o no solo também pode estar presente ligado a uma variedade de outros compostos, incluindo ácidos orgânicos, derivados de aminoácidos e açúcares.

O P_o não pode ser diretamente absorvido pelas raízes das plantas (Lambers, 2022), tendo que passar por processos de mineralização que levam a hidrólise de grupos fosfatos presentes em moléculas orgânicas de P como ácidos nucleicos, ATP, ADP, açúcares-fosfato ou fosfolipídios, por exemplo, que podem estar presentes no solo (Lambers, 2022; Turner & Condron, 2013). O processo de mineralização do P envolve mecanismos das próprias plantas (Kavka et al., 2021), e da microbiota do solo (Figura 1) (Joner & Johansen, 2000).

A proporção de P_o e P_i no solo varia significativamente dependendo do tipo do solo, do clima ao qual este está submetido e do seu uso. Em solos de florestas tropicais, o P_o pode representar mais de 50% do P total em camadas mais superficiais (Vincent et al., 2010), enquanto em solos com intensa atividade agrícola a presença de P_o é geralmente observada em menores proporções. Sabe-se que regiões temperadas possuem solos com maior disponibilidade de P_o , quando comparado a regiões de clima tropical (Yang et al., 2013). Nos solos brasileiros, a concentração de P total em suas camadas mais superficiais (0 - 30 cm) se mostra maior na região sul, com concentrações maiores que 500 mg kg^{-1} , quando comparada com as demais regiões do país, com concentrações em torno de 200 mg kg^{-1} (Pavinato et al., 2020; Quesada et al., 2010). De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a média nacional de P no solo é de $11,5 \text{ mg/dm}^3$, sendo que a disponibilidade de P pode variar de 2 a 30 mg/dm^3 , dependendo do tipo de solo e região (CONAB, 2021).

Em resumo, o P pode estar presente no solo nas formas inorgânicas como ortofosfatos, pirofosfatos, polifosfatos; e orgânicas, como fosfoésteres, fosfonatos, ácidos orgânicos, açúcares fosfato, fosfolipídios, entre outras formas (Turner & Condron, 2013). Como dito acima, considera-se que a maior parte do P_o disponível no solo seja constituído por fitatos, ácidos nucleicos, fosfonatos e fosfolipídios, no entanto há uma grande quantidade de formas orgânicas de P não identificadas (Spohn, 2020).

As formas orgânicas de P no solo são importantes para a nutrição das plantas porque podem representar uma fração significativa do P total e podem contribuir para a fertilidade do solo a longo prazo (Oberson et al., 2010). Oberson et al., (2010) descobriram que o P orgânico contribui significativamente para a nutrição fosfatada das plantas de milho e que é importante considerar as formas orgânicas e inorgânicas de P ao desenvolver recomendações de fertilizantes.

1.2.3. Ciclagem de P no solo

A ciclagem do P no solo é um processo complexo que envolve uma variedade de reações químicas e biológicas (Sharpley et al., 2014). Compreender a dinâmica da ciclagem de P no solo é importante para otimizar práticas de manejo de nutrientes na agricultura e mitigar impactos ambientais como a eutrofização de corpos d'água (Turner & Haygarth, 2001). Como dito anteriormente, o P no solo pode estar presente em formas inorgânicas, como fosfato (PO_4), e formas orgânicas, como fitato e outros compostos orgânicos de P. A ciclagem de P entre essas diferentes formas no solo é influenciada por uma série de processos, como sorção e dessorção, precipitação e dissolução, atividade microbiana e a atividade de raízes, entre outros (Richardson & Simpson, 2011) (Figura 1).

Alguns exemplos de microrganismos envolvidos na ciclagem de P do solo são as bactérias solubilizadoras de P (Khan et al., 2007) e bactérias mineralizadoras de P (Smith & Read, 2008), que incluem bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium*. Outro grupo de microrganismos envolvidos na ciclagem de P do solo são os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Bunn et al., 2019).

Vários estudos investigaram os fatores que influenciam a ciclagem de P no solo e o potencial de diferentes práticas de manejo para melhorar a disponibilidade de P para absorção pelas plantas (Sainju et al., 2002; Sharpley et al., 2014). Por exemplo, o aumento do teor de matéria orgânica do solo pode melhorar a disponibilidade de P, aumentando a atividade microbiana do solo e reduzindo a adsorção de P pelas partículas do solo (Sainju et al., 2002). Outro estudo investigou o potencial de diferentes estratégias de fertilização, como o uso de fertilizantes fosfatados de liberação lenta ou de aditivos orgânicos, para melhorar a disponibilidade de P e reduzir o risco de poluição ambiental (Sharpley et al., 2014).

A ciclagem P_o do solo depende em grande parte do *pool* de P microbiano do solo, que juntamente com o rápido tempo de ciclagem da microbiota, representa uma fonte potencial de P para as plantas e outros organismos (Richardson & Simpson, 2011). Por ser um elemento essencial à vida, grande parte do P no solo está ligada à matéria orgânica ou à biomassa microbiana. Considera-se que o P constitui em torno de 24% do total da biomassa microbiana em florestas naturais (Spohn, 2020). As bio- e necromassa microbiana, desta forma, têm grande relevância na nutrição vegetal, ainda mais pela velocidade de sua ciclagem.

Ainda, a imobilização de P pode ocorrer quando os microrganismos absorvem e armazenam P em sua biomassa (Richardson & Simpson, 2011). Esse processo pode ocorrer por assimilação de P_i ou P_o . Os microrganismos que são eficientes na imobilização de P incluem aqueles que produzem substâncias poliméricas extracelulares, como exopolissacarídeos, que podem ligar P e outros nutrientes (Richardson & Simpson, 2011).

Estudos investigaram os fatores que influenciam a ciclagem de fitato no solo e seu potencial como fonte de P disponível para plantas. Por exemplo, Kuo et al. (2015) descobriram que a atividade fitase microbiana foi um fator chave na determinação da taxa de mineralização do fitato no solo e que foi influenciada por fatores como o pH do solo e o teor de umidade. Outro estudo de Li et al. (2020) aponta que a adição de inoculantes microbianos contendo enzimas fitase melhorou o crescimento das plantas e a absorção de P em solos com baixo teor de P disponível. Em um outro estudo, a adição de bactérias produtoras de fitase ao solo resultou em um aumento significativo na disponibilidade de P e no crescimento das plantas (Hameeda et al., 2016).

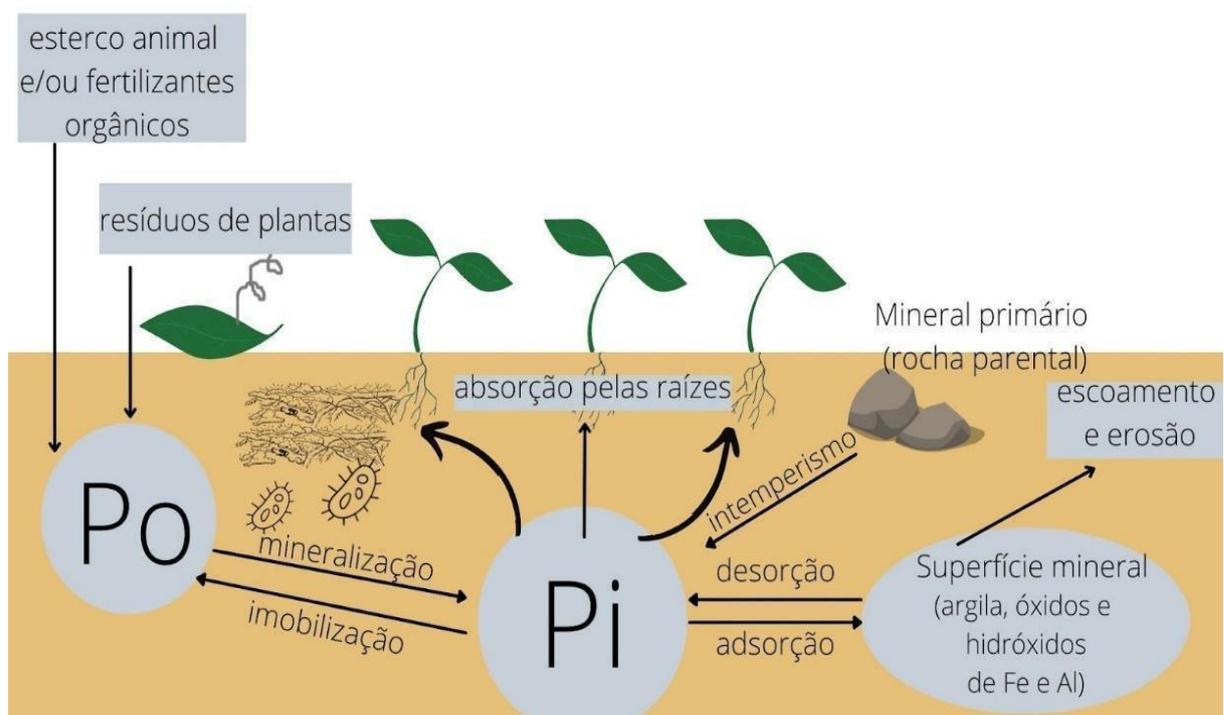


Figura 1: Ciclo do fósforo resumido. P_o : fósforo orgânico; P_i : fósforo inorgânico. Adaptado de Turner & Condon (2013).

1.3. P nas plantas

A importância do P para os organismos está ligada ao fato deste elemento estar presente em moléculas e estruturas essenciais que constituem a vida. O P na forma de fosfato é capaz de formar ligações químicas que possuem grande estabilidade (Kamerlin et al., 2013). As ligações fosfodiéster estáveis permitem a codificação da informação genética em ácidos nucleicos, e ao mesmo tempo, a transferência rápida e reversível de grupos fosforilados para proteínas por quinases e fosfatases permitem a regulação dos processos de sinalização celular e do metabolismo central (Kamerlin et al., 2013). Desta forma, o P é requerido na formação de membranas, constituindo a fase hidrofílica desta estrutura; possui funções bioenergéticas, constituindo moléculas como ATP; o elemento está relacionado também com a estrutura de moléculas portadoras de informações genéticas como DNA e RNA (Ham et al., 2018; Cuiyue Liang et al., 2010).

A absorção de P pelas raízes de plantas se mostra maior em solos mais ácidos (Dunlop & Bowling, 1978), em contrapartida em solos ácidos também é observada maior retenção do elemento nas superfícies minerais (Barrow, 2017). As raízes de plantas absorvem P de forma mais rápida do que a reposição do fosfato por difusão, por este motivo se criam áreas de depleção em torno das raízes (Lewis & Quirk, 1967). A área de depleção corresponde a área em imediata proximidade da raiz onde não há algum determinado recurso (Bhat & Nye, 1974).

Na solução do solo, o P disponível para absorção de raízes de plantas está na faixa de 0,1 a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Lynch, 2011). A maioria das culturas agrícolas têm sua produtividade limitada pelo P (Cordell et al., 2009) já que este elemento está em sua maioria em formas indisponíveis para as plantas no solo. Com o início das atividades industriais, houve o aumento e a aceleração de entrada de P na biosfera, fato atrelado a necessidade do uso de fertilizantes fosfatados para a manutenção da produção agrícola intensiva a partir do século XX (USDA, 2019). A maior parte do P_i utilizado como fertilizante, por exemplo, pode ser adsorvido às superfícies minerais e em consequência se torna indisponível às plantas (Darch et al., 2014; Yli-Halla, 2016). É observado que somente dentre 15% a 30% do P de fertilizantes fosfatados aplicados nos solos é utilizado pelas culturas no ano de sua aplicação (USDA, 2019). Ainda, além da possibilidade de eutrofização de ambientes aquáticos devido a lixiviação do P (Conley et al., 2009), a fertilização fosfatada pode levar ao acúmulo de elementos tóxicos como cádmio, selênio e arsênio no solo (Alori et al., 2017).

Ainda, há controvérsias sobre o pico de utilização de fertilizantes fosfatados já que o P é um elemento finito e não substituível (Beardsley, 2011). Alguns estudos sugerem que as reservas globais de rocha fosfática podem se esgotar nos próximos 50 a 100 anos se as taxas atuais de extração e consumo continuarem no ritmo atual (Cordell et al., 2009; Vaccari, 2009). Apenas de 0,05% a 0,015% do P presente no solo está disponível para ser absorvido pelas raízes de plantas (Hesterberg, 2010). Além disso, a utilização de fertilizantes inorgânicos a longo prazo pode diminuir a taxa de matéria orgânica do solo, contribuindo para a degradação do solo (Bhatt et al., 2019) e a redução de sua diversidade microbiana.

1.3.1. Resposta à deficiência de P

A faixa adequada de concentração de P nos tecidos vegetais varia amplamente dependendo da cultura e do estágio de crescimento, mas normalmente varia de 0,1% a 0,5% com base no peso seco (Marschner, 2023).

Características típicas de deficiência de P em plantas são a redução do crescimento, o acúmulo de antocianinas, malformação de folhas, manchas necróticas nas folhas e senescência de folhas mais velhas, além da produção de caules delgados e arroxeados (Taiz et al., 2015).

É comum entre as plantas privadas de P a alteração da arquitetura radicular através da atenuação do crescimento primário das raízes (Gruber et al., 2013; Bichara et al., 2021), pela rápida supressão do alongamento das células de sua zona de transição, bem como a inibição progressiva da divisão celular dos meristemas apicais e a formação de pelos radiculares e raízes laterais que possibilitem uma maior exploração da solução do solo (Baker et al., 2015; Balzergue et al., 2017). No nível molecular, esta inibição de alongamento e de divisão celular nas raízes de plantas deficientes em P parecem estar ligados ao gene *LPR1* (LOW PHOSPHATE ROOT), que codifica enzimas na parede celular com atividade de ferroxidase, levando a deposição de calose nas paredes celulares da zona de transição da raiz (Müller et al., 2015). Junto a isto, há mudanças na fisiologia de algumas plantas com raízes em agrupamentos densos de raízes laterais que intensificam a formação de pelos radiculares (Lambers et al., 2015; Wang & Lambers, 2020). Estes agrupamentos são capazes de exsudar fosfohidrolases capazes mobilizar P de fontes orgânicas, e ácidos carboxílicos, que levam à solubilização e dessorção de formas insolúveis de P ligadas

a óxidos e hidróxidos de Fe e Al (Lambers et al., 2015), através de troca de ligantes, complexação com cátions e solubilização mineral (Wang & Lambers, 2020). Raízes de plantas não-micorrízicas, como *Arabidopsis thaliana* podem apresentar potencial característico de exsudação de citrato, malato e/ou oxalato a fim de liberar P_i através da quelação de Fe, Al e Ca (Meyer et al., 2010), além de induzir, nessas condições, a expressão de transportadores de fosfato da família *PHT1* (*PHOSPHATE TRANSPORTER*) com alta afinidade por P_i (Lapis-Gaza et al., 2014).

Sob baixa disponibilidade de P no solo, a expressão de genes de transportadores de P como o *LaPT1* (*PHOSPHATE TRANSPORTER*) de tremço-branco (*Lupinus albus*) é induzida em raízes desta proteácea (Liu et al., 2001). Existem transportadores de membrana de alta e baixa afinidade por P, e esses transportadores são ativos na absorção e translocação de P_i dentro da planta (Jia et al., 2011). A indução da expressão desses genes é uma resposta adaptativa de nível genômico para sobrevivência em ambientes com P variável, regulando a homeostase de P na planta (Jia et al., 2011) e que pode contribuir para a otimização na eficiência da absorção (PU_pE) e do uso (PUE) de P.

A maioria dos genes de transportadores da família *PHT1* são específicos de raízes, sendo expressos principalmente em células epidérmicas radiculares (Mudge et al., 2002) ou em células corticais, podendo ser mais expressos após a colonização por FMAs, que podem modular a expressão dos genes transportadores das plantas e induzir transportadores especificamente expressos durante a simbiose (Bucher, 2007).

Outra estratégia para aumentar o PUE em plantas sob baixa disponibilidade de P é a remodelação dos lipídeos das membranas. Fosfolipídios das membranas podem ser substituídos por sulfolipídios ou galactolipídios em resposta à deficiência de P (Veneklaas et al., 2012). No entanto, essa remodelação dos lipídeos das membranas pode resultar em mudanças funcionais, como alteração na fluidez e no aumento do vazamento de eletrólitos, e influenciando a tolerância a baixas temperaturas, por exemplo (Hurry et al., 2000).

Plantas com deficiência de P podem redistribuir o elemento de tecidos fonte para tecidos dreno pela ativação de enzimas capazes de mobilizar o P internamente, como fosfatases (Baker et al., 2015), e de transportadores de membrana que

transportam o P entre as células, como os que atuam no carregamento de P no floema (Jia et al., 2011).

Não obstante, durante a aclimatação ao baixo P, na tentativa de otimizar o uso do elemento, a parte aérea tende a remobilizar açúcares para a raiz com o fim de realocar fontes de carbono para o crescimento radicular (Hermans et al., 2006). A translocação de açúcares via floema também tem o potencial de iniciar cascatas sinalizadoras que alteram a expressão de genes envolvidos nas respostas ao baixo P, que incluem o aumento de expressão e atividade de transportadores de P, a maior secreção de enzimas hidrolíticas e a exsudação de ácidos orgânicos (Hammond & White, 2011). As cascatas de sinalização que promovem o crescimento incluem o sensor de glicose HXK1 (ARABIDOPSIS HEXOKINASE) e o sinal da trealose-6-fosfato (Smeekens et al., 2010). Desta forma, carboidratos derivados da parte aérea possuem um duplo papel, disponibilizando substratos intermediários para o metabolismo e atuando como moléculas sinalizadoras (Smeekens et al., 2010).

O RNA constitui até 85% do pool de ácidos nucleicos em células vegetais, sendo principalmente RNA ribossômico (rRNA), que é uma molécula muito rica em P (Veneklaas et al., 2012). Algumas plantas da família das Proteaceae, altamente eficientes no uso de P, apresentam menores níveis de rRNA do que plantas de outras famílias (Sulpice et al., 2014). Isto pode causar efeitos metabólicos no desenvolvimento da planta como a menor síntese de proteínas; menor proporção de fotossistemas I e II nos cloroplastos; um maior intervalo de tempo para o esverdeamento em folhas jovens e maiores taxas de fotossíntese em folhas maduras (Sulpice et al., 2014). O P também está presente no DNA e espécies com genomas maiores ou com maior número de ploidia podem ser menos eficientes no uso de P do que espécies com genomas menores (Veneklaas et al., 2012).

As respostas moleculares à deficiência de P são reguladas por fatores de transcrição como *PHR1* e *LPRs*, que estão envolvidos na regulação de genes responsáveis pelo transporte e remobilização do P interno, pela indução da expressão de transportadores de alta afinidade de P, pela formação de associações das raízes com microrganismos, ou pelo aumento no comprimento e densidade de pelos radiculares, por exemplo (Rongsawat et al. 2020; Ruiz et al. 2020; Bates & Lynch 2001). Mudanças na morfologia radicular e proliferação de raízes secundárias são promovidas pelo aumento da síntese de etileno sob deficiência de P (Baker et al.,

2015). A sinalização do estresse de P entre a parte aérea e as raízes pode ocorrer por meio de *microRNAs* (Baker et al., 2015). Essa série de respostas objetiva promover uma nova homeostase de P na planta, para que esta seja capaz de sobreviver em condições de baixa disponibilidade do elemento (Baker et al., 2015).

Conforme aumenta o pool de P na planta, é observado o aumento da quantidade de Pi no citoplasma e é induzido o armazenamento de Pi no vacúolo (Veneklaas et al., 2012). O Pi armazenado nos vacúolos pode ser exportado em casos de deficiência de P (Baker et al., 2015).

1.4. Aquisição de P por raízes

Plantas podem exsudar ácidos carboxílicos capazes de solubilizar o P imobilizado em superfícies minerais e secretar enzimas com atividade fosfatase e disponibilizar Pi oriundo de fontes orgânicas presentes na rizosfera (Lambers et al., 2008). Essa estratégia é frequentemente observada em plantas não-micorrízicas de regiões com solos extremamente empobrecidos em P, ou com P altamente retido nas superfícies minerais, já que plantas não-micorrízicas podem acessar e absorver apenas o P próximo às suas raízes. Essas estratégias de plantas não-micorrízicas têm sido bastante estudadas na família Proteaceae que exhibe uma modificação radicular de agrupamento de raízes ("*clusters roots*") capazes de exsudar grandes quantidades de carboxilatos solubilizadores de P (Shane & Lambers, 2005). Essa adaptação para aquisição de nutrientes em solos empobrecidos também pode ser observada em famílias como Casuarinaceae, Fabaceae e Myricaceae (Shane & Lambers, 2005). Não obstante, algumas raízes de plantas micorrízicas, como *Eucalyptus patens*, exibem exsudação de carboxilatos em alta quantidade sem a presença de estruturas radiculares especializadas (Lambers et al., 2021).

Desta forma, compostos com grupos carboxílicos exsudados pelas raízes têm a capacidade de mobilizar fontes orgânicas de P adsorvidas a constituintes do solo, como a mobilização de glicose-6-fosfato por ácidos orgânicos como o oxalato e ascorbato (Goebel et al., 2017). A mobilização de P via ácidos orgânicos por plantas de *Nicotiana tabacum* resultou na maior aquisição de P a partir da combinação de citrato, com a secreção de enzimas fosfatases e fitases (Giles et al., 2017).

Plantas não-micorrízicas sem estratégia específica para aquisição de P como em Brassicaceae, oriundas de regiões com solos ricos em nutrientes, não

exibem estratégias adaptativas das raízes, e são conhecidas como fosfófilas (Lambers, 2008).

Em resumo, para obter o P_i necessário para o crescimento, as plantas desenvolveram respostas genéticas intrincadas e coordenadas para melhorar a aquisição do elemento, ao mesmo tempo em que conservam e remobilizam os depósitos internos de P_i .

Uma outra estratégia apontada por Lambers (2008) para obtenção de P em solos empobrecidos se baseia na exploração de um maior volume da solução do solo através da simbiose com FMA capazes de obter o P presente além da área de depleção de P formada ao redor da raiz. Então, além da absorção direta de P, as plantas também realizam uma troca de recursos subterrâneos, adquirindo P_i pela via micorrízica. No entanto, em concentrações muito baixas de P na solução do solo, a colonização por fungos micorrízicos é inibida (Abbott et al., 1984), o que leva a hipótese de que estratégias de mineralização e absorção direta de P sejam mais efetivas nestas condições.

1.4.1. Exsudação radicular

Como dito acima, as raízes de plantas sob baixa disponibilidade de P podem exsudar compostos que potencializam a sua absorção (Lambers, 2022). A exsudação radicular tem custo alto em termos de C, compreendendo entre 5% e 10% do C líquido fixado na fotossíntese. Entre os compostos exsudados estão ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, fenóis, flavonóides, esteróis, hormônios, vitaminas e até proteínas/enzimas (Ait Lahmidi et al., 2016; Harrison, 1993; Kretschmar et al., 2012). Alguns compostos exsudados podem atrair microrganismos capazes de se associar com as raízes e/ou disponibilizar o P retido no solo (Yuan et al., 2015). Compostos fenólicos como a rutina, demonstram potencial quimiotático, estimulando o crescimento de hifas micorrízicas em *E. globulus* (Lagrange et al., 2001). Flavonóides como catequina e quercitina apresentam relação com a melhora da toxicidade por metais como Al (Kidd et al., 2001) através da sua quelação no meio intracelular, promovendo detoxificação celular, ou extracelularmente, evitando a absorção do metal (Barceló & Poschenrieder, 2002). Ainda, a grande diversidade de exsudatos radiculares inclui compostos com função de defesa, como o diterpeno rizataleno A, que tem ação contra insetos herbívoros

(Baetz & Martinoia, 2014). Os exsudatos radiculares têm sua liberação associada com família de transportadores ABC e MATE, conforme os estímulos externos de disponibilidade nutricional, por exemplo (Baetz & Martinoia, 2014).

Além da capacidade conhecida dos ácidos málico, cítrico, oxálico, succínico e fumárico em solubilizar o P por processos de troca de ligantes e complexação de cátions, também foi observado o papel quimiotático desses ácidos no recrutamento bactérias promotoras de crescimento vegetal na rizosfera (Yuan et al., 2015). A maioria desses ácidos se encontram como ânions totalmente dissociados devido ao pH do solo e suas propriedades de dissociação. Aproximadamente 99% do ácido málico, por exemplo, se exibe na forma do ânion malato em pH 7 (Ryan et al., 2001). Recentemente foi observado que sob limitação de P espécies de eucalipto apresentaram aumento significativo da exsudação de ácidos orgânicos, apresentando maior quantidade de ácido cítrico e isocítrico nos exsudatos radiculares (Andrade et al., 2022).

Mucilagens e mucigel são secretados pelas raízes através de processos envolvendo o complexo de Golgi de células da coifa radicular hipersecretoras, como no caso do ácido poligalacturônico (Vermeer & McCully, 1981). Além disso, as células epidérmicas e pelos radiculares também podem secretar mucilagem (Vermeer & McCully, 1981). A mucilagem e o mucigel podem não apenas proteger o meristema da raiz, mas também melhorar o contato da raiz com o solo por inclusão e agregação de partículas do solo (Carminati et al., 2017; McCully, 1999). O contato próximo entre as partículas do solo e a superfície da raiz via mucilagem pode ser de considerável importância na absorção de nutrientes, particularmente micronutrientes e P (Marschner, 2023). Possíveis funções dos surfactantes de fosfatidilcolina da mucilagem radicular na mobilização de P, inibição da nitrificação e modificação da retenção de água no solo têm sido discutidas por Read et al. (2003).

ATPases de membranas plasmáticas radiculares estão envolvidas na exsudação de prótons na rizosfera reduzindo o pH (Shen et al., 2006). A privação de P pode induzir um aumento transitório de ácido indol-3-acético endógeno (AIA) em raízes de soja, aumentando a exsudação de H⁺ pelas raízes (Shen et al., 2006). A diminuição do pH citoplasmático e a despolarização da membrana estimulam H⁺-ATPase da membrana plasmática que bombeia prótons para fora da célula para

manter o pH intracelular e, assim, fornecer a força motriz para a absorção de fosfato (Ullrich et al., 1984).

Os ânions orgânicos, bem como prótons exsudados, no caso de solos mais básicos, podem ocupar sítios de adsorção em minerais do solo que poderiam ser ocupados por íons fosfato ou compostos de P_o . Uma vez liberado dos sítios de adsorção, o P_i pode ser diretamente absorvido pelas raízes, em contrapartida, as formas de P_o dissociadas dos sítios de sorção não podem ser absorvidas diretamente pela planta pois precisam ser antes mineralizadas (Wang & Lambers, 2020).

1.4.2. Enzimas extracelulares secretadas pelas raízes

Em resposta à deficiência de P, as plantas desenvolveram a capacidade de secretar enzimas como fosfatases, ribonucleases (RNases), apirases e até proteases na rizosfera para promover a mineralização do P_o no solo e aumentar a absorção de P_i (Tadano & Sakai, 2012).

As fosfatases ácidas são constituídas por uma diversa família de enzimas intra- e extracelulares capazes de liberar o fosfato ligado a várias formas orgânicas e desempenham papel tanto na aquisição quanto na remobilização de P, especialmente em condições de baixa disponibilidade do nutriente (Zhu et al., 2020; Veneklaas et al., 2012; Liu et al., 2018). Considerando a grande quantidade de P presente em ácidos nucleicos de células, a atividade da fosforilase da RNase intracelular durante a senescência de órgãos ou em condições de baixo P contribui para a remobilização do P e o maior PUE (Bariola et al., 1999). Enzimas RNases e fosfodiesterases podem ser secretadas por raízes de plantas privadas de P (Jost et al., 1991; Nürnberger et al., 1990), promovendo a mineralização de fontes de P_o na rizosfera. As fosfatases ácidas atuam sobre compostos fosfoésteres como açúcares fosfato, disponibilizando o P_i a partir da hidrólise do açúcar (Hayes et al., 2000).

Da mesma forma, as fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) – considerado o maior grupo de fosfatases em plantas - desempenham um papel importante na hidrólise de P a partir de uma ampla gama de compostos de P_o , incluindo mononucleotídeos derivados da quebra de ácidos nucleicos (Plaxton & Tran, 2011). As PAPs extracelulares podem liberar P_i de fontes orgânicas de P no solo, potencializando a atividade fosfatase da superfície das raízes e a aquisição do elemento em condições de baixa disponibilidade de P (Kavka et al., 2021). As PAPs

extracelulares ainda se mostram capazes de mobilizar P presente em moléculas de ATP no meio externo (Kavka et al., 2021). Os genes *GmPAP7a* e *GmPAP7b* quando superexpressos em raízes podem contribuir para a utilização de P de moléculas de ATP (Zhu et al., 2020), que podem ter sua origem no solo a partir da atividade metabólica de microrganismos rizosféricos (Scheerer et al., 2019). Foram identificados 38 membros de PAPs em soja (Zhu et al. 2020), 29 em *Arabidopsis* (Li et al., 2002), e 33 em milho (González-Muñoz et al., 2015) e álamo, que se expressam em diferentes órgãos e em resposta a sinais ambientais ou do desenvolvimento (Kavka et al., 2021).

Dentro do grupo das fosfatases, estão as fitases que hidrolisam P_i da molécula de inositol hexafosfato, conhecida como fitato ou ácido fítico, e portadora de seis grupos fosfato (Giles et al., 2017; Hayes et al., 2000). Nas plantas, em torno de 75% do fitato está localizado nas sementes. Desta forma, a atividade fitase é observada durante o início da germinação de sementes (Secco et al., 2017). O fitato também ocorre em outros tecidos, mas em concentrações menores, e diversos inosítois fosfato participam de cascatas de sinalização molecular. Em suma, a planta é uma importante fonte de fitato do solo (Liu et al., 2022). O fitato do solo, por sua vez, tem sua origem nos resíduos vegetais ou do metabolismo microbiano. O fitato é estável em solos devido principalmente à sua complexação com vários metais e sua forte ligação a componentes dos solos. Devido a sua alta densidade de carga, conferida pelos grupos fosfato, o fitato liga-se a óxidos de Fe e Al em solos ácidos e a minerais de Ca e magnésio (Mg) em solos alcalinos, e se liga fortemente à matéria orgânica do solo. O acúmulo de fitatos nos solos tem sido estimado em 51 milhões toneladas métricas anuais, correspondendo a aproximadamente 65% do P adicionado como fertilizante (Liu et al., 2022). Assim, grande parte do P_o encontrado no solo é constituído por fitato, constituindo, por exemplo, cerca de 18% do P_o em solos superficiais australianos e canadenses (Williams & Anderson, 1968; McKercher & Anderson, 1968) e até 80% da fração de P total dos solos (Giles et al., 2017). Desta forma, o fitato representa uma fonte potencial de P para plantas, uma vez que as raízes podem ter atividade fitase extracelular (Secco et al., 2017). No entanto, a alta quantidade de fitato acumulado no solo está relacionada com sua resistência em ser mineralizado (Anderson, 2015), em contraste com outras formas de P_o como ácidos nucleicos e fosfolipídios (Dalai, 1977).

Algumas plantas podem apresentar fitases em raízes e exsudatos radiculares, mas na maioria das vezes as raízes exibem baixa atividade fitase tornando-as relativamente ineficazes na hidrólise do fitato do solo e, portanto, em utilizar o P contido nele (Hayes et al., 1999; Richardson et al., 2000). No entanto, o crescimento e a nutrição fosfatada de plantas de *Arabidopsis* supridas com fitato melhoraram significativamente quando foram geneticamente transformadas com o gene da fitase (*phyA*) do fungo *Aspergillus niger* (Richardson et al., 2001). Não obstante, Giles et al., (2017) observaram um aumento na atividade fitase extracelular de *Nicotiana tabacum* na presença do citrato, concluindo que a exsudação co-localizada de citrato e fitase por linhagens cruzadas de plantas é mais eficaz do que o cultivo consorciado de duas plantas com características únicas contrastantes.

No solo, a fitase é produzida principalmente por microrganismos, incluindo bactérias de gêneros como *Bacillus* e *Pseudomonas* e fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* (Hameeda et al., 2016). Os estudos genéticos das fitases começaram em 1984, e a primeira fitase comercial, produzida por microrganismos geneticamente modificados, apareceu no mercado em meados da década de 1990 (Yanming et al., 1999). Assim, como meios para o aumento da atividade fitase em plantas são indicados: a inoculação de microrganismos produtores de fitase no solo (Bashan et al., 2013) e as práticas de manejo do solo, como a adição de matéria orgânica, composto ou esterco, que podem aumentar as populações microbianas que produzem fitase no solo. Além disso, manter um pH do solo neutro ou ligeiramente ácido pode promover a atividade da fitase no solo (Richardson et al., 2001) e/ou tratamentos químicos, como o uso de ácidos orgânicos ou enzimas, que também podem aumentar a atividade fitase nas plantas (Kanwar et al., 2017).

A atividade fosfatase nas raízes das plantas pode ser influenciada por uma série de fatores, incluindo pH do solo, disponibilidade de P e espécies de plantas (Richardson et al., 2011; Vance et al., 2003; Lambers et al., 2012). Por exemplo, a atividade fosfatase é geralmente maior em solos ácidos, onde a disponibilidade de P é baixa, pois as plantas precisam contar com a atividade da fosfatase para mobilizar o P de fontes orgânicas (Richardson et al., 2011). Além disso, diferentes espécies de plantas demonstraram ter níveis variados de atividade fosfatase, com algumas espécies exibindo níveis mais altos de atividade enzimática do que outras (Vance et al., 2003).

No geral, as fosfatases são enzimas essenciais nas raízes das plantas, desempenhando um papel crítico na aquisição e mobilização de P, um macronutriente crucial necessário para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Veneklaas et al., 2012). Compreender os fatores que influenciam a atividade da fosfatase nas raízes das plantas pode ajudar a otimizar as práticas de manejo do solo e das plantas para melhorar a PUE e conseqüentemente a produtividade das culturas.

Outros tipos de enzimas extracelulares são as proteases e peptidases, que são capazes de mineralizar proteínas e peptídeos no ambiente da rizosfera, produzindo aminoácidos e peptídeos de menor tamanho (Vranova et al., 2013). As plantas de habitats naturais e agrícolas podem absorver aminoácidos do solo, e esses aminoácidos são fontes potencialmente importantes de N para as plantas. Desta forma, Godlewskie & Adamczyk (2007) concluíram com seus estudos que plantas podem desenvolver estratégias para aumentar ativamente o nível de aminoácidos livres na solução do solo como fonte de N.

Existem vários tipos de proteases, como as exopeptidases que agem nas ligações peptídicas dos aminoácidos terminais das cadeias peptídicas, bem como no carbono ou no N terminais, sendo capazes de remover um, dois ou três aminoácidos do lado N-terminal, enquanto as endopeptidases (sinônimo de proteinases) catalisam a hidrólise das ligações peptídicas internas (Landi et al., 2011).

As endopeptidases são reconhecidas de acordo com a natureza química dos grupos responsáveis pela atividade catalítica (Landi et al., 2011) e são divididas em quatro classes distintas: serina, cisteína, aspártica e metaloendopeptidases (Kalisz, 1988, Page e Di Cera, 2008). Godlewskie & Adamczyk (2007) demonstraram a produção de proteases cisteína por raízes de plantas agrícolas cultivadas assepticamente, onde nenhuma proteína foi necessária para induzir sua secreção. A secreção de protease difere dependendo do local da raiz, sendo que os ápices secretam proteases mais intensamente em comparação com partes maduras, e pode ser afetada por estresses, incluindo herbivoria (López-Bucio et al, 2003; Singh et al., 2009). O conhecimento acerca das proteases extracelulares de plantas na nutrição vegetal de N ainda é escasso apesar de todos os trabalhos tratados sobre proteases do solo. Em estudo recente se concluiu que a proteína do solo tem que estar de forma muito próxima a superfície da raiz para que a absorção de N oriundo de proteínas seja significativa (Greenfield et al., 2020). Nesse mesmo trabalho também se concluiu que

a falta de indução de proteases na deficiência de N sugere que a atividade protease não está relacionada a um aumento na aquisição de N (Greenfield et al., 2020).

1.4.3. Absorção de formas orgânicas de nutrientes pelas plantas

O nitrogênio (N) entra no solo principalmente através da fixação de dinitrogênio (N_2) e da deposição atmosférica. O N está relacionado à estrutura das plantas por constituir moléculas fundamentais à vida como ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas. As plantas podem usar uma ampla gama de formas químicas de N, variando de compostos inorgânicos de N, como amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), e formas orgânicas como aminoácidos e peptídeos, sem necessidade de assistência de microrganismos do solo (Paungfoo-Lonhienne et al., 2008). Entretanto, assim como ocorre no caso da deficiência de P, para lidar com a deficiência de N, grandes quantidades de fertilizantes comerciais são usadas na agricultura e na silvicultura. O uso excessivo de fertilizantes inorgânicos nitrogenados resulta em poluição ambiental, bem como em efeitos adversos à saúde humana e animal (Gruber & Galloway, 2008). Formas de N inorgânico como nitrato e amônio são as principais formas absorvidas pelas plantas na maioria dos solos. No entanto, a contribuição do N oriundo de aminoácidos para a nutrição da planta pode ser mais relevante do que inicialmente suposto, principalmente em solos de regiões mais frias com maior acúmulo de matéria orgânica (Larcher, 2001).

As plantas possuem proteínas inter-membranas para transporte de aminoácidos com diferentes especificidades de substrato e padrões de expressão dependendo do órgão e do tecido (Tegeder & Masclaux-Daubresse, 2018). Em *Arabidopsis thaliana* existem mais de 100 genes que codificam para transportadores de aminoácidos (Schwacke et al., 2003) classificados em duas famílias principais: *ATF* (*AMINO ACID TRANSPORTER FAMILY*) e *APC* (*ACID-POLYAMINE-CHOLINE FAMILY*) (Rentsch et al., 2007). A família de transportadores ATF se divide em seis subfamílias, onde uma delas, *LHT* (*LYSINE HISTIDINE TRANSPORTER*), com 10 membros, é responsável por processos, que variam desde o desenvolvimento de pólen (Lee & Tegeder, 2004) à absorção de aminoácidos pelas raízes (Svennerstam et al., 2007). Os genomas das árvores em geral podem conter dezenas de genes que codificam a família de transportadores *LHT* (Madeira et al., 2019). Foi observado especificamente que *AtLHT1* de *A. thaliana* está envolvido na absorção de

aminoácidos neutros e ácidos em solos de sistemas naturais (Svennerstam et al., 2011) e em solos agricultados (Ganeteg et al., 2017). Recentemente foi identificado *PtrLHT1.2*, um gene homólogo de *AtLHT1* em um híbrido de álamo (*Populus tremula L. x P. tremuloides Michx*), indicando sua função na nutrição de N em espécies arbóreas (Gratz et al., 2021).

A permease *AAP5* (*AMINO ACID PERMEASE 5*) está envolvida na absorção de aminoácidos catiônicos como L-arginina e L-lisina tanto em alta quanto em baixas concentrações externas a raiz (Näsholm et al., 2009; Rui et al., 2022; Svennerstam et al., 2008). Além disso, foi observado que transportador de prolina ProT2 (*PROLINE TRANSPORTERS 2*) está envolvido na absorção radicular de aminoácidos (Hirner et al., 2006; Lee et al., 2007; Lehmann et al., 2011; Svennerstam et al., 2007). Também foi observado que a disponibilidade de N pode afetar a formação de raízes e de transportadores de peptídeos como os da família PTR (*PEPTIDE TRANSPORTER*) (Paungfoo-Lonhienne et al., 2009), e que PTR1, transportador de nitrato, di- e tripeptídeos, é codificado pelo gene *LATD/NIP*, que tem papel na formação de raízes laterais e primárias em *Medicago truncatula* (Harris & Dickstein, 2010).

Em solos superficiais de regiões temperadas e úmidas, entre 90 e 98% do enxofre (S) está geralmente presente em formas orgânicas. Assim como no caso do P, não se conhecem exatamente as formas químicas de S orgânico no solo (Zhao et al., 2006). Entretanto, se sabe que o S pode estar na matéria orgânica: em sua forma mais reduzida, em compostos como sulfetos, dissulfetos, tióis e tiofenos; no estado redox intermediário, incluindo sulfóxidos e sulfonatos nos quais o enxofre está ligado ao carbono, mas também ao oxigênio e em formas altamente oxidadas de S formando sulfatos de éster (Zhao et al., 2006). Diferentemente do N, não há registros da absorção direta de S orgânico pelas raízes. Entretanto, aminoácidos como cisteína, cistina e metionina, possuem S e possivelmente podem ser absorvidos pelos transportadores de aminoácidos presentes em membranas de células das raízes. Portanto, a maior parte de S encontrado na matéria orgânica do solo precisa ser mineralizada pela microbiota do solo, disponibilizando S em sua forma de sulfato para absorção e assimilação pelas plantas (Narayan et al., 2022).

O P, por sua vez, pode estar presente no solo numa grande variedade de compostos orgânicos. Utilizando ATP marcado com ^{33}P como única fonte de P, foi

observado que plantas do híbrido *Populus x canescens* aclimatadas a condições de baixo P_i apresentaram maior atividade fosfatase quando expostas ao ATP, no entanto, quando aclimatadas a altas concentrações de P_i tiveram baixa atividade fosfatase quando expostas ao ATP (Kavka et al., 2021). Liang et al., (2010) caracterizaram o gene de uma fosfatase ácida (*PvPAP3*) que é ancorada na membrana plasmática de células epidérmicas e secretada no apoplasto de plantas de *Phaseolus vulgaris*. O produto de *PvPAP3* foi associada à utilização de ATP extracelular como fonte de P em plantas com superexpressão do gene. George et al. (2008) utilizaram glucose-6-fosfato e RNA como únicas fontes de P *in vitro* e observaram o aumento na atividade fosfodiesterase e fosfomonoesterase associada à raiz e secretada em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.).

A absorção do P em sua forma orgânica não tem sido descrita, uma vez que as raízes absorvem o fosfato liberado após a mineralização de compostos orgânicos com P. Entretanto, Scheerer *et al.* (2019) sugeriram que tanto a adenosina monofosfato (AMP) quanto o ADP poderiam ser absorvidos integralmente por raízes de álamo (*Populus x Canescens*) sem prévia hidrólise de grupos fosfatos, mas a evidência com nucleosídeos e nucleotídeos marcados com ^{33}P e ^{15}N confirmou a absorção do nucleosídeo adenosina, o qual não contém P.

1.5. Microrganismos rizosféricos: solubilização e mineralização do P_o

Em ecossistemas naturais e agrícolas, as plantas existem em íntima associação com uma miríade de microrganismos (Oulhen et al., 2016). O microbioma da planta é constituído por todos os microrganismos presentes nas superfícies e no interior dos tecidos dos órgãos vegetais; desde a superfície das folhas, a filosfera; em tecidos internos da planta, a endosfera, e na superfície da raiz, rizoplano, assim como a região do solo sob influência da raiz, a rizosfera (Andreote et al., 2014). Bactérias, archaea, fungos, oomicetos, metazoários e vírus residem na rizosfera (Philippot et al., 2013).

Como dito acima, alguns microrganismos do solo podem ser patogênicos às plantas, no entanto, grande parte fornece benefícios aos vegetais (Jacoby et al., 2017). Destacam-se como microrganismos rizosféricos benéficos às plantas os fungos micorrízicos, as bactérias capazes de fixar N_2 , além de fungos e rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) (Jacoby et al., 2017).

O recrutamento de microrganismos benéficos para a rizosfera é realizado através da exsudação radicular de compostos específicos com propriedades semioquímicas (Jacoby et al., 2017). Os exsudatos radiculares, além de fornecerem C para os microrganismos heterotróficos, são fonte de sinais moleculares que permitem que os microrganismos e a planta se comuniquem através de interações químicas. Alguns compostos dos exsudatos radiculares podem apresentar atividade hormonal como no caso das estrigolactonas que iniciam a cascata de sinalização que permite o estabelecimento da simbiose com FMAs (Jacoby et al., 2017).

As RPCPs apresentam vários mecanismos que podem promover o crescimento das plantas, como a fixação de N_2 ; a solubilização de P e K de fontes minerais pouco solúveis; a produção de sideróforos capazes de diminuir a disponibilidade de nutrientes para plantas competidoras ou microrganismos patogênicos (Blindauer & Schmid, 2010; Jacoby et al., 2017). Diversas espécies de RPCPs, dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium*, por exemplo, são capazes de solubilizar o P adsorvido às superfícies minerais através do metabolismo respiratório, que acidifica o meio e dessorve o fosfato. Bactérias e fungos podem mineralizar fontes orgânicas de P através de fosfatases ácidas, alcalinas ou pela ação de fitases e ribonucleases. Como grande parte do P_o presente no solo é constituída pela biomassa microbiana (Spohn, 2020), a capacidade destes microrganismos de mineralizar o P_o está relacionada com a ciclagem de P do solo, o que é importante para a nutrição das plantas.

Ácidos orgânicos são produzidos no espaço periplasmático pela via de oxidação direta (Zhao et al., 2014) e juntamente com seus íons carboxila e hidroxila quelam cátions ou reduzem o pH para liberar P (Seshachala & Tallapragada, 2012). A excreção desses ácidos orgânicos é acompanhada por uma queda no pH que resulta na acidificação das células microbianas e do ambiente (Goldstein, 1994). Um mecanismo alternativo à produção de ácidos orgânicos para solubilização de fosfatos minerais é a liberação de H^+ para a superfície externa em troca da captação de cátions, papel de H^+ -ATPases (Rodríguez & Fraga, 1999). A assimilação de NH_4^+ dentro das células microbianas é acompanhada pela liberação de prótons e isso resulta na solubilização do P (Sharma et al., 2013).

O ácido glucônico é o ácido orgânico produzido por bactérias mais frequente na solubilização de minerais fosfato, quelando os cátions ligados ao fosfato

e disponibilizando às plantas (Goldstein & Krishnaraj, 2007). Goldstein (1996) propôs a oxidação direta da glicose em ácido glucônico como o principal mecanismo para a solubilização do fosfato mineral em bactérias gram-negativa. A biossíntese do ácido glucônico é realizada pela enzima glicose desidrogenase (*GDH*) e pelo cofator pirroloquinolina quinona (*PQQ*).

Os genes *mps* (*mineral phosphate-solubilizing*) e *pK1M10* produzem ácido glucônico e solubilizam P_i além de provavelmente estarem envolvidos na síntese de *PQQ* (Goldstein & Liu, 1987). Já os genes *gabY* e *pKG3791* também produzem ácido glucônico e solubilizam P_i , mas não têm homologia com genes de *PQQ* (Babu-Khan et al., 1995; Y.-O. Kim et al., 1998; Krishnaraj & Goldstein, 2001).

A solubilização de minerais fosfato por microrganismos também pode ocorrer através da produção de ácidos inorgânicos como ácido sulfúrico, nítrico e carbônico, além da produção de substâncias quelantes (Kim et al., 1997). Entretanto, é observado que a produção de ácidos inorgânicos e substâncias quelantes são menos efetivas na solubilização de fosfato mineral do que ácidos orgânicos (Kim et al., 1997).

Bactérias ainda podem mineralizar o P ligado a compostos orgânicos no solo através de diferentes enzimas (Alori et al., 2017). O P pode ser liberado de compostos orgânicos no solo por três grupos de enzimas: (1) fosfatases inespecíficas (NSAPs), que realizam a desfosforilação de ligações fosfoéster ou fosfoanidrido na matéria orgânica, (2) fitases, que causam especificamente a liberação de P do ácido fítico e (3) fosfonatases e C–P liases, enzimas que realizam a clivagem de ligações C–P em organofosfonatos (Rodríguez et al., 2006). Dentre as NSAPs estão as fosfomonoesterases que podem ser ácidas ou alcalinas (Jorquera et al., 2011). Nos solos a principal atividade de mineralização de P_o corresponde às fosfatases ácidas e fitases devido à presença predominante de seus substratos no solo e ao pH da maioria dos solos ser de ácido a neutro (Rodríguez and Fraga, 1999).

Grande parte do P_o no solo é constituído por fitato, desta forma, genes de fitase termicamente estáveis de *Bacillus sp. DS11* (Kim et al., 1998) e de *B. subtilis VTT E-68013* (Kerovuo et al., 1998) foram clonados. Os genes da fosfatase ácida-fitase de *E. coli* (genes *appA* e *appA2*) também foram isolados e caracterizados (Golovan et al., 2000; Rodriguez et al., 1999). A dupla funcionalidade dessas enzimas as torna de potencial interesse biotecnológico para fins de solubilização de P_o no solo.

Além disso, fitases neutras podem ter grande potencial para transformação genética de plantas, uma vez que fitases fúngicas possuem menor especificidade de substratos do que fitases neutras bacterianas (Tye et al., 2002).

A utilização de microrganismos solubilizadores de P como inoculantes microbianos é um novo horizonte para uma melhor produtividade vegetal. Esta tecnologia pode contribuir para sistemas agrícolas de baixo consumo possibilitando uma produtividade mais eficiente na utilização de nutrientes (Kirui et al., 2022).

No fim da vida, a biomassa microbiana contribui para a impressão molecular microbiana na formação de matéria orgânica do solo com propriedades específicas na forma de necromassa microbiana, como por exemplo: sequestro de C, retenção de nutrientes e água, habitat para organismos, entre outros (Baveye et al., 2016). Efeitos positivos da necromassa microbiana na dinâmica do carbono orgânico do solo e no acúmulo de lignina foram observados (Li et al., 2020), bem como sua influência na formação da matéria orgânica do solo, contribuindo com a ciclagem de nutrientes (Kästner et al., 2021; Chao Liang et al., 2020). Entretanto, o papel da necromassa microbiana como fonte de P para as plantas não tem sido explorado.

1.5.2. Fungos micorrízicos arbusculares: absorção e mineralização de P

Entre os microrganismos do solo, os FMAs são capazes de estabelecer associações micorrízicas com raízes de cerca de 80% das plantas vasculares (Brundrett & Tedersoo, 2018). Nesta associação a planta fornece C para o FMA, enquanto o FMA em troca, disponibiliza nutrientes minerais e água (Evert et al., 2013).

Registros fósseis do Devônico, há 400 milhões de anos, sugerem que os a relação simbiótica entre FMAs e plantas já estava presente em espécies da flora terrestre primordial, indicando a origem ancestral tanto dos fungos quanto da simbiose num processo de coevolução (Strullu-Derrien, 2018).

Estudos filogenéticos recentes revelam que a ausência de simbiose com FMAs em espécies não-micorrízicas está associada a perda de genes reguladores da relação simbiótica (Bravo et al., 2016). A associação micorrízica arbuscular também pode conferir aumento de resistência a estresses ambientais, além de contribuir com a estabilidade do solo, o que sugere que os FMAs sejam ótimos aliados à agricultura sustentável (Gianinazzi et al., 2010).

O estabelecimento da associação micorrízica arbuscular ocorre a partir de um diálogo molecular pré-simbiótico entre planta e fungo, onde as raízes liberam

compostos como flavonoides e estrigolactonas (SLs), que podem ou não ser uma resposta da planta ao baixo P dependendo da intensidade (Montero et al., 2019). Esses compostos são percebidos pelo FMA, que por sua vez libera os chamados fatores Myc, que são lipoquitooligossacarídeos (LCOs), que são detectados pelas raízes (Harrison, 1993; Klop Holz et al., 2011; Kretschmar et al., 2012; E. Wang et al., 2012). Este processo ativa uma via de sinalização de simbiose, conhecida como rota simbiótica comum, através de uma cascata de respostas gênicas que promovem a acomodação intracelular do simbionte (Camps et al., 2015). O hifopódio, uma hifa especializada ramificada e inchada, se forma ao contato com a superfície da raiz e a percepção do hospedeiro desencadeia o crescimento de hifas e ramificações do FMA. Além disso, estudos recentes em arroz demonstraram que o regulador transcricional de resposta à baixo P *PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 2 (PHR2)* regula o estabelecimento da associação micorrízica arbuscular, sendo um gene requerido para a colonização radicular (Das et al., 2022). Uma vez que o FMA penetra as células epidérmicas da raiz, a planta direciona, através da expressão de vários genes e fatores de transcrição, o crescimento do fungo, eventualmente formando os arbúsculos, hifas altamente ramificadas que invaginam a membrana de células corticais e que são considerados os sítios de troca de nutrientes entre hóspede e hospedeiro (Gutjahr & Parniske, 2013). Concomitantemente podem ser formadas outras estruturas fúngicas intrarradiculares, as vesículas, que atuam como reservatório de lipídios (Gutjahr & Parniske, 2013).

Os FMAs pertencem ao phylum Glomeromycota, subphylum Glomeromycotina, e constitui um grupo com cerca de 300 espécies conhecidas (Stürmer & Kimmelmeier, 2021). Outros autores com base em análises filogenéticas colocam o subfilo Glomeromycotina dentro do filo Mucoromycota (Spatafora et al., 2016). A planta hospedeira fornece carbono na forma de hexoses e ácidos graxos para o FMA, e que é utilizado para crescimento e manutenção do fungo (Ait Lahmidi et al., 2016; Bravo et al., 2016; Jiang et al., 2017). Estima-se que até 22% do carbono fixado na fotossíntese pelas plantas é direcionado ao FMA como permuta da transferência de P pelo fungo. Os fungos importam ácidos graxos da planta, uma vez que são auxotróficos para estes compostos, utilizando transportadores dependentes de *RAM2* (REQUIRED FOR ARBUSCULAR MYCORRHIZATION 2) e dependente da via de exportação de lipídios vegetais mediada por transportadores de ATP (Jiang et

al., 2017). As hexoses são transportadas através de transportadores MST como o caso de RiMST5 e RiMST6 de *Rhizophagus irregularis* (Ait Lahmidi et al., 2016).

A via micorrízica de absorção de P pode ser capaz de suprir a necessidade total do elemento na planta (Chiu & Paszkowski, 2019). Desta forma, a relação entre FMA e plantas terrestres é dependente do *status* nutricional da planta e da disponibilidade de P no solo (Lambers et al., 2020). Sob alta disponibilidade de P_i pode ocorrer a inibição do estabelecimento da associação micorrízica arbuscular (Breuillin et al., 2010), da mesma forma, a alta deficiência do elemento também inibe a relação simbiótica (Abbott et al., 1984).

Os FMAs têm a capacidade de absorver o P na forma de fosfato, através das hifas do micélio extrarradicular que pode se estender além da área de depleção de P formada ao redor das raízes. Estima-se que esses fungos aumentem o potencial da raiz de exploração do solo, aumentando-o em até seis vezes (McCormack & Iversen, 2019). Uma vez absorvido o fosfato, os FMAs sintetizam cadeias de polifosfato através de proteínas VTC (vacuolar transporter chaperone) (Bhalla et al., 2021). O P é transportado na forma de polifosfato até as hifas intrarradiculares, no interior da raiz hospedeira (Smith & Read, 2008), onde é hidrolisado e o fosfato transferido às células da planta por transportadores específicos na interface simbiótica (Ezawa & Saito, 2018).

Mesmo em solos com quantidades relativamente altas de P, FMAs podem causar depleção do elemento no solo (Wei-ge et al., 2022). Além de FMA facilitar a absorção de P pelas plantas, podem regular a sua absorção, como observado em plantas de *Eucalyptus marginata* crescendo em solos com altos níveis de P, e evitando a toxicidade por P (Tibbett et al., 2021).

Hifas de FMA também possuem atividade de fosfatase ácida (Joner & Johansen, 2000) e há indícios de que hifas do FMA *R. irregularis* apresentem atividade fitase (Koide & Kabir, 2000), mas a dúvida da origem da atividade permanece uma vez que bactérias da hifosfera como *Pseudomonas alcaligenes*, associadas às hifas do fungo, possuem atividade fitase (Zhang et al., 2014). Um estudo recente de caracterização de perfis funcionais do microbioma rizosférico observou que *R. irregularis* recruta um microbioma específico na hifosfera que promove perfis funcionais relacionados à utilização de P_o, aumentando a utilização do P de fitato (Wang et al., 2023). Tem sido apontado que o *core* do microbioma da hifosfera de

FMA é taxonomicamente conservado e fornece funções relacionadas à mineralização do P_o complementando o potencial funcional de FMA (Wang et al., 2023).

Zhou et al., (2022) observaram em plantas de milho que FMA têm um papel mais relevante do que os pelos radiculares na modulação da comunidade microbiana rizosférica e aumenta a mineralização de P_o da rizosfera. As hifas de FMA podem recrutar bactérias com atividade fosfatase alcalina, fornecendo outra função que está ausente nas hifas (Zhang et al., 2018).

FMA também estão associados com a formação e estabilização da matéria orgânica do solo (Frey, 2019), uma vez que espécies de plantas que fazem associações com FMA podem alocar carbono mais facilmente à sua rizosfera através de exsudação (Frey, 2019; Jeewani et al., 2021; Kaiser et al., 2015). Sugere-se que a exsudação de compostos de baixo peso molecular por raízes e hifas micorrízicas é a rota dominante pela qual carbono atmosférico entra no solo (Kuzyakov, 2002), o que pode estimular o crescimento microbiano e maiores atividades enzimáticas relacionadas com a mineralização da matéria orgânica (Pan et al., 2023; Zheng et al., 2023).

Desta forma, além da capacidade dos FMA de mineralização de P_o e transporte de P para plantas, estes fungos exercem grande influência sobre o bioma da rizosfera, moldando-o de forma a potencializar processos associados à nutrição das plantas hospedeiras (Duan et al., 2023; Wang et al., 2023; Zhang et al., 2018; Zhou et al., 2022).

Em um estudo em sistema com diferentes compartimentos para raízes micorrizadas e para hifas extrarradiculares de FMA foi avaliado o papel do FMA *Glomus versiforme* na disponibilização de P oriundo de lecitina, RNA ou fitato para plantas de *Trifolium pratense* e observou-se que a contribuição das fontes de P_o utilizadas no P acumulado pelas plantas foi de até 31% (Feng et al., 2003). A inoculação do FMA *Funneliformis mossae* em *Camellia oleifera* resultou em maior conteúdo de P na parte aérea e raiz e maiores atividades fosfatase e fitase na raiz do que plantas não inoculadas, sugerindo que a associação potencializa as atividades de mineralização de P_o no solo.

A capacidade dos FMA em promover a mineralização de formas de P_o , pode contribuir positivamente com a nutrição da planta e sugere que a promoção da

simbiose é uma forma sustentável para produção vegetal (Suliman & Mühling, 2021). Neste sentido de sustentabilidade de sistemas de produção, a capacidade de FMAs em promover maior crescimento de plantas de tomate, *Solanum lycopersicum*, supridas com P na forma de estruvita, indica a indução da solubilização deste tipo de fertilizante fosfatado (Di Tomassi et al., 2021).

1.6. *Eucalyptus*: origem, importância comercial e ecológica

Os eucaliptos são um grupo de vegetais arbóreos da família *Myrtaceae* que compreende sete gêneros até então: *Angophora* Cav., *Allosyncarpia* S.T. Blake, *Eucalyptus* L'Hérit, *Corymbia* K.D. Hill; L.A.S Johnson, *Stockwellia* Carr, Carr & Hyland, *Eucalyptopsis* C.T. White e *Arillastrum* Pancher ex Baill. (Bayly et al. 2013). Os eucaliptos têm grande distribuição geográfica, ocupando nichos ecológicos diferentes, se estendendo desde zonas tropicais até zonas temperadas. As mais de 800 espécies descritas hoje compõem principalmente florestas, bosques e matagais de regiões da Austrália, Timor-Leste, Papua-Nova Guiné e Tasmânia (Flores et al. 2016).

Os eucaliptos são espécies arbóreas perenes, geralmente com fuste ereto e alta taxa de crescimento, podendo atingir alturas de mais de 80m. Além disso, glândulas localizadas nas folhas de várias espécies de eucaliptos produzem óleos voláteis e aromáticos mono- e sesquiterpenos com propriedades medicinais (Goodger et al. 2018). As folhas geralmente apresentam anatomia e morfologia diferentes ao longo do seu desenvolvimento de planta jovem para adulta, com folhas grossas e resistentes.

A árvore de eucalipto foi descrita em 1777 pelo botânico francês Charles Louis L'Héritier de Brutelle, no qual usou um holótipo de *Eucalyptus obliqua* para identificação (Hall 1978). O termo “*eucalyptus*” significa “bem (eu) coberto (kalypto)”, em referência aos opérculos dos botões florais do grupo (Youl 1996).

O gênero *Eucalyptus* apresenta cerca de 600 espécies, que na sua grande maioria são nativas da Austrália. O gênero foi introduzido inicialmente no Brasil com finalidades como paisagismo, formação de barreiras quebra-ventos e obtenção de óleos essenciais (Júnior & Silveira, 2021). Hoje, a cultura do gênero é de grande relevância econômica para o país por estar relacionada ao abastecimento de matéria-prima de empreendimentos industriais de base florestal, como a indústria de celulose

e papel, e a siderurgia a carvão vegetal (Resende & Alves, 2021). Segundo Alves e Resende (2021), o plantio de eucaliptos “contribui para a conservação ambiental e de espécies nativas via a minimização da pressão extrativista sobre os recursos florestais autóctones”. Os cultivos de eucaliptos, dependendo da forma de manejo - considerando os conceitos de ecologia da paisagem, como proteção de remanescentes, corredores de vegetação natural, compondo uma riqueza maior de espécies arbóreas, além da manutenção da matéria orgânica e da porosidade do solo - representam serviços ecossistêmicos como: produção de fibras; prevenção de erosão; manutenção da fertilidade do solo; recursos genéticos; manejo de pragas e doenças; ciclagem de nutrientes e conservação da biodiversidade (Vargas et al., 2021).

Em solos com alta disponibilidade de P folhas de espécies de *Eucalyptus* apresentam altas concentrações de ácido fítico a fim de manter o equilíbrio celular de P (McQuillan, 2020). Com a queda da folha ao solo o fitato armazenado nas folhas representa uma fonte potencial de P_o (Watson et al., 2019), o que sugere que solos de florestas de *Eucalyptus* possam estar enriquecidas em P_o e com microrganismos capazes de mineralizar esta forma de P (Waithaisong et al., 2020).

Espécies de *Eucalyptus* apresentam teores adequados de P nas folhas entre 0,9 e 1,3 g kg⁻¹, e, no geral, apresentam sintomas de deficiência abaixo desta faixa e de toxicidade de P quando acima destas concentrações (Raij et al., 1996).

Recentemente alguns trabalhos acerca da relação entre plantas jovens de eucaliptos e nutrição de P têm sido publicados pelo nosso grupo de pesquisa (Bulgarelli et al., 2019; Bichara et al., 2021). Bulgarelli et al., (2019), por exemplo, avaliaram um total de 24 espécies de eucaliptos e suas capacidades em crescer sob baixa disponibilidade de P, ilustrando a diversidade de respostas à baixa disponibilidade de P dentro deste grupo de espécies. Bichara et al., (2021) avaliaram as mudanças morfológicas de raízes de cinco espécies eucaliptos sob baixa disponibilidade de P, concluindo que o comprimento e densidade de pelos radiculares são a resposta mais comum à baixa concentração de P. Andrade et al., (2022) observaram que a baixa disponibilidade de P aumenta a exsudação radicular em espécies de eucalipto. Além disso, de Oliveira et al., (2022) puderam concluir que a inoculação do FMA *R. irregularis* em plantas de *E. grandis* reduziu o estresse das plantas causado pelo baixo P.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade de duas espécies de eucalipto, *E. grandis* e *E. globulus*, em utilizar fontes orgânicas de P a partir de diferentes fontes de P isoladas, assim como avaliar a contribuição da associação de eucalipto com FMAs na utilização de P a partir destas diferentes fontes de P.

3. Hipóteses

- A presença da micorriza arbuscular influencia positivamente a utilização de P_o alterando a absorção e acúmulo de P e modificando a atividade enzimática das raízes;
- Espécies de eucaliptos diferem na sua capacidade de utilizar fontes de P_o , e isto está associado com a atividade das enzimas secretadas na sua rizosfera e de sua interação com FMA;
- A espécie com maior eficiência na capacidade de utilizar P de fontes de P_o é menos dependente da disponibilidade de P_i no meio.

4. Materiais e Métodos

4.1. Instalação e condução do experimento

Neste trabalho utilizamos as espécies *E. grandis* e *E. globulus*, por serem espécies de relevante interesse comercial e por apresentarem respostas diferentes à baixa disponibilidade de P no solo (Bulgarelli et al., 2019). *E. grandis* tem seu genoma completamente sequenciado, possibilitando uma fonte de informação genética (Myburg, 2014). Além disso, ambas as espécies são capazes de estabelecer associações micorrízicas e crescem em ambientes naturais com presença de diversas formas de P, o que viabiliza a avaliação proposta neste trabalho. A espécie de FMA utilizada foi *Rhizophagus intraradices*, espécie disponível como inoculante comercial aprovado atualmente pela ANVISA no Brasil (NovaTero, 2019).

Foram realizados concomitantemente dois experimentos com delineamento totalmente ao acaso, e em esquema fatorial 7×2 , com dez repetições, totalizando 140 parcelas experimentais cada um. O experimento 1, teve como planta estudo *Eucalyptus globulus* (Gl) e o experimento 2 plantas de *E. grandis* (Gr). Os fatores em estudo foram: 7 fontes de P: glucose-6-fosfato (G); fitato (F); RNA de levedura torula (R); ATP (A); necromassa de *Pseudomonas putida* (N); fosfato de potássio (C) e fosfato de ferro III (Fe) e a inoculação (M) ou não (NM) do FMA *Rhizophagus intraradices*.

Para obtenção das plântulas foram preparadas sementeiras utilizando areia autoclavada como substrato. As sementes de *E. globulus* e *E. grandis* foram desinfetadas superficialmente com etanol 70% por 30 s, lavadas com água estéril, imersas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 10 min e lavadas novamente com água estéril, para posterior semeadura. O substrato das sementeiras foi areia grossa (granulometria de entre 0,5 e 1 mm), a qual foi analisada quimicamente quanto ao teor de P disponível, extraído com resina de troca iônica, e contendo 2 mg dm^{-3} de P. Por ocasião da semeadura foi adicionado o inóculo de FMA, utilizando em torno de 100 mg de inóculo comercial de *Rhizophagus intraradices* nos tratamentos M.

Uma semana antes do transplante foram coletadas plantas das duas espécies dos tratamentos com e sem inoculação do FMA para verificar a colonização micorrízica, que se mostrou presente nos tratamentos inoculados com o fungo. O transplante das plântulas para tubetes de 100 mL com o mesmo substrato das sementeiras ocorreu quatro semanas após a germinação das plântulas, com uma plântula por tubete.

As plântulas foram cultivadas em condições de casa de vegetação, com condições naturais de luz e temperatura. A irrigação foi realizada de forma manual e diariamente com o auxílio de seringas de 10 mL de capacidade. Foram adicionados a cada semana em torno de 15 mL das soluções $0,1 \text{ mM L}^{-1}$ de fontes de P. Uma vez na semana foi adicionada solução de Hoagland meia-força (Hoagland & Arnon, 1938) e sem fonte de P. Durante a irrigação tomou-se o cuidado de evitar a percolação de solução. Durante o período de experimentação o volume das soluções das fontes de P adicionadas a cada planta foram anotados, totalizando 166 mL de solução e um total de 0,514 mg de P adicionado com cada fonte durante o período do experimento.

Após 12 semanas do início do tratamento com as fontes de P, as plântulas foram coletadas em duas semanas subsequentes, cada semana com dois dias de coleta consecutivos, totalizando 5 repetições de cada tratamento por semana. Na primeira semana de coleta, foram coletadas as plantas que foram usadas para coleta dos exsudatos radiculares. Na segunda semana de coleta, as outras 5 repetições de cada tratamento foram coletadas para a determinação imediata de atividade enzimática radicular. Para isto as raízes foram lavadas e alíquotas de aproximadamente 100 mg foram retiradas, colocadas no gelo e utilizadas imediatamente na avaliação das atividades da fitase e da fosfatase. A parte aérea dessas plantas foi separada da raiz, guardada em sacos de papel e seca em estufa a 60 °C. O volume total de substrato de cada tubete foi guardado em sacos plásticos e armazenado em câmara fria a 4 °C para extração do micélio externo do FMA. O restante das raízes foi guardado em sacos de papel e posto para secar em estufa para posterior pesagem.

4.2. Obtenção de necromassa bacteriana

Para obtenção de necromassa bacteriana foram utilizadas culturas de *Pseudomonas putida*, a qual foi utilizada posteriormente como fonte de P_o no experimento deste estudo. Para isto foi utilizado um isolado de *Pseudomonas putida* originalmente obtido da rizosfera de milho e identificado como IAC-RBmi1 (número de acesso KJ590507) e gentilmente cedido pela Dra. Adriana Parada Dias da Silveira, do Instituto Agrônomo (IAC), em Campinas, São Paulo. O isolado foi crescido em meio líquido Luria Bertani (LB). Ao todo, foram preparados 15 L de meio de cultura LB, contendo 10 g de caseína peptona, 5 g de extrato de levedura, e 10 g de NaCl, por litro de água destilada, e com pH ajustado a 7,0. 150 mL do meio de cultura foram distribuídos em frascos erlenmeyer de 250 mL de capacidade e autoclavados a 120 °C e 1 atm por 25 min. A inoculação do isolado foi realizada em câmara de fluxo mantendo os protocolos de assepsia. Os frascos contendo o inóculo de *P. putida* foram transferidos para incubadora de crescimento a 37 °C, com agitação de 60 rpm e mantida por 14 dias.

Para separação da biomassa bacteriana produzida, o volume dos frascos foi transferido a tubos de centrífuga e centrifugado por 6 min a 10.000 rpm. O sobrenadante dos tubos foi descartado e o pellet, biomassa bacteriana, ressuspenso

em água destilada estéril com auxílio de vórtex. Este processo de lavagem foi repetido cinco vezes. Os tubos com os pellets lavados foram transferidos para estufa a 60 °C, onde permaneceram por 2 dias até a completa secagem da massa microbiana. O pellet seco foi macerado a pó fino com o auxílio de N₂ líquido e homogeneizado. Uma subamostra da necromassa bacteriana foi enviada para análise elementar (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração elementar da necromassa de *Pseudomonas putida*.

Elemento	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Na	Zn	Mn
	g kg ⁻¹						mg kg ⁻¹				
	104,4	16,0	3,11	3,70	1,51	3,0	14	172	7400	198	14

4.3. Preparo das soluções de fontes de P

Para preparação das soluções com as diferentes fontes de P foram utilizados reagentes de grau Sigma: fitato Sigma-Aldrich P8810, fosfato de ferro III Sigma-Aldrich 436011, RNA de *Torula* Sigma-Aldrich R6625 e glucose-6-phosphate Sigma-Aldrich 10127647001. Foram feitas soluções-estoque de 1 mM L⁻¹ de P para posteriormente serem diluídas para soluções de trabalho de 0,1 mM L⁻¹ de P, a concentração definida para fornecimento às plantas. No caso do fosfato de ferro III, que é insolúvel, foi calculada a quantidade correspondente de P que seria adicionada cumulativamente até o final do experimento fornecendo uma solução de 0,1 mM L⁻¹ de P, considerando um volume total de 150 mL até o fim do experimento, de 12 semanas de duração. A massa correspondente do reagente foi homogeneizada com a areia dos tubetes antes do transplante das mudas. Todas as soluções-estoque foram armazenadas em geladeira. Utilizamos a concentração de P a 0,1 mM L⁻¹, pois é uma concentração que não inibe a colonização por FMAs e alguns trabalhos sob condições semelhantes utilizaram esta faixa de concentração (Steidinger et al., 2015; Hayes et al., 2000).

4.4. Determinação da produção de biomassa de parte aérea e raiz

Após secagem, a parte aérea de 10 e a raiz de 5 repetições (plantas) por tratamento foram pesadas em balança analítica.

4.5. Análise dos parâmetros morfológicos da raiz

O sistema radicular das mesmas cinco plantas de cada tratamento que foram utilizadas para coleta de exsudatos radiculares, foi utilizado para determinação dos parâmetros morfológicos da raiz. As raízes foram escaneadas com resolução de 600 dpi em escaner (Epson Expression 12000XL) e as imagens digitalizadas foram analisadas com o software *WinRhizo* (Regent Instruments Inc.). O comprimento total, a área superficial e o diâmetro médio ponderado das raízes foram determinados.

4.6. Avaliação de pigmentos das folhas

Dois dias antes da coleta, os índices de clorofilas, antocianinas e flavonóis foram medidos com um sensor portátil Dualex Scientific+™ (ForceA, França), usando o lado adaxial das folhas totalmente expandidas (folhas maduras) e o terceiro par de folhas sob o ápice (folhas jovens). O índice de balanço de nitrogênio (NBI) é fornecido pelo equipamento como a razão entre os índices de clorofila e flavonóis.

4.7. Avaliação da colonização micorrízica

Para avaliação de colonização da raiz pelo FMA, as raízes foram previamente diafanizadas com KOH 10%, e posteriormente coloridas com solução 5% de tinta de caneta (Pelikan preto) em vinagre (Vierheilig *et al.*, 1998) para posterior avaliação de colonização micorrízica pelo método de Trouvelot *et al.* (1985). Foram avaliados, sob microscópio óptico com aumento de 10x a 40x, 30 fragmentos de raiz de aproximadamente 1 cm em 5 plantas de cada tratamento.

4.8. Quantificação do comprimento do micélio externo

Para determinar a extensão do micélio externo de FMA foi utilizado o método descrito por Melloni & Cardoso (1999), onde foram peneirados através de peneiramento úmido 30 mL de substrato dos tubetes em peneiras de 250 µm, utilizando 1500 mL de água destilada e jarra de liquidificador de 2 L de capacidade. Após o peneiramento a solução foi agitada na menor velocidade do liquidificador por

30 s e deixada em repouso por 2 min. Após este tempo, 500 mL da solução foi peneirada em malha de 44 µm, onde o retido na malha foi transferido com 11 mL de água destilada para tubo Falcon de 15 mL de capacidade. 5 mL da solução final foi filtrada à vácuo em membrana de nitrocelulose quadriculada com 64 campos (8x8) previamente delimitados, o micélio foi corado com tripan blue 0,05%, e observado em microscópio com ocular reticulada em aumento de 10x, contando as intersecções das hifas com as linhas do reticulado da ocular nos 64 campos previamente delimitados. O número de intersecções foi multiplicado pelo fator 0,021387 (Melloni & Cardoso, 1999) e dividido pelos 30 mL correspondente à quantidade de substrato utilizado, a extensão do micélio externo foi expressa em m mL⁻¹ substrato.

4.9. Determinação da concentração de P na parte aérea

A parte aérea seca foi moída em moinho de bancada e 30 mg foram utilizados para determinação do P total de acordo com o método descrito em Thirkell et al., (2020). Após a digestão do tecido vegetal com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio 35% (v/v), no digerido foi determinada a concentração de P pelo método colorimétrico do azul de molibdato (Murphy & Riley, 1962), a absorbância da reação lida a 882 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas (modelo SpectraMax M Series). Para a curva padrão foram utilizadas concentrações de 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10 e 15 ppm de P L⁻¹. A concentração de P foi expressa em g kg⁻¹. O conteúdo de P acumulado foi calculado multiplicando a concentração pela quantidade de biomassa de parte aérea produzida por cada planta e expresso em mg planta⁻¹.

A eficiência de uso de P (PUE, g MS g⁻¹ P) foi calculada utilizando a seguinte equação (Siddiqi & Glass, 1981):

$$PUE = \frac{MS^2}{[P]}$$

A eficiência de absorção de P (PU_pE, g P_{Parte aérea} g⁻¹ P_{Substrato}) foi calculada utilizando a seguinte equação (Gerloff, 1977):

$$PU_pE = \frac{[P] \times MS}{P_{disp}}$$

Onde *MS* indica a massa seca total das plantas, *[P]* a concentração de P na parte aérea e *P_{disp}* o P disponível no substrato e foi considerado como a

quantidade de P adicionada até o fim do experimento, ou seja, 0,514 mg de P, e que foi a mesma para todas as fontes de P utilizadas.

4.10. Determinação do conteúdo de N das plantas

Foram pesados 50 mg de massa seca moída da parte aérea das plantas que foram digeridas por 48 h com NaOH 0,1 M. Depois do digerido centrifugado, 10 μ L do sobrenadante foi diluído 10 vezes e a proteína total quantificada diretamente por método de Bradford (1976) e a proteína foi convertida a conteúdo de N pelo fator de conversão 6,25.

4.11. Avaliação da atividade fitase extracelular nas raízes

Imediatamente após a coleta foram realizados os ensaios enzimáticos nas raízes. Aproximadamente 100 mg de raízes frescas foram acondicionados em eppendorfs de 1,5 mL e adicionados 500 μ L de tampão 15 mM MES/Ca com 2 mM de ácido fítico (mio-inositol hexakisfosfato) como substrato da reação. As raízes foram então incubadas a 37 °C por 3 h em termobloco *Eppendorf ThermoMixer C*. Após a incubação, a reação foi parada com 500 μ L de TCA 10% gelado.

Para quantificar a liberação de ortofosfato originado da hidrólise do ácido fítico foi seguido o método descrito (Asmar, 1997; Liu et al., 2018; Richardson et al., 2000), no qual 100 μ L do tampão anteriormente incubado foi incubado novamente por 15 min a 50 °C em 900 μ L de solução de azul de molibdato (Murphy & Riley, 1962). Após a reação 250 μ L da solução foram pipetados em placa de 96 poços e a absorbância lida a 820 nm em leitor de microplacas *EspectraMax M Series*. Para a curva padrão foram utilizadas concentrações de 0, 5, 10, 20, 30 e 40 μ g L⁻¹ de P.

As alíquotas de raízes utilizadas para determinação da atividade fitase foram recuperadas do meio de reação e escaneadas. As imagens digitalizadas foram analisadas no software *WinRhizo* para obtenção da área superficial de raiz, a qual foi utilizada para o cálculo da atividade fitase que foi expressa em ng Pi cm² min⁻¹.

4.12. Avaliação da atividade fosfatase secretada nas raízes (rAPase)

A determinação da atividade fosfatase ácida secretada foi realizada no dia da coleta das plantas através do método fluorométrico descrito por German et al.

(2011) e Lugli et al. (2020), onde 10 mg de raízes foram incubadas em 1 mL de tampão Na-acetato 100 mM e 0,25 mL de solução de fosfato de 4-metilumbeliferona (MUF-P) 2 mM por 30 min a 25 °C em termobloco *Eppendorf ThermoMixer C*. Após a incubação a reação foi parada com 50 µL solução de NaOH 1 M. Logo depois 250 µL da solução de reação foi pipetada em placa de 96 poços preta (*Greiner Black*) e a fluorescência gerada pela reação lida a 360 nm excitação e 460 nm de emissão em leitor de microplacas *EspectraMax M Series*. Para a curva padrão foram utilizadas concentrações de 1000, 750, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 µM de 4-metilumbeliferona (MUF).

As alíquotas de raízes utilizadas para determinação da atividade fosfatase extracelular foram recuperadas do meio de reação e escaneadas. As imagens digitalizadas foram analisadas no software *WinRhizo* para obtenção da área superficial de raiz. A atividade fosfatase ácida foi expressa em nmol de MUF cm⁻² h⁻¹.

4.13. Avaliação da atividade fosfatase do micélio externo (mAPase)

A determinação da atividade fosfatase ácida do micélio externo do FMA foi realizada conforme descrito por Deng et. al. (2013) e Dick et al. (2013) para solo, com algumas modificações. O micélio externo foi extraído por peneiramento úmido dos 50 mL de substrato de cada tubete, utilizando peneiras de 250 e 42 µm de abertura de malha, o micélio foi recolhido com água destilada em um volume de 5 mL.

No escuro, diretamente em placa de 96 poços (*Greiner Black*) foram pipetados com pipeta multicanal 50 µL de solução tampão universal modificado (MUB) aquecida a 37 °C em todos os poços a serem ocupados na placa. Posteriormente foram adicionados a cada poço 100 µL de suspensão do micélio recém agitada e aquecida a 37 °C, por último, adicionou-se 50 µL de MUF-P 2 mM logo antes da incubação a 37 °C por 1 h em termobloco *Eppendorf ThermoMixer C*. A reação foi parada com 50 µL de THAM 0,1 M pH 10.

Para a curva padrão foi utilizado 50 µL de MUB, 100 µL da suspensão de micélio recém agitada e concentrações de 0, 5, 10, 20, 30 e 50 µM de MUF para verificar concentrações de MUF liberadas pela reação de cada tratamento específico. Por último, a fluorescência gerada pela reação foi lida a 360 nm de excitação e 460 nm de emissão em leitor de microplacas *EspectraMax M Series*. A atividade fosfatase ácida do micélio externo foi expressa em nmol de MUF g⁻¹ h⁻¹.

4.14. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise da variância (two-way ANOVA) para avaliar o efeito das fontes de P (Fonte P), da inoculação do FMA (FMA) e da sua interação (Fonte P * FMA), para cada uma das espécies separadamente. Quando a interação (Fonte P * FMA) foi significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as variáveis relacionadas com a colonização extra- e intrarradicular do FMA foi realizada análise da variância (ANOVA), para cada uma das espécies separadamente, para avaliar o efeito das fontes de P. Para avaliar se as variáveis analisadas diferiram em resposta a espécie de eucalipto os dados dos experimentos 1 e 2 foram considerados de forma conjunta e utilizado o teste F, usando o software Sisvar (Ferreira et al., 2011). Foi realizada análise multivariada dos dados através da análise de correlação de Pearson e a análise de componentes principais (PCA) usando os softwares RStudio e Minitab® 17, respectivamente.

5. Resultados

5.1. Produção de biomassa da parte aérea e raiz

Avaliando o efeito das fontes de P e da inoculação do FMA no acúmulo de biomassa da parte aérea, observa-se que houve interação significativa entre a inoculação de FMA e as fontes de P apenas em *E. grandis* (Tabelas 2 e 3).

Em *E. globulus* houve efeito significativo da fonte de P (Tabela 2), com significativamente maior produção de biomassa da parte aérea quando as plantas receberam fosfato de potássio ou necromassa bacteriana como única fonte de P, condições nas quais as plantas acumularam 0,34 g e 0,39 g de biomassa da parte aérea, respectivamente; enquanto a menor produção de biomassa de parte aérea ocorreu quando as plantas receberam fitato como única fonte de P, acumulando em média 0,22 g por planta (Figura 2.a).

Em *E. grandis* as plântulas, tanto M como NM, irrigadas com fosfato de potássio, RNA, ATP, necromassa e glucose-6-P apresentaram maior crescimento da parte aérea do que as irrigadas com fosfato de ferro e fitato (Figura 2.b). As plantas que receberam fitato como única fonte de P foram as que tiveram a menor produção

de biomassa da parte aérea (Figura 2.b). Plântulas de *E. grandis* NM que receberam necromassa bacteriana ou fosfato de ferro como única fonte de P apresentaram 38% e 238% maior produção de biomassa da parte aérea do que as homólogas M, respectivamente (Figura 2.b).

No geral, as plântulas de *E. globulus* apresentaram 64% maior produção de biomassa da parte aérea do que plântulas de *E. grandis* ($F=116$, $P<0,001$), com média 0,32 g de biomassa de parte aérea em *E. globulus*, e de 0,19 g em plantas de *E. grandis*.

Tabela 2. Análise de variância, two-way ANOVA, dos parâmetros medidos em plantas de *Eucalyptus globulus* que receberam sete diferentes fontes de P (Fonte P) como única fonte do nutriente e com (M) ou sem inoculação (NM) do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Rhizophagus intraradices*.

Variável	FMA	Fonte P	Fonte P * FMA
MSPA (g)	0,9183	< 0,001	0,3187
MSR (g)	0,9020	< 0,001	0,2328
Comprimento raiz (cm)	0,2471	0,6829	0,5331
Área superficial raiz (cm ²)	0,6769	0,5398	0,5518
Diâmetro raiz (mm)	< 0,04	0,3909	0,9498
Conteúdo de P (mg/planta)	< 0,02	< 0,001	0,5288
Concentração de P (g/kg)	< 0,02	< 0,001	0,3603
NBI	0,2406	0,1442	0,3784
Clorofilas	0,1890	0,1312	0,2783
Antocianinas	0,3815	< 0,001	0,0972
Flavonóis	0,8448	0,2154	0,4049
Fitase (ng Pi/cm ² /min)	< 0,05	0,1515	< 0,01
Fosfatase (nmol/cm ² /h)	0,2040	< 0,001	0,1108
Fosfatase do micélio (nmol MUF/g/h)	< 0,001	< 0,001	< 0,001
PUE (g MS g ⁻² [P] _{Parte aérea})	0,5545	< 0,001	0,3277
PUpE (g P _{Parte aérea} g ⁻¹ P _{Substrato})	< 0,02	< 0,001	0,5288
Conteúdo de N (µg ⁻¹ g MS ⁻¹)	< 0,001	< 0,05	0,1070

Abreviações: MSPA: massa seca da parte aérea; MSR: massa seca radicular; NBI: nitrogen balance index, PUE: eficiência de uso de P, PUpE: eficiência de absorção de P.

Tabela 3. Análise de variância, two-way ANOVA, dos parâmetros medidos em plantas de *Eucalyptus grandis* que receberam sete diferentes fontes de P (Fonte P) como única fonte do nutriente e com (M) ou sem inoculação (NM) do fungo micorrízico arbuscular (FMA) (*Rhizophagus intraradices*).

Variável	FMA	Fonte P	Fonte P * FMA
MSPA (g)	< 0,03	< 0,001	< 0,01
MSR (g)	< 0,02	< 0,001	0,2010
Comprimento raiz (cm)	0,5429	< 0,001	< 0,001
Área superficial raiz (cm ²)	0,1201	< 0,001	< 0,001
Diâmetro raiz (mm)	< 0,01	< 0,02	0,4564
Conteúdo de P (mg/planta)	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Concentração de P (g/kg)	< 0,002	< 0,001	0,9557
NBI	0,6833	< 0,002	0,2757
Clorofilas	0,0968	< 0,001	0,2399
Antocianinas	< 0,001	0,6148	0,5412
Flavonóis	< 0,01	0,3832	< 0,02
Fitase (ng P _i /cm ² /min)	0,0615	0,4332	0,3659
Fosfatase (nmol/cm ² /h)	0,2271	< 0,001	0,5609
Fosfatase do micélio (nmol MUF/g/h)	< 0,001	< 0,001	< 0,001
PUE g MS g ⁻² [P] _{Parte aérea}	0,5023	< 0,001	0,2691
PUpE (g P _{Parte aérea} g ⁻¹ P _{Substrato})	0,2458	< 0,001	< 0,001
Conteúdo de N (µg ⁻¹ g MS ⁻¹)	< 0,001	< 0,02	0,1671

Abreviações: MSPA: massa seca da parte aérea; MSR: massa seca radicular; NBI: nitrogen balance index, PUE: eficiência de uso de P, PUpE: eficiência de absorção de P.

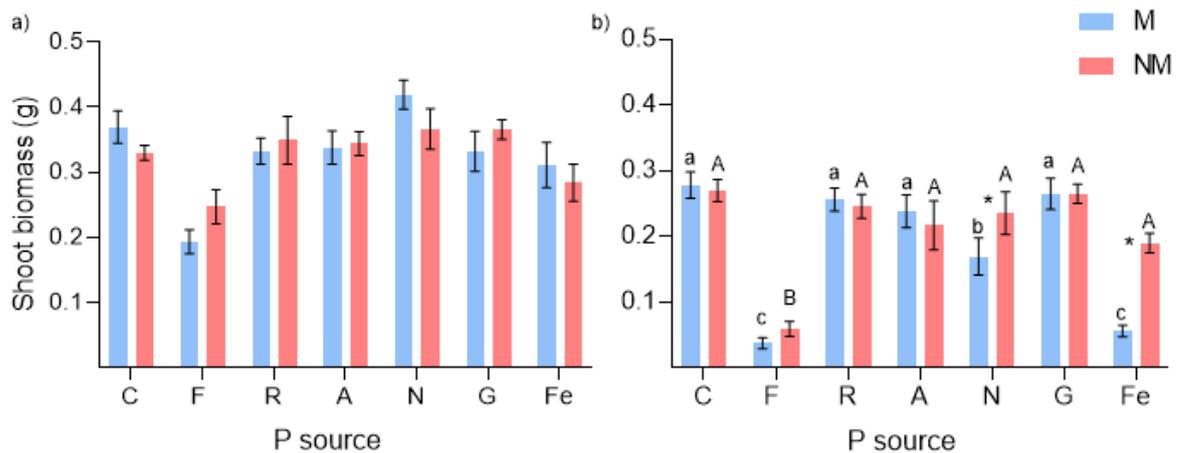


Figura 2. Produção de biomassa na parte aérea em plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b) que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA. Em b) o asterisco indica diferença significativa entre plantas M e NM, dentro de uma mesma fonte de P pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as fontes de P dentro da mesma espécie, em plantas M (minúsculas) e NM (maiúsculas) pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

Analisando o efeito das fontes de P e da inoculação do FMA na produção de biomassa radicular observamos que não houve interação significativa entre a inoculação do FMA e as fontes de P em nenhuma das espécies (Tabelas 2 e 3).

Observamos que em plântulas de *E. globulus* houve efeito significativo da fonte de P (Tabela 2). Plantas de *E. globulus* que receberam necromassa microbiana apresentaram maior produção de biomassa radicular, com média 0,14 g, enquanto plantas que receberam fitato apresentaram os menores valores de biomassa radicular, com média de 0,07 g (Figura 3.a). No geral, plantas de *E. globulus* M e NM apresentaram produção de biomassa de raiz similar (Tabela 2, Figura 3.a).

Para *E. grandis* houve efeito significativo do fator FMA e do fator Fonte P na produção de biomassa de raiz (Tabela 3). Plantas NM de *E. grandis* produziram 12% mais biomassa radicular do que plantas M, com em média 0,09 g e 0,08 g, respectivamente (Figura 3.b). Em relação às fontes de P e independentemente da inoculação, as plantas que receberam fosfato de potássio foram as que produziram maior biomassa radicular (0,14 g), enquanto as plântulas irrigadas com fitato foram as que produziram menor biomassa radicular (0,02 g) (Figura 3.b).

No geral, as plântulas de *E. globulus* apresentaram 27% maior produção de biomassa radicular do que plântulas de *E. grandis* ($F=13,38$, $P < 0,001$), com média

de 0,11 g de massa da matéria seca radicular, enquanto plântulas de *E. grandis* tiveram em média de 0,09 g.

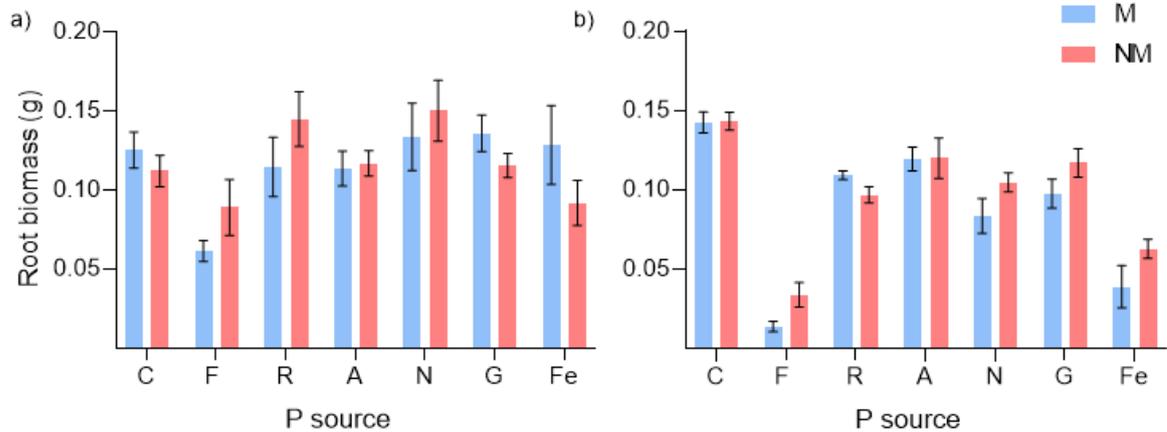


Figura 3. Produção de biomassa radicular em plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b) que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) e b) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA.

5.2. Características morfológicas do sistema radicular

O comprimento total da raiz teve efeito significativo da interação entre a inoculação de FMA e as fontes de P apenas em *E. grandis* (Tabelas 2 e 3).

Para *E. globulus* os fatores em estudo (inoculação de FMA e fontes de P) não influenciaram significativamente o comprimento radicular (Tabela 2, Figura 4.a).

Plantas M de *E. grandis* que receberam fitato, fosfato de ferro e necromassa bacteriana tiveram menores comprimentos radiculares que plantas que as receberam as demais fontes de P; já plantas NM tiveram maiores comprimentos radiculares quando receberam fosfato de potássio e glucose-6-fosfato, enquanto as que receberam fitato tiveram menor comprimento radicular (Figura 4.b). As plantas NM de *E. grandis* que receberam fosfato de ferro como única fonte de P apresentaram 192% maior comprimento de raiz do que plantas M, já quando receberam ATP as raízes M apresentaram 93% maior comprimento do que as NM (Figura 4.b).

No geral, as plântulas de *E. globulus* tiveram 26% maior comprimento radicular do que plantas de *E. grandis* ($F=10,49$, $P<0,01$) com média de 1299 cm, enquanto raízes de *E. grandis* apresentaram em média 1029 cm.

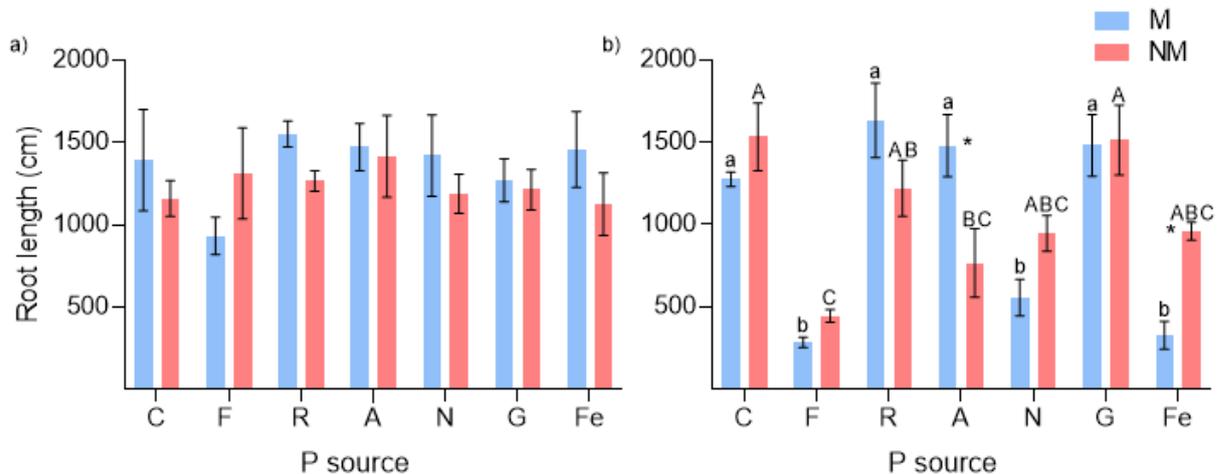


Figura 4. Comprimento radicular de plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b) que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA. Em b) o asterisco indica diferença significativa entre plantas M e NM, dentro de uma mesma fonte de P pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as fontes de P dentro da mesma espécie, em plantas M (minúsculas) e NM (maiúsculas) pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

A área superficial radicular das plantas teve efeito significativo da interação entre a inoculação de FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) somente em *E. grandis* (Tabelas 2 e 3). A área superficial de raiz em plântulas de *E. globulus* não apresentou diferenças significativas em função das fontes de P ou da inoculação de FMA (Tabela 2).

Em *E. grandis*, plântulas que receberam fitato tiveram menor área superficial radicular do que as que receberam as outras fontes de P (Figura 5.b). As raízes de plântulas NM que receberam necromassa bacteriana e fosfato de ferro tiveram 81% e 257% maior área superficial que raízes de plântulas M, respectivamente. Já as plântulas M irrigadas com ATP tiveram 66% maior área superficial de raiz do que as NM (Figura 5.b).

No geral, as plântulas de *E. globulus* apresentaram 35% maior área superficial radicular do que plântulas de *E. grandis* ($F=18,79$, $P<0,001$), com em média 99 cm^2 enquanto as raízes de *E. grandis* apresentaram em média 73 cm^2 .

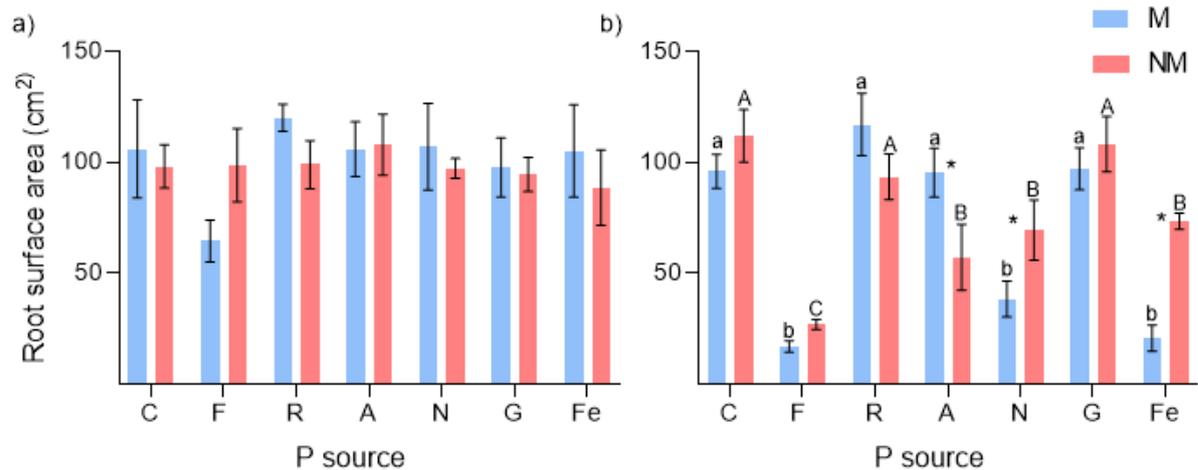


Figura 5. Área superficial radicular de plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b) que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA. Em b) o asterisco indica diferença significativa entre plantas M e NM, dentro de uma mesma fonte de P pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as fontes de P dentro da mesma espécie, em plantas M (minúsculas) e NM (maiúsculas) pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

O diâmetro médio ponderado das raízes não teve efeito da interação entre os fatores estudados (FMA * Fonte P) em nenhuma das espécies (Tabela 2 e 3). Em *E. globulus*, apenas a inoculação do FMA teve efeito significativo no diâmetro da raiz (Tabela 2), onde plantas NM apresentaram 9% maior diâmetro radicular que plantas M, onde raízes de plantas NM tiveram em média diâmetro de 0,25 mm e as M de 0,23 mm (Figura 6.a).

Em *E. grandis* tanto a inoculação de FMA quanto a fonte de P tiveram efeito significativo no diâmetro médio ponderado das raízes (Tabela 3). Plantas que receberam fitato como única fonte de P apresentaram 22% menor diâmetro radicular que plantas que receberam outras fontes de P, onde raízes de plantas supridas com fitato tiveram em média de 0,18 mm de diâmetro radicular, e as que receberam as outras fontes de P apresentaram em média de 0,23 mm. Já raízes NM de *E. grandis* tiveram 9% maior diâmetro do que as raízes M, sendo que raízes de plantas M e NM tiveram em média de 0,21 e 0,23 mm de diâmetro, respectivamente.

No geral, plântulas de *E. globulus* apresentaram 9% maior diâmetro radicular que plantas de *E. grandis* ($F=18,61$, $P<0,001$), com média de 0,24 e 0,22 mm de diâmetro em *E. globulus* e *E. grandis*, respectivamente. Da mesma forma, plantas

NM tiveram 9% maior diâmetro radicular do que plantas M ($F=10,99$, $P<0,01$) com em média de 0,24 e 0,22 mm em raízes NM e M, respectivamente.

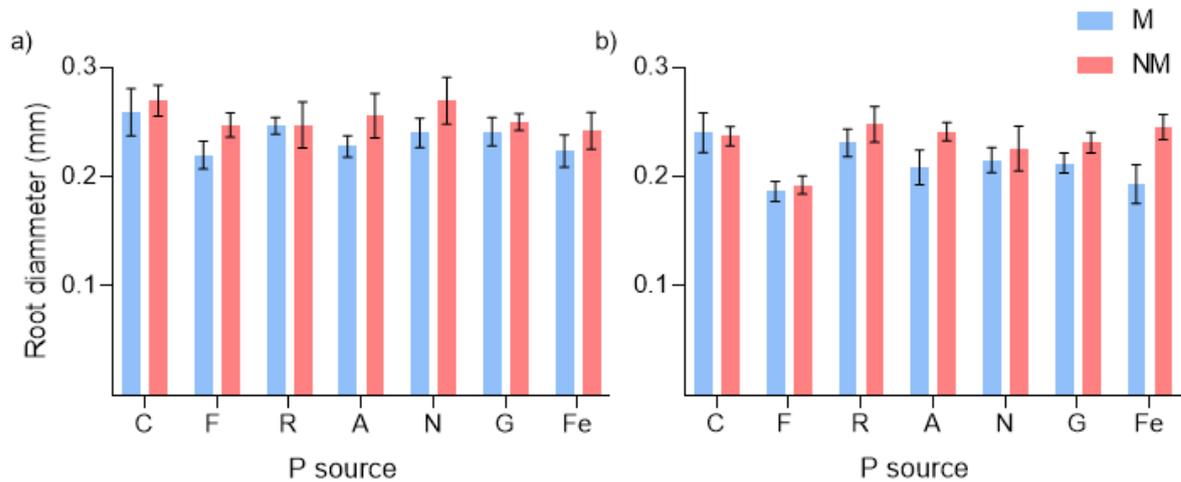


Figura 6. Diâmetro radicular de plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b) que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) e b) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA.

5.3. Conteúdo de pigmentos foliares e índice de balanço de nitrogênio (NBI)

Considerando o efeito da inoculação e das fontes de P no índice de clorofila foliar observa-se que não houve interação significativa entre a inoculação de FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) em nenhuma das espécies (Tabelas 2 e 3).

O índice de clorofila de folhas de *E. globulus* não apresentou efeito significativo das fontes de P, nem da inoculação do FMA (Tabela 2).

Plântulas de *E. grandis* apresentaram efeito significativo das fontes de P no índice de clorofilas (Tabela 3). Independentemente da inoculação com o FMA, as plântulas de *E. grandis* que receberam necromassa microbiana como única fonte de P tiveram 25% maior índice de clorofila foliar que plantas que receberam fosfato de potássio, apresentando valores médios de 21 de índice de clorofila quando supridas com necromassa microbiana, enquanto as que receberam fosfato de potássio tiveram os menores índices de clorofila, com média de 14 (Figura 7.b).

No geral, folhas de plântulas de *E. globulus* tiveram 17% maior índice de clorofila que folhas de plantas de *E. grandis* ($F=26,42$, $P<0,001$), com uma média de 20 de índice de clorofila, enquanto folhas de *E. grandis* apresentaram em média 17.

Da mesma forma, plântulas NM tiveram 6% maior índice de clorofila foliar que plantas M ($F=4,02$, $P<0,05$), onde plântulas NM tiveram média de 19 e plantas M tiveram média de 18.

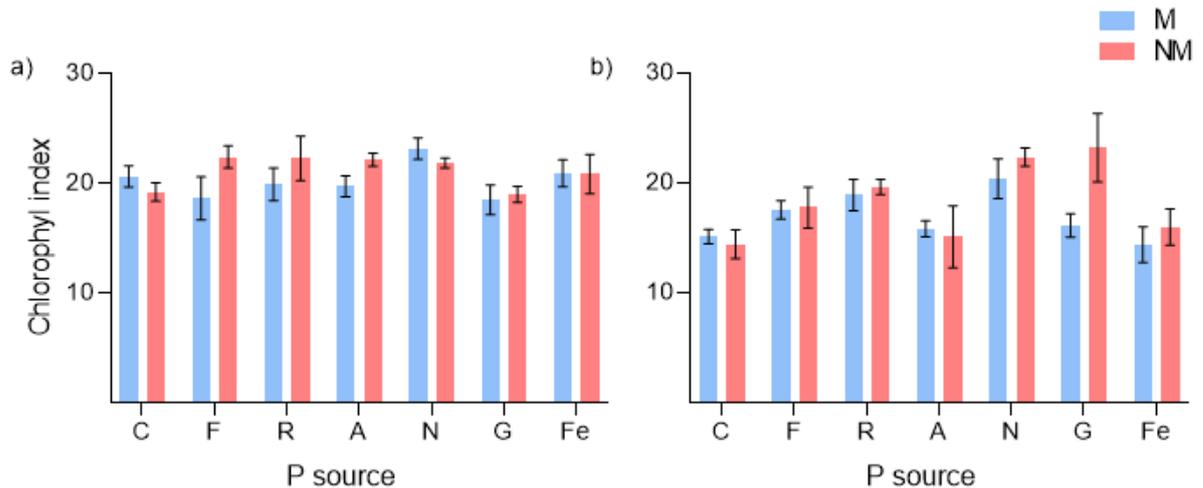


Figura 7. Índice de clorofila em folhas de plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b), que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) e b) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA.

No índice de antocianinas, não houve interação significativa entre a inoculação de FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) em nenhuma das espécies (Tabelas 2 e 3).

Em plantas de *E. globulus* houve efeito significativo das fontes de P no índice de antocianinas foliares (Tabela 2). Plantas de *E. globulus* que receberam RNA apresentaram maior índice de antocianinas nas folhas, com média de 0,25 enquanto plantas que receberam ATP tiveram os menores índices de antocianinas com média de 0,19 (Figura 8.a).

Em plântulas de *E. grandis* o índice de antocianina foliar teve efeito significativo da inoculação do FMA (Tabela 3), onde folhas de plântulas NM apresentaram 20% maior índice de antocianina foliar do que folhas de plantas M, com plântulas NM apresentando índices de antocianina de em média 0,42, enquanto em plântulas M a média foi de 0,35 (Figura 8.b).

No geral, as folhas de *E. grandis* tiveram 76% maior índice de antocianinas que folhas de *E. globulus* ($F=253$, $P<0,001$), folhas de *E. grandis* tiveram um índice de em média 0,39 enquanto folhas de *E. globulus* apresentaram em média 0,22. No

geral, as plantas NM tiveram 10% maior índice de antocianinas em relação às plantas M ($F=8,84$, $P<0,01$) com um índice de 0,32, enquanto plantas M apresentaram um índice de 0,29, em média.

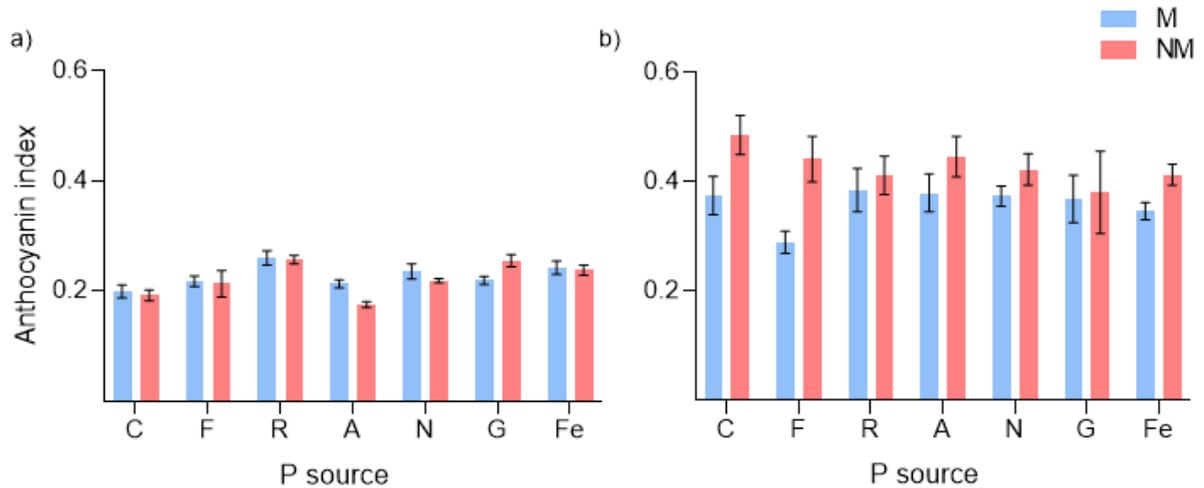


Figura 8. Índice de antocianinas em folhas de plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b), que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) e b) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA.

Analisando os fatores de inoculação de FMA e fontes de P no índice de flavonóis observamos que houve interação significativa entre a inoculação do FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) apenas na espécie de *E. grandis* (Tabelas 2 e 3).

O índice de flavonóis de folhas de *E. globulus* não apresentou efeito significativo de nenhum dos fatores estudados (Tabela 3, Figura 9.a). As plântulas NM de *E. grandis* que receberam fitato como única fonte de P tiveram 6% maior índice de flavonóis do que plântulas M que receberam a mesma fonte de P (Figura 9.b).

No geral, folhas de plântulas de *E. globulus* tiveram 20% maior índice de flavonóis que folhas de *E. grandis* ($F=200$, $P<0,001$), com em média 1,90, enquanto a média para plantas de *E. grandis* foi de 1,58.

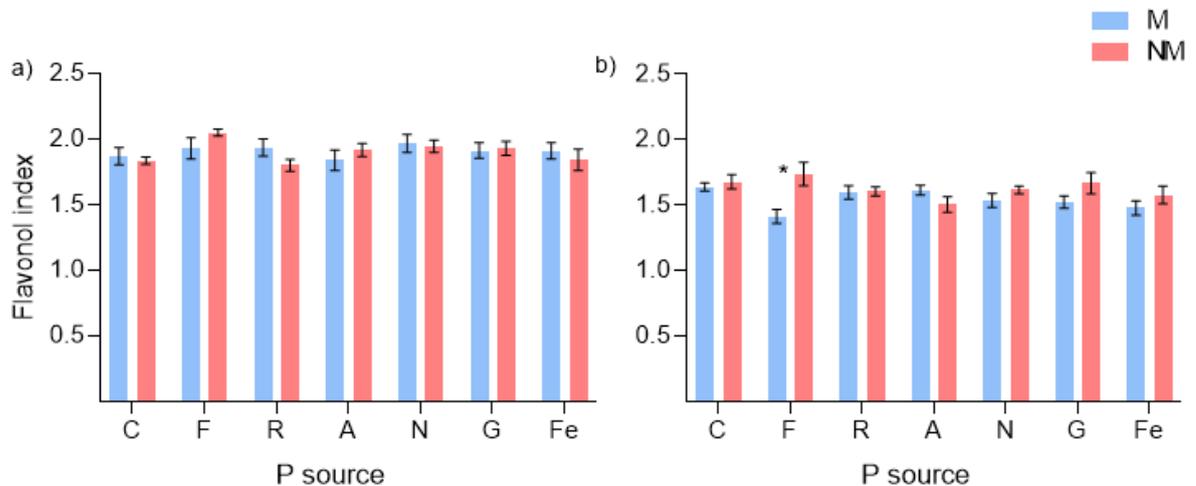


Figura 9. Índice de flavonóis em folhas de plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b), que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA. Em b) o asterisco indica diferença significativa entre plantas M e NM dentro de uma mesma fonte de P pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

O NBI não teve influência significativa da interação entre a inoculação de FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) em nenhuma das espécies (Tabelas 2 e 3). O NBI de plântulas de *E. globulus* não teve efeito significativo de nenhum dos fatores estudados (Tabela 2, Figura 10.a). Já, o NBI de plântulas de *E. grandis* apresentou efeito significativo da fonte de P (Tabela 3). Plantas de *E. grandis* supridas com necromassa bacteriana como única fonte de P tiveram 52% maior NBI que as que receberam fosfato de potássio, sendo as plantas supridas com fosfato de potássio as plantas com menor NBI (Figura 10.b). Plantas que receberam necromassa microbiana apresentaram em média NBI de 13,59 enquanto plantas que receberam fosfato de potássio tiveram média de 8,9.

No geral, não houve diferenças significativas no NBI das duas espécies estudadas ($F=0,581$, $P=0,4467$) ou no NBI de plantas M e NM ($F=0,838$, $P=0,3608$).

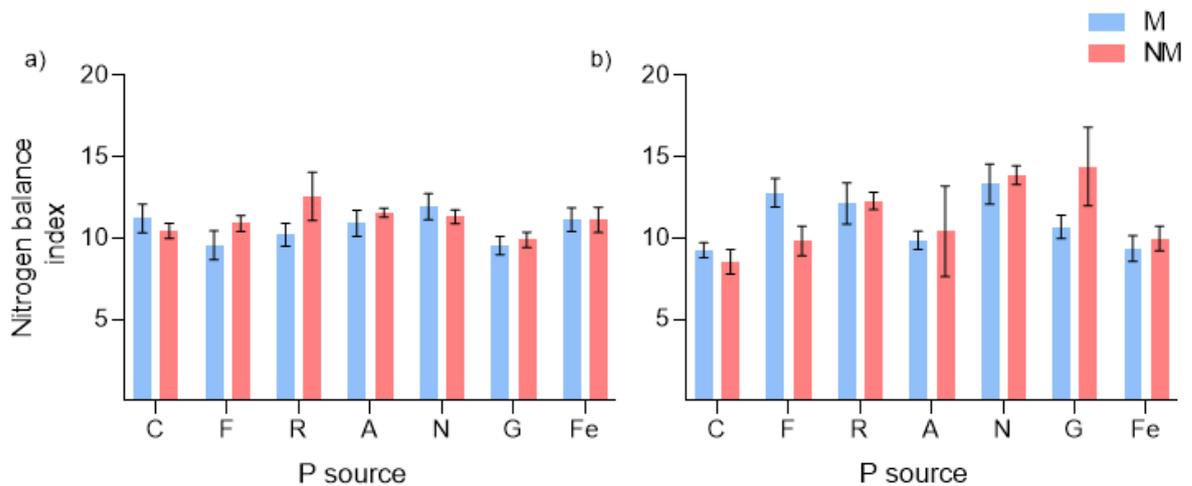


Figura 10. Índice de balanço de nitrogênio (NBI) em folhas de plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b), que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) e b) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA.

5.4. Colonização Micorrízica

As raízes de plantas que não receberam inoculação do FMA mostraram ausência de qualquer estrutura típica da colonização micorrízica arbuscular. No geral, as plantas de *E. globulus* não mostraram diferenças significativas na frequência de estruturas fúngicas típicas da simbiose micorrízica arbuscular (F%) em fragmentos de raízes de plantas sob diferentes fontes de P (Figura 11.a) e mantiveram a frequência de colonização em torno de 50%. Já as raízes de *E. grandis* apresentaram influência significativa das fontes de P na frequência micorrízica, sendo maior quando as plantas receberam ATP, necromassa bacteriana, RNA ou fosfato de ferro do que raízes que receberam fosfato de potássio, fitato ou glucose-6-fosfato (Figura 11.b). Em *E. grandis* a frequência de colonização micorrízica foi em média de 60%.

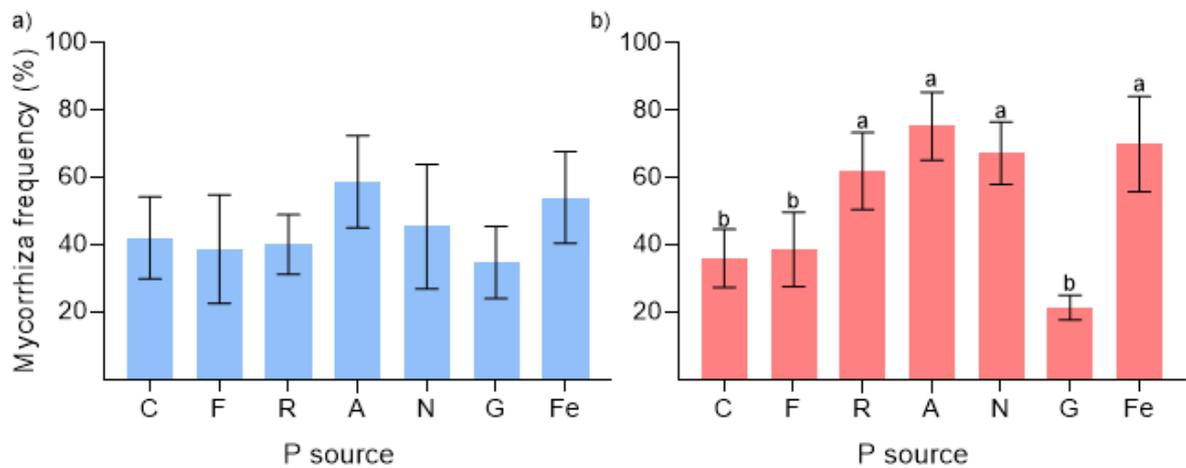


Figura 11. Frequência micorrízica em raízes de plantas de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b), que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as fontes de P dentro da mesma espécie, em plantas M pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

Em relação à intensidade micorrízica no sistema radicular (M%), no geral, em plântulas de *E. grandis* foi 28% maior do que em plântulas de *E. globulus* ($F=4,101$, $P<0,05$). A intensidade micorrízica (M%) das raízes de plântulas de ambas as espécies teve influência significativa das fontes de P (Figura 12). As raízes de *E. globulus* tiveram maior intensidade de colonização quando receberam necromassa bacteriana do que quando receberam outras fontes de P (Figura 12.a). Raízes de *E. grandis* tiveram maior intensidade de colonização quando receberam necromassa bacteriana, RNA, ou ATP como únicas fontes de P do que quando receberam fosfato de potássio, fitato ou glicose-6-P (Figura 12.b). Plântulas irrigadas com glucose-6-fosfato tiveram menos de 2% de intensidade de colonização, sendo a menor intensidade entre as diferentes fontes de P (Figura 12.b).

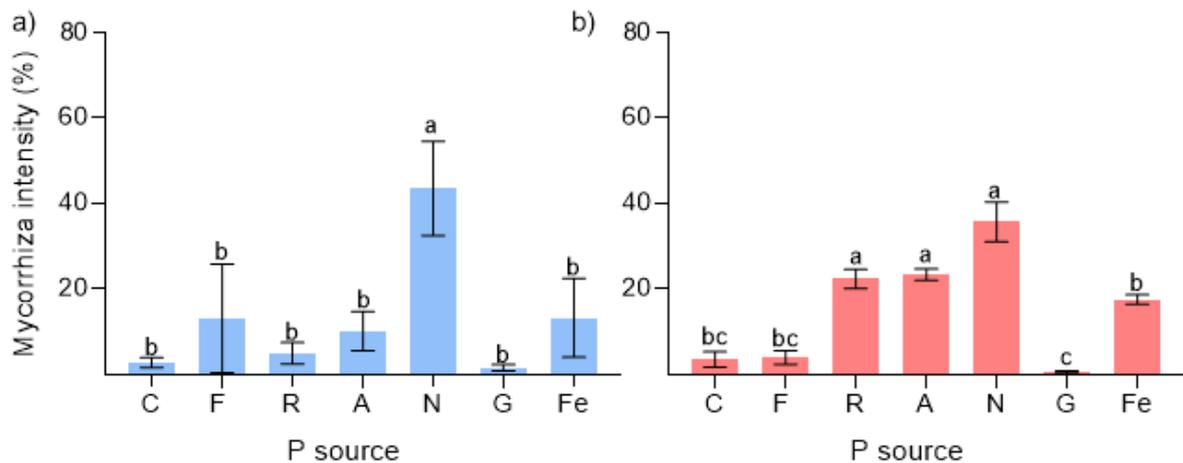


Figura 12. Intensidade de colonização micorrízica em raízes de plantas de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b), que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as fontes de P dentro da mesma espécie, em plantas M pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

Não houve diferenças significativas na abundância de arbúsculos (A%) entre o sistema radicular das duas espécies de eucalipto ($F=0,684$ $P=0,4110$). Plantas de *E. globulus* que receberam necromassa bacteriana como única fonte de P tiveram maior abundância de arbúsculos nas raízes do que plantas que receberam as outras fontes de P (Figura 13.a). Raízes de *E. grandis* tiveram maior abundância de arbúsculos quando irrigadas com necromassa bacteriana e fosfato de ferro do que quando irrigadas com glucose-6-fosfato (Figura 13.b).

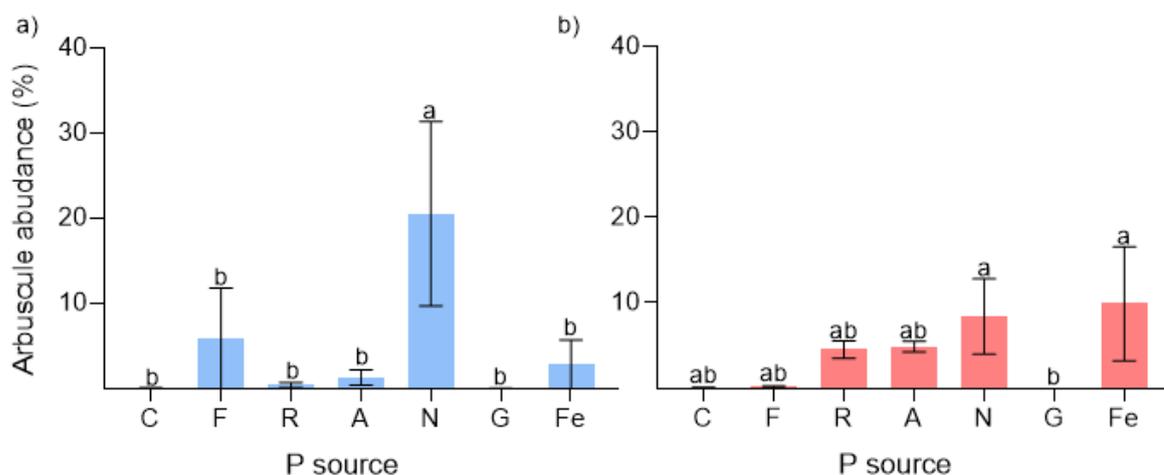


Figura 13. Abundância de arbúsculos em raízes de plantas de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b), que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as fontes de P dentro da mesma espécie, em plantas M pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.5. Comprimento do micélio externo do FMA

Em substratos onde cresceram plantas não inoculadas não foram observadas hifas com características compatíveis com FMA. Não houve diferença significativa no comprimento do micélio externo entre as espécies de eucalipto ($F=0,006$, $P=0,9382$). Tanto em *E. globulus* quanto em *E. grandis* a extensão do micélio externo foi maior em plântulas que receberam necromassa bacteriana com única fonte de P (Figura 14). Em *E. grandis* o comprimento do micélio externo foi significativamente menor quando as plantas receberam fitato e glucose-6-P do que quando receberam as outras fontes de P (Figura 14.b).

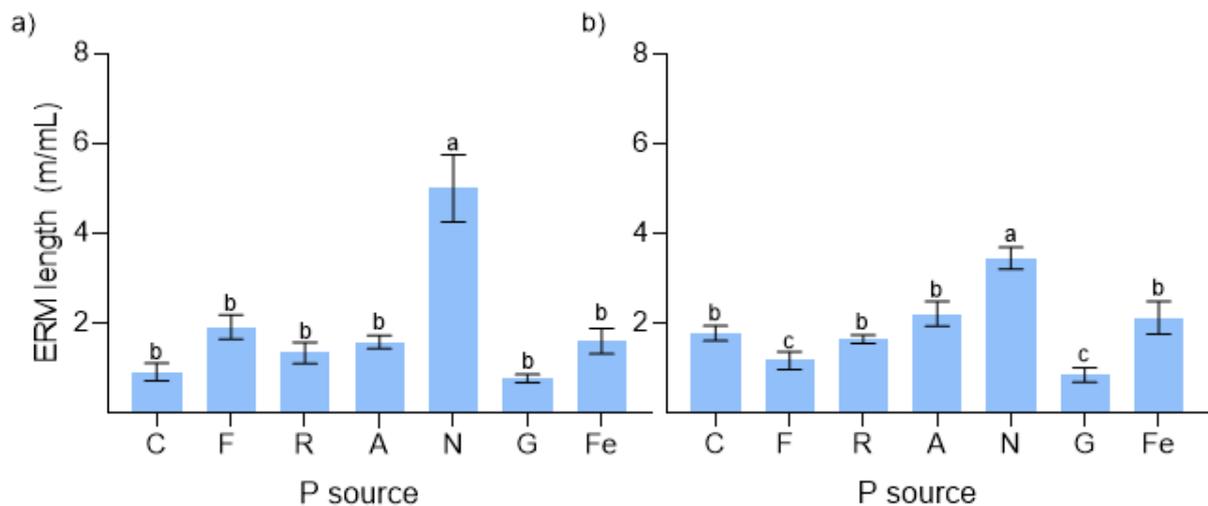


Figura 14. Comprimento do micélio externo do FMA ligado a raízes de plantas micorrizadas de *E. globulus* (a) e de *E. grandis* (b) que receberam diferentes fontes de P (c). C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as fontes de P dentro da mesma espécie, em plantas M pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.6. Concentração de P na parte aérea

A concentração de P não teve efeito significativo da interação entre a inoculação do FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) em nenhuma das espécies estudadas (Tabelas 2 e 3, Figura 15). Mas em ambas as espécies a concentração de P de apresentou efeito significativo da inoculação de FMA e das fontes de P (Tabelas 2 e 3, Figura 15). Independentemente da fonte de P plantas M de *E. globulus* tiveram 11% maior concentração de P que plantas NM, onde plantas M apresentaram média de $0,61 \text{ g kg}^{-1}$ de P, enquanto plantas NM $0,55 \text{ g kg}^{-1}$ de P. Da mesma forma, plantas

M de *E. grandis* tiveram 15% maior concentração de P do que as NM, com em média 0,73 g kg⁻¹ de P na parte aérea de plantas M e 0,63 g kg⁻¹ em plantas NM.

Independentemente da inoculação do FMA, as plantas que receberam fosfato de potássio e glucose-6-fosfato como únicas fontes de P tiveram maior concentração de P na parte aérea, apresentando médias de 0,73 g kg⁻¹ e 0,77 g kg⁻¹ de P na parte aérea, respectivamente, enquanto as que receberam fitato apresentaram menor concentração de P, com média de 0,47 g kg⁻¹ de P na parte aérea.

No geral, plântulas de *E. grandis* tiveram 16% maior concentração de P na parte aérea do que plântulas de *E. globulus* ($F = 18,27$, $P < 0,001$), com 0,6861 g kg⁻¹ de P na parte aérea de plântulas de *E. grandis* e 0,5867 g kg⁻¹ de P na parte aérea de plântulas de *E. globulus*. Em geral, plântulas M tiveram 13% maior concentração de P na parte aérea do que as NM ($F=12,82$, $P < 0,001$), com 0,67 g kg⁻¹ de P na parte aérea de plântulas M e 0,59 g kg⁻¹ em plântulas NM.

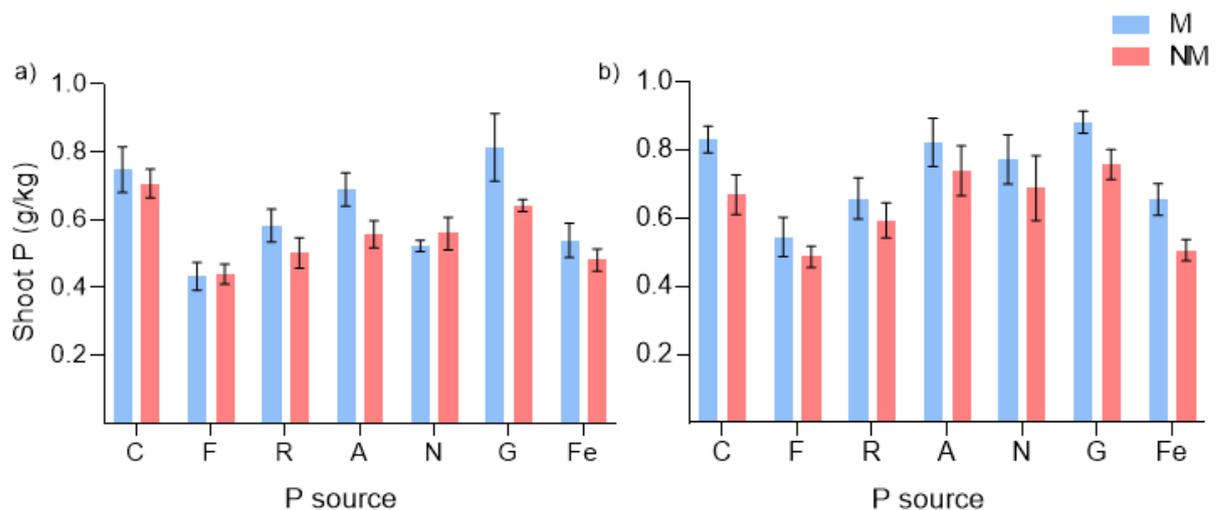


Figura 15. Concentração de P na parte aérea de plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b) que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) e b) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA.

5.7. Conteúdo de P nas plantas

O conteúdo de P teve efeito significativo da interação entre a inoculação de FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) apenas na espécie de *E. grandis* (Tabelas 2 e 3, Figura 16). Entretanto, em ambas as espécies o conteúdo de P teve efeito

significativo dos outros dois fatores em estudo: a inoculação do FMA e a fonte de P (Tabelas 2 e 3).

No geral, independentemente das fontes de P, as plântulas M de *E. globulus* tiveram 17% maior acúmulo de P que plântulas NM, com média de 0,20 mg de P por planta em plântulas M e 0,17 mg planta⁻¹ em plântulas NM. Plantas de *E. globulus* que receberam fosfato de potássio e glucose-6-fosfato (0,24 mg planta⁻¹ de P) acumularam 172% maior conteúdo de P do que as que receberam fitato (0,09 mg planta⁻¹ de P) como única fonte de P.

Em *E. grandis* as plântulas M que receberam fosfato de potássio, ATP e glucose-6-fosfato tiveram 29%, 23% e 16% maior acúmulo de P na parte aérea que plântulas homólogas NM, respectivamente (Figura 16.b). No entanto, plantas NM que receberam fosfato de ferro como única fonte de P tiveram 72% maior acúmulo de P que plântulas M que receberam a mesma fonte de P (Figura 16.b). Plantas NM de *E. grandis* irrigadas com glucose-6-fosfato tiveram mais P acumulado na parte aérea que as irrigadas com RNA, ATP, necromassa bacteriana, fitato e fosfato de ferro (Figura 16.b).

Em geral, considerando os dados dos experimentos 1 e 2, as plântulas de *E. globulus* acumularam 46% maior conteúdo de P que as de *E. grandis* ($F=40,70$, $P < 0,001$), com 0,19 mg de P por planta em *E. globulus* e 0,13 mg de P por planta em *E. grandis*. No geral, plântulas M acumularam 6% mais P do que as NM ($F=40,5$, $P < 0,01$), onde plantas M apresentaram em média 0,18 mg de P e plantas NM em média 0,16 mg de P.

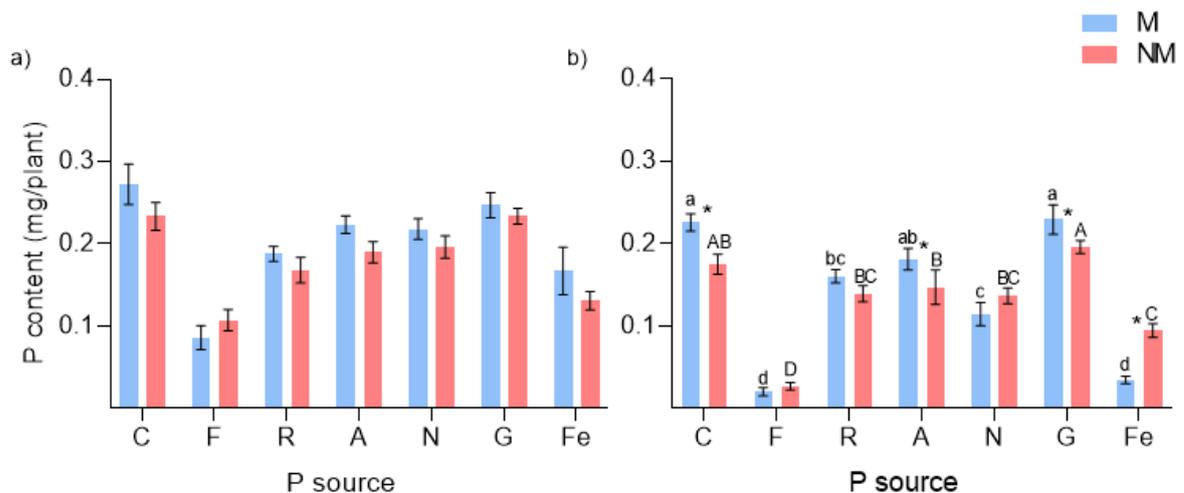


Figura 16. Conteúdo de P em plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b), que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA. Em e b) o asterisco indica diferença significativa entre plantas M e NM dentro de uma mesma fonte de P pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as fontes de P dentro da mesma espécie, em plantas M (minúsculas) e NM (maiúsculas) pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.8. Eficiência de absorção de P (PUpE)

Analisando os efeitos da inoculação do FMA e das fontes de P na PUpE observa-se que houve efeito significativo da interação entre a inoculação de FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) apenas em plântulas de *E. grandis* (Tabelas 2 e 3).

A PUpE de plantas de *E. globulus* apresentou efeito significativo da inoculação do FMA e das fontes de P (Tabela 2). Plantas M de *E. globulus* tiveram 8% maior PUpE do que plantas NM, com PUpE médio de 0,38 e de 0,35 em plantas M e NM, respectivamente. Quanto ao efeito da fonte na PUpE, plântulas de *E. globulus* que receberam glucose-6-P e fosfato de potássio tiveram respectivamente 155% e 172% maior PUpE do que plantas que receberam fitato como única fonte de P, onde plantas supridas com glucose-6-fosfato e fosfato de potássio tiveram PUpE média de 0,47 e plantas supridas com fitato PUpE média de 0,18 (Tabela 4).

As plântulas de *E. grandis* que receberam glucose-6-P e fosfato de potássio tiveram maior PUpE que as plantas que receberam outras fontes de P (Tabela 4), e plantas que receberam fitato como única fonte de P tiveram menor PUpE (Tabela 4). Plantas NM de *E. grandis* que receberam fosfato de ferro tiveram 157% maior PUpE que plantas M que receberam a mesma fonte de P (Tabela 4). Já quando plantas M

de *E. grandis* receberam fosfato de potássio tiveram 25% maior PUpE que as NM com a mesma fonte de P (Tabela 4).

No geral, as plantas de *E. globulus* tiveram 42% maior PUpE que *E. grandis* ($F= 108, P<0,001$), com PUpE média de 0,37 e 0,26 em *E. globulus* e *E. grandis* respectivamente. Plantas M tiveram 6% maior PUpE em relação às plantas NM ($F=6,96, P<0,05$), com 0,32 e 0,30 de PUpE em plantas M e NM, respectivamente.

Tabela 4. Eficiência de absorção de P (PUpE) ($\text{g P}_{\text{Parte aérea}} \text{g}^{-1} \text{P}_{\text{Substrato}}$) em *E. globulus* e *E. grandis*, em plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) que receberam diferentes fontes de P.

Fonte de P	<i>E. globulus</i>		<i>E. grandis</i>	
	M	NM	M	NM
G	0,48	0,45	0,45 a	0,38 A
F	0,17	0,21	0,04 d	0,05 D
R	0,37	0,33	0,31 bc	0,27 BC
A	0,44	0,37	0,35 ab	0,29 AB
N	0,42	0,38	0,22 ab	0,27 C
C	0,53	0,45	0,45 a *	0,34 A
Fe	0,33	0,25	0,07 cd	0,18 D *

F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as fontes de P dentro da mesma espécie, em plantas M (minúsculas) e NM (maiúsculas) pelo teste de Tukey $p < 0,05$. O asterisco indica diferença significativa entre plantas M e NM dentro de uma mesma fonte de P pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.9. Eficiência de uso de P (PUE)

A PUE não teve efeito significativo da interação entre a inoculação de FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) em nenhuma das espécies (Tabelas 2 e 3).

A PUE de plantas de *E. globulus* apresentou efeito significativo das fontes de P (Tabela 2), com plantas que receberam necromassa bacteriana apresentando 158% maior PUE que plantas supridas com fitato, as quais tiveram também os menores valores de PUE, com média de 0,12 (Tabela 5).

Em plantas de *E. grandis* a PUE apresentou efeitos significativos das fontes de P (Tabela 3), com plantas que receberam RNA e fosfato de potássio apresentando os maiores valores de PUE (0,11 e 0,12, respectivamente), enquanto as que receberam fitato tiveram os menores (0,07) (Tabela 5).

No geral, considerando os resultados dos experimentos 1 e 2, plantas de *E. globulus* tiveram 162% maior PUE que plantas de *E. grandis* ($F=119$, $P<0,001$), apresentando valores médios de 0,21 e 0,08 em *E. globulus* e *E. grandis*, respectivamente.

Tabela 5. Eficiência de uso de P (PUE) ($\text{g MS g}^{-2} [\text{P}]_{\text{Parte aérea}}$) em *E. globulus* e *E. grandis*, em plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) que receberam diferentes fontes de P.

Fonte de P	<i>E. globulus</i>		<i>E. grandis</i>	
	M	NM	M	NM
G	0,17	0,21	0,08	0,10
F	0,09	0,15	0,00	0,01
R	0,21	0,29	0,11	0,12
A	0,19	0,22	0,08	0,09
N	0,34	0,28	0,05	0,13
C	0,21	0,15	0,10	0,12
Fe	0,21	0,19	0,07	0,08

F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. A ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA.

5.10. Conteúdo de N

O conteúdo de N da parte aérea das plantas não teve efeito significativo da interação entre a inoculação de FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) em nenhuma das espécies (Tabelas 2 e 3). O conteúdo de N teve efeito significativo da inoculação de FMA e da fonte de P (Tabelas 3 e 4).

No geral, plantas M de *E. globulus* tiveram conteúdo de N 64% maior que plantas NM, com em média $3,58 \mu\text{g g}^{-1}$ de N, enquanto plantas NM apresentaram $2,17 \mu\text{g g}^{-1}$. Plantas M de *E. grandis* tiveram 140% maior conteúdo de N que plantas NM, com $4,24$ e $1,76 \mu\text{g g}^{-1}$ de N, em M e NM respectivamente (Tabela 6). Plantas que receberam necromassa bacteriana tiveram até 58% maior conteúdo de N do que plantas supridas com fitato, com $3,85$ e $2,43 \mu\text{g g}^{-1}$ de N, respectivamente (Tabela 6).

Considerando os resultados dos experimentos 1 e 2, não houve diferenças significativas no conteúdo de N entre as espécies de eucalipto ($F=0,208$, $P=0,6489$). E no geral, as plantas M tiveram 99% maior conteúdo de N que plantas NM ($F=81,5$, $P<0,001$), com $3,91$ e $1,96 \mu\text{g g}^{-1}$ de N, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Conteúdo de nitrogênio ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS) em *E. globulus* e *E. grandis*, em plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) que receberam diferentes fontes de P.

Fonte de P	<i>E. globulus</i>		<i>E. grandis</i>	
	M	NM	M	NM
G	3,26	2,17	3,95	0,33
F	4,30	0,66	4,20	2,54
R	3,73	2,50	3,94	1,77
A	3,25	1,67	3,82	1,82
N	4,09	3,13	5,92	2,26
C	2,10	2,04	4,31	1,53
Fe	4,34	2,99	3,56	2,05

F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. A ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA.

5.11. Atividade fitase extracelular em raízes

A atividade fitase teve efeito significativo da interação entre a inoculação do FMA e as fontes de P em *E. globulus*; em plantas de *E. grandis* nem os fatores nem a interação dos fatores tiveram efeito significativo na atividade da fitase (Tabelas 2 e 3).

As plântulas M de *E. globulus* que receberam glucose-6-fosfato, fitato e ATP apresentaram 50%, 76% e 53% maior de atividade fitase do que plântulas NM, respectivamente (Figura 17.a). Em plantas NM de *E. globulus* a atividade fitase foi em média 39% maior quando receberam glucose-6-fosfato, necromassa bacteriana, fosfato de ferro ou RNA como únicas fontes de P do que nas quando receberam outras fontes de P (Figura 17.a).

A atividade fitase das raízes de *E. grandis* não apresentou diferenças significativas em resposta à inoculação ou a fonte de P (Tabela 3, Figura 17.b).

Em geral, a atividade fitase de raízes de *E. grandis* e de *E. globulus* não apresentou diferenças significativas ($F=0,165$, $P=0,6856$).

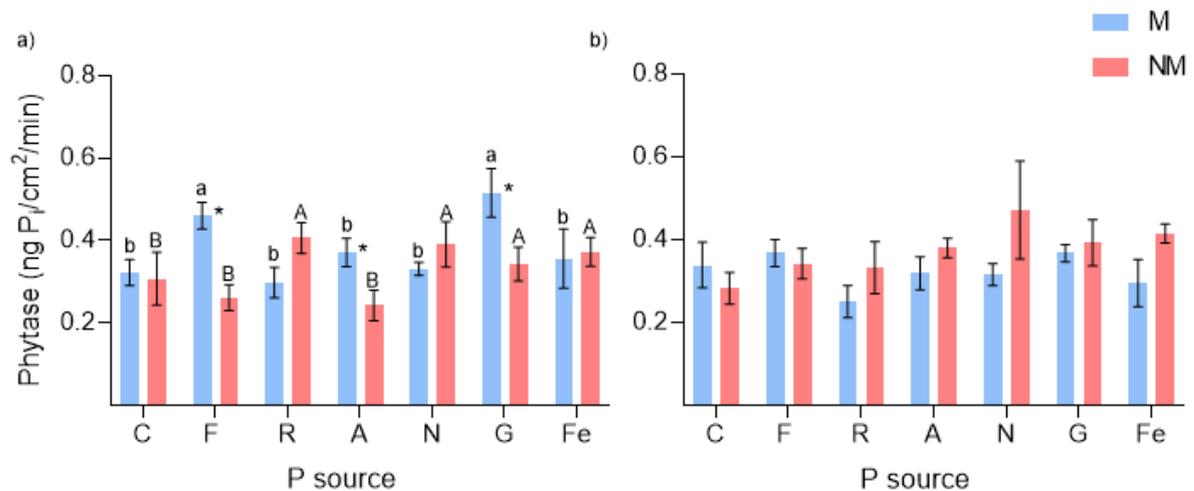


Figura 17. Atividade fitase em raízes de plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b) que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) o asterisco indica diferença significativa entre plantas M e NM, dentro de uma mesma fonte de P pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Em b) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as fontes de P dentro da mesma espécie, em plantas M (minúsculas) e NM (maiúsculas) pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.12. Atividade fosfatase ácida secretada nas raízes (rAPase)

A atividade rAPase não teve efeito significativo da interação entre a inoculação de FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) em nenhuma das espécies estudadas (Tabelas 2 e 3). No entanto, a fonte de P teve efeito significativo na atividade rAPase em plântulas de *E. globulus* e *E. grandis* (Tabelas 2 e 3). Geralmente, plantas que receberam fitato, necromassa microbiana e fosfato de ferro como únicas fontes de P apresentaram até 112% maior atividade rAPase que plantas supridas com fosfato de potássio, apresentando em média atividades rAPase de 1774, 1611 e 1458 nmol/cm²/h, respectivamente, enquanto as que receberam fosfato de potássio apresentaram a menor atividade rAPase (835 nmol/cm²/h) (Figura 18).

No geral, não houve diferença significativa na atividade rAPase de plântulas de *E. globulus* e *E. grandis*, ($F=0,001$, $P=0,9759$) e raízes M e NM mostraram atividade APase similar ($F=3,191$ $P=0,0762$).

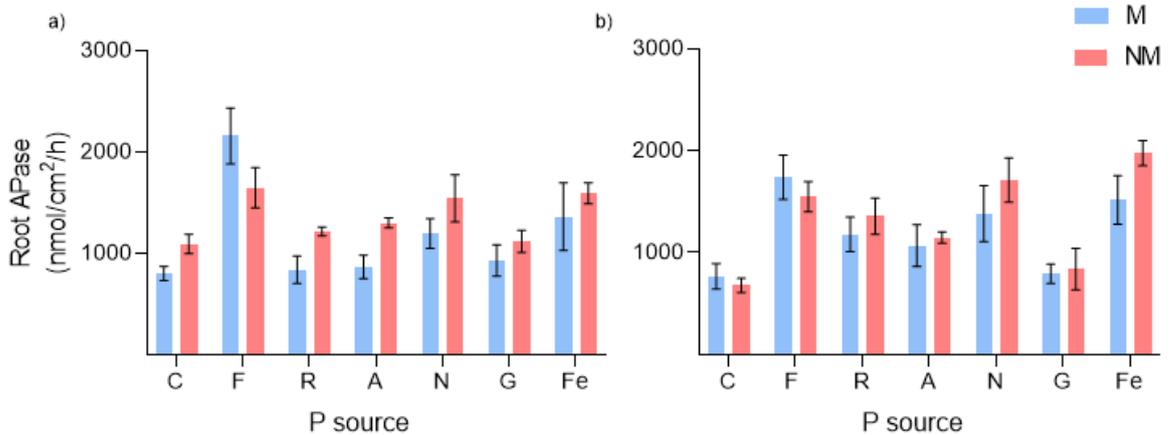


Figura 18. Atividade rAPase em plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b) que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) e b) a ausência de letras ou asteriscos indica interação não significativa entre fontes de P e inoculação ou não do FMA

5.13. Atividade fosfatase ácida do micélio externo (mAPase)

Em relação à atividade mAPase houve efeito significativo da interação entre a inoculação do FMA e as fontes de P (FMA * Fonte P) em ambas as espécies, assim como também da inoculação do FMA e da fonte de P (Tabelas 2 e 3).

Como esperado, em plantas NM a atividade mAPase da solução extraída do substrato onde as plantas cresceram foi muito baixa (Figura 19), pois não houve presença de hifa de FMA. Em substratos onde cresceu *E. globulus* a maior atividade mAPase foi observada quando as plantas receberam necromassa bacteriana como única fonte de P, enquanto a menor atividade foi quando as plântulas receberam fosfato de potássio e glucose-6-P (Figura 19.a).

Nos substratos onde cresceu *E. grandis* a maior atividade mAPase também foi observada quando as plântulas receberam necromassa bacteriana, e as menores quando as plântulas receberam glucose-6-P e fitato (Figura 19.b).

Não houve diferença significativa na atividade mAPase entre as espécies de eucalipto estudadas ($F=0,013$, $P=0,9093$).

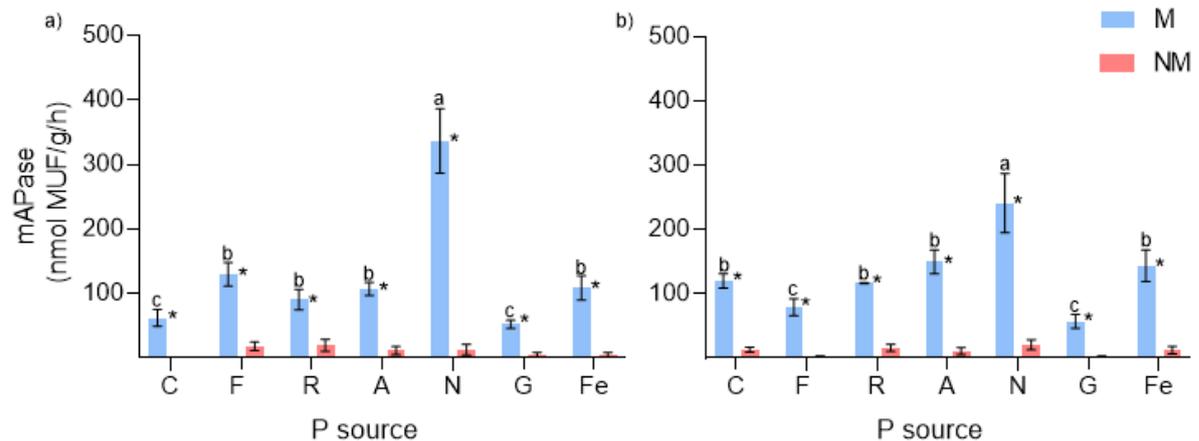


Figura 19. Atividade fosfatase ácida do micélio externo (mAPase) do FMA em substrato onde cresceram plantas micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM) de *E. globulus* (a) e *E. grandis* (b) que receberam diferentes fontes de P. C: fosfato de potássio, F: fitato, R: RNA, A: ATP, N: necromassa bacteriana, G: glucose-6-fosfato, e Fe: fosfato de ferro III. Em a) e b) o asterisco indica diferença significativa entre plantas M e NM, dentro de uma mesma fonte de P pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as fontes de P dentro da mesma espécie, em plantas M (minúsculas) e NM (maiúsculas) pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.14. Análise de correlação de Pearson e PCA

Considerando as variáveis analisadas em plantas M e NM foi realizada a análise de correlação de Pearson com os resultados para plantas de *E. globulus* e *E. grandis* conjuntamente (Figura 20). Destaca-se que as atividades rAPase e fitase se correlacionaram positiva e significativamente entre si em plantas M ($r = 0,44$, $p < 0,001$, Figura 20.a) e NM ($r = 0,44$, $p < 0,001$, Figura 20.b). A rAPase se correlacionou negativamente com o conteúdo de P em ambas as condições M ($r = 0,46$ $p < 0,001$, Figura 20.a) e NM ($r = 0,39$ $p < 0,001$, Figura 20.b). O conteúdo de P também teve correlação positiva significativa com a biomassa radicular em plantas M ($r = 0,63$ $p < 0,001$, Figura 20.a) e NM ($r = 0,56$, $p < 0,001$) e com biomassa de parte aérea em plantas M ($r = 0,82$ $p < 0,001$, Figura 20.a) e NM ($r = 0,78$, $p < 0,001$, Figura 20.b)

Em plantas M, a mAPase teve correlação positiva com a extensão do micélio extrarradicular ($r = 0,958$, $p < 0,001$, Figura 20) e com a intensidade de colonização micorrízica ($r = 0,565$ $p < 0,001$, Figura 20).

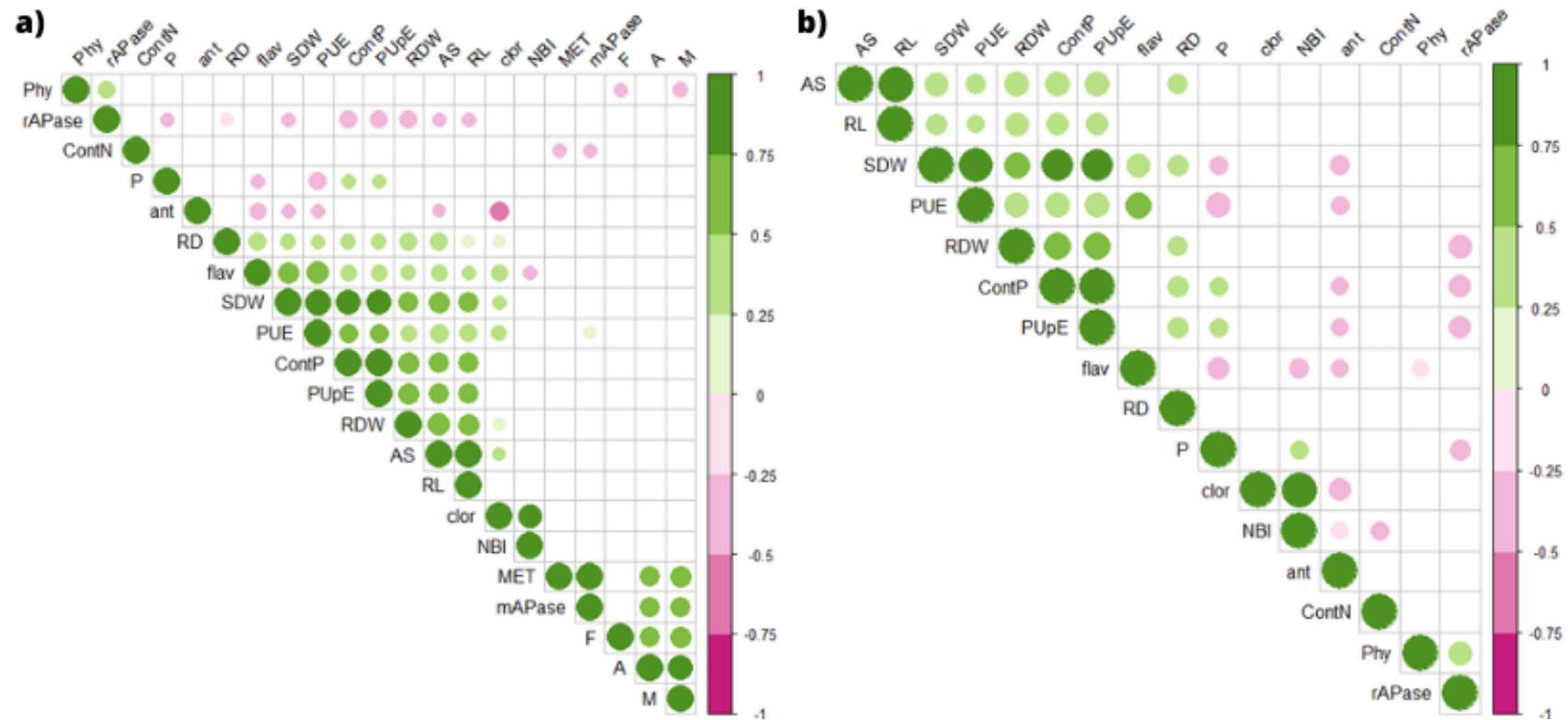


Figura 20: Matriz baseada nos coeficientes de correlação de Pearson derivados dos valores de variáveis analisados em plantas de *E. globulus* e *E. grandis* micorrizadas (a) e não-micorrizadas (b). Círculos rosas indicam correlação negativa e círculos verdes indicam correlações positivas. Abreviações: P: concentração de P; PUE: eficiência de uso de P; ant: índice de antocianinas; RD: diâmetro radicular; ContP: conteúdo de P; Cont N: conteúdo de N; SDW: biomassa da parte aérea; RDW: biomassa radicular; AS: área superficial radicular; RL: comprimento radicular; flav: índice de flavonóis; PUpE: eficiência de absorção de P; clor: índice de clorofilas; rAPase: APase radicular; MET: comprimento do micélio externo; mAPase: APase do micélio externo; F: frequência micorrízica; A: abundância de arbúsculos; M: intensidade de colonização micorrízica.

A PCA de todos os parâmetros estudados é apresentada na Figura 21. Nas plantas micorrizadas o primeiro (PC1) e segundo (PC2) componentes explicaram 38% e 25% da variação total, respectivamente (Figura 21.a e c). Já se tratando das plantas NM, os primeiros dois componentes explicaram mais de 65% da variação de dados total, com PC1 e PC2 explicando 45% e 20,9% da variação (Figura 21.b e d).

As espécies de plantas supridas com diferentes fontes de P e a variação de distribuição ao longo do primeiro componente revelaram que plantas M supridas com fitato e fosfato de ferro como únicas fontes de P tiveram tendência a se agruparem, sendo que apenas a espécie de *E. globulus* suprida com fosfato de ferro se separou das demais plantas que receberam estas fontes de P; este agrupamento se mostrou influenciado pela atividade da rAPase (Figura 21.a e c).

Plantas NM supridas com fosfato de ferro e fitato também se agruparam devido à atividade rAPase, no entanto a espécie de *E. globulus* suprida com fitato se separou das demais plantas supridas com mesma fonte e fosfato de ferro, se agrupando com outras *E. globulus* que receberam as demais fontes de P, influenciado pelo índice de flavonóis e clorofilas (Figura 21.b e d).

Além disso, tanto em plantas M como NM, plantas supridas com fosfato de potássio e glucose-6-P tiveram tendência a se agruparem no mesmo quadrante devido aos seus valores de conteúdo de P semelhantes (Figura 21).

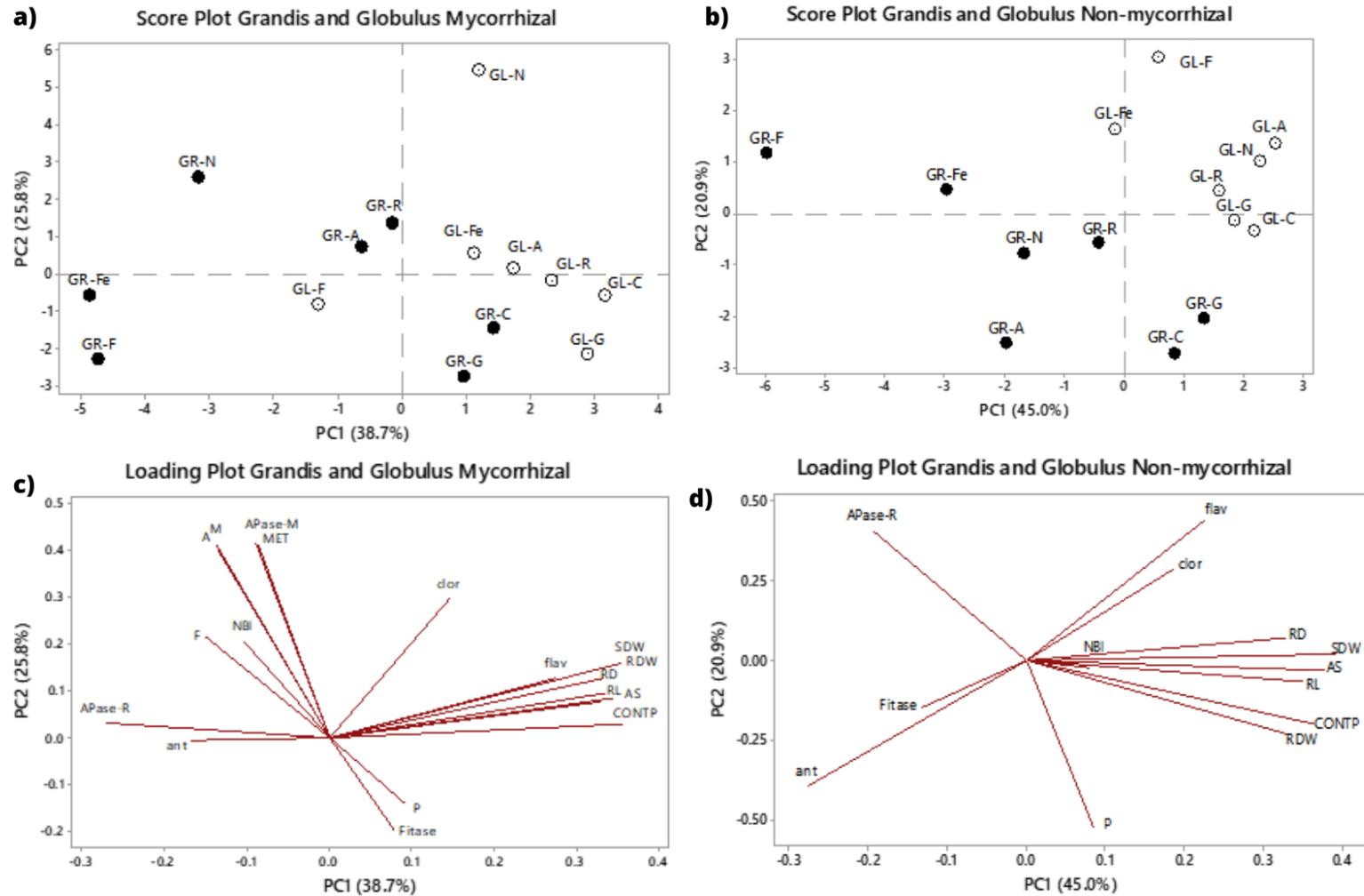


Figura 21: Análise de componentes principais combinando variáveis relacionadas ao crescimento, nutrição e mineralização de P em plantas de *Eucalyptus globulus* (GL) e *E. grandis* (GR), micorrizadas (M) e não-micorrizadas (NM), crescidas com diferentes fontes de P. Os números em parênteses indicam o percentual da variação do primeiro (PC1) e segundo (PC2) componente principal. a) e b) mostram os scores e c) e d) mostram os *loading plots*. Abreviaturas das fontes: C: fosfato de potássio; G: glucose-6-P; F: fitato; R: RNA; A: ATP; N: necromassa bacteriana; Fe: fosfato de ferro; APase-M: atividade fosfatase do micélio; MET: comprimento do micélio externo; M: intensidade de colonização micorrízica; F: frequência de colonização micorrízica; A: abundância de arbuscúlos; APase-R: atividade fosfatase radicular; Fitase: atividade fitase radicular; ant: índice de antocianinas; flav: índice de flavonóis; clor: índice de clorofilas; NBI: índice de balanço de N; RD: diâmetro radicular; SDW: biomassa da parte aérea; AS: área superficial radicular; RL: comprimento radicular; CONTP: conteúdo de P; RDW: biomassa radicular; P: concentração de P.

6. Discussão

6.1. Capacidade de uso de P por plântulas de eucalipto: influência da espécie, fonte de P e micorrização

Os resultados obtidos mostram que as plântulas de eucalipto podem usar o P presente em diferentes fontes de P, mas essa capacidade de usar o P depende da espécie de eucalipto e da fonte de P (Figuras 2, 15 e 16, Tabelas 4 e 5).

Plantas de *E. globulus* tiveram, no geral, uma maior PUE (Tabela 4) do que plantas de *E. grandis*, especialmente quando as plantas foram expostas a fontes menos recalcitrantes de P como fosfato de potássio e glucose-6-fosfato. Da mesma forma, plantas de *E. globulus* apresentaram maior PUE que plantas de *E. grandis*, principalmente quando foram supridas com necromassa microbiana como única fonte de P (Tabela 5). Isto pode indicar que as plantas de *E. globulus* possuem uma maior capacidade de absorver e utilizar P em comparação com as plantas de *E. grandis*. Estes dados sugerem que as plantas de *E. globulus* podem ser mais adaptadas a ambientes com disponibilidade limitada de P, o que pode ser uma vantagem em condições de solo com baixos níveis desse nutriente. Além disso, essa maior PUE pode ter implicações para o aumento da produtividade e a sobrevivência das plantas de *E. globulus* em diferentes ecossistemas, especialmente aqueles com restrições de nutrientes. No entanto, é importante continuar a investigar mais a fundo essas diferenças entre as espécies e compreender como elas afetam as dinâmicas dos ecossistemas em que essas plantas estão presentes.

A inoculação do FMA também influenciou a capacidade das plantas utilizar o P de algumas das fontes estudadas, modificando a atividade rAPase e fitase das raízes, o que foi evidente no caso de *E. globulus*, em que plantas M que apresentaram maiores atividades enzimáticas do que plantas NM (Figuras 17 e 18), o que pode ter resultado na maior concentração de P na parte aérea destas plantas (Figura 15). Entretanto, em plantas M a atividade rAPase se mostrou negativamente correlacionada com o conteúdo de P ($r = 0,43$, $p < 0,001$ Figura 20.a) e sem correlação com os parâmetros relacionados com a micorrização, indicando que a atividade enzimática está mais relacionada com a necessidade de P da planta do que com a presença da micorriza. A secreção de fosfatases pela raiz é considerada uma resposta geral das plantas ao estresse por deficiência de P, o que pode promover a

mineralização de fontes orgânicas de P na rizosfera e melhorar a aquisição de P pelas raízes (Lambers, 2022).

As atividades rAPase e fitase das raízes se correlacionaram positivamente em plantas M e NM (Figura 20), o que era de certa forma esperado uma vez que fitases são um tipo de fosfomonoesterases que hidrolisam fitato (Ye et al., 2017).

No geral os resultados suportam a hipótese de que a atividade fosfatase das raízes de eucalipto é maior quando as plantas estão expostas a fontes de P mais recalcitrantes, como o fitato, ou menos solúveis, como o fosfato de ferro, condições nas quais as plantas têm baixo acúmulo de P, o que pode levar a expressar de forma mais intensa estratégias de resposta a deficiência por P (Lambers, 2022).

Por outro lado, a alta atividade fosfatase em raízes de plantas supridas com necromassa bacteriana como única fonte de P poderia estar relacionada à maior quantidade de nutrientes supridos com esta forma, o melhor status nutricional da planta e a maior disponibilidade de nutrientes como N (Tabela 6) pode ter favorecido a síntese de fosfatases, que são proteínas (Olander & Vitousek, 2000; Guilbeault-Mayers et al., 2020; Ao et al., 2020).

A menor atividade rAPase de plantas irrigadas com fosfato de potássio em relação ao observado em plantas com outras fontes menos acessíveis de P era esperada pois plantas supridas com esta fonte inorgânica de P apresentaram maior conteúdo de P, o que pode reprimir a síntese de fosfatases (Kavka et al., 2021; Yadav & Tarafdar, 2001).

A atividade mAPase medida a partir de substratos onde cresceram as plantas inoculadas com o FMA foi significativamente maior do que mAPase do extrato de substratos das plantas não inoculadas, mostrando a contribuição substancial das hifas de FMA com a atividade detectada (Figura 19).

Devido à dificuldade em coletar biomassa fúngica extrarradicular suficiente para determinar atividade fosfatase, medições anteriores de mAPases de FMA em solo livre de raízes foram feitas considerando que diferenças na atividade enzimática entre os solos com e sem hifas de FMA são causadas pela exsudação direta de fosfatases ou por fosfatases ligadas à parede externa do micélio do FMA (Joner et al., 1995; Tarafdar & Marschner, 1994). Entretanto, a presença de APase em FMA tem sido assunto bastante controverso, onde alguns autores indicaram que hifas extrarradiculares de FMA possuem fosfatases ácidas, as quais estão principalmente

na superfície das hifas associadas à parede celular do fungo (Joner & Johansen, 2000; Sato et al., 2015). No entanto, estudos recentes têm mostrado que FMAs têm capacidade reduzida de mineralizar P_o , com ausência de genes de fosfatases secretadas e fitases no genoma do isolado DAOM 197198 de *R. irregularis* (Tisserant et al., 2013). Isto tem reforçado a hipótese de que a capacidade de FMAs utilizar P_o provém de funções do microbioma associado às hifas (Zhang et al., 2019).

Este estudo foi conduzido em condições de baixa carga microbiana, mas não axênicas, pelo que não só o substrato utilizado para o crescimento das plantas, mas também as próprias raízes e o micélio extrarradicular do FMA estavam provavelmente associados a microrganismos, e considerando que o inóculo de FMA utilizado também não era livre de outros microrganismos. Sabe-se que o microbioma associado à hifosfera de FMAs proporciona funções relacionadas à mineralização do P_o que podem estar ausentes no próprio FMA (Wang et al., 2022; Wang et al., 2023). Microrganismos associados à hifosfera de FMAs têm sido considerados o “segundo genoma” de FMAs (Zhang et al., 2022) com hifas de FMAs promovendo a capacidade de solubilização e mineralização de P_o através de exsudação de compostos ricos em C e sinalizadores que induzem a expressão de fosfatases bacterianas (Zhang et al., 2018). Ainda assim, consideramos que a colonização de outros microrganismos no substrato deste experimento tenha sido baixa, considerando que a maior atividade fitase de solos naturais é desempenhada por microrganismos (Kuo et al., 2015) e aqui no presente estudo tivemos baixa utilização do P do fitato e poucas diferenças no uso do P do fitato entre plantas M e NM. Por estes motivos a atividade fitase que pode ser atribuída essencialmente à atividade das raízes.

A inoculação do FMA contribuiu para a absorção e acúmulo de P na parte aérea (Figuras 15 e 16), indicando que o micélio extrarradicular contribuiu para aquisição de P pelas raízes, assim como já observado em outros trabalhos (Bagyaraj et al., 2015). Da mesma forma, em *E. globulus* a micorrização influenciou positivamente o PUpE (Tabelas 2 e 4), o que pode ser atribuído ao fato de os FMA serem mais eficientes na captação de P do que as raízes devido às hifas micorrízicas terem menor diâmetro do que as raízes (Silveira & Cardoso, 2004; Freschet et al., 2021). Além disso, FMAs podem modificar as raízes funcionalmente, ampliando sua capacidade em adquirir diferentes formas de P no solo (de Vries et al., 2021).

Em substratos onde cresceram plantas micorrizadas, a atividade mAPase variou dependendo da fonte de P, com menor atividade no micélio de plantas com glucose-6-P e fitato, no caso de *E. grandis*, e com fosfato de potássio e glucose-6-P, em *E. globulus* (Figura 19). A maior atividade mAPase foi em plantas supridas com necromassa bacteriana em ambas as espécies (Figura 19), que também foram as plantas que apresentaram maior comprimento de micélio externo do FMA (Figura 14) e maior conteúdo de N (Tabela 6). Já a menor atividade mAPase foi em substratos de plantas M supridas com glucose-6-P como fonte de P, provavelmente associada a fácil mineralização deste fosfomonoéster (Hayes et al., 2000), o que pode demandar menor produção destas enzimas. O substrato utilizado para determinação da atividade APase em raízes e micélio do FMA é um análogo de fosfomonoésteres, o 4-methylumbelliferyl fosfato (MUF-P), que são considerados os principais componentes do pool de P_o em algumas florestas tropicais úmidas, por exemplo (Turner & Engelbrecht, 2011). Estes resultados corroboram com a explicação de Joner & Johansen (2000) em que a síntese enzimática é regulada por indução e repressão, de acordo com a presença do substrato (P_o) e produto (P_i), respectivamente.

Já a menor atividade mAPase de *E. grandis* que receberam fitato pode estar relacionada com a baixa extensão do micélio externo (Figuras 19.b e 14.b), uma vez que plantas com esta fonte de P tiveram baixa produção de biomassa de raiz e baixa colonização por fungo capaz de produzir micélio externo (Figuras 3.b e 12.b).

A mAPase esteve fortemente correlacionada com o comprimento de micélio extrarradicular do FMA ($r = 0,958$, $p < 0,001$, Figura 20), indicando que a atividade aumentou conforme a extensão de hifas extrarradiculares produzidas pelo fungo, como foi o caso de plantas que receberam necromassa bacteriana como única fonte de P (Figuras 19, 14 e 20). Quanto maior a colonização intrarradicular e a abundância de arbúsculos no córtex da raiz, maior o comprimento de micélio externo produzido ($r = 0,665$ $p < 0,001$, Figura 20) e maior a atividade fosfatase do micélio ($r = 0,565$ $p < 0,001$, Figura 20). Isto pode sugerir que a transferência bidirecional de recursos entre hospede e hospedeiro favorece o estabelecimento do fungo na raiz e em consequência a transferência de C para o crescimento de hifas extrarradiculares, as quais podem exsudar diferentes compostos sustentando a atividade de microrganismos com atividade de mineralização de compostos orgânicos com P (Frey, 2019; Lambers 2022; Wang et al., 2023).

A inoculação das plântulas de eucalipto com o FMA não promoveu o crescimento de parte aérea ou raízes em relação ao observado em plantas não inoculadas. Esta ausência de resposta à micorrização pode estar relacionada ao estágio das plantas que estavam em fase inicial de desenvolvimento, ainda com baixo número de folhas e um custo maior em termos de C para manter o fungo micorrízico, uma vez que parte significativa do C fixado pelas plantas é direcionada ao FMA (Olsson et al., 2010). No entanto, plantas micorrizadas apresentaram maior concentração e acúmulo de P e N na parte aérea e, no geral, maior PUpE do que plantas não micorrizadas (Figuras 15 e 16, Tabela 4).

Em geral, as diferenças de biomassa tanto radicular quanto de parte aérea (Figura 20) estão diretamente relacionadas ao suprimento de P da planta. Em plantas NM de *E. grandis* supridas com necromassa microbiana ou fosfato de ferro como únicas fontes de P, a produção de biomassa de raiz foi maior do que em plantas M (Figura 3). Alguns trabalhos indicam que plantas em simbiose com FMAs apresentam menor crescimento das raízes, uma vez que o micélio extrarradicular tem a capacidade de se expandir além da área de depleção da raiz e capturar nutrientes que são transportados através de suas hifas até a interface simbiótica na raiz (Cosme et al., 2018; O'Keefe & Sylvia 1991; Bruce et al., 1994). Não obstante, plantas NM de *E. grandis* que receberam fosfato de ferro e necromassa bacteriana também apresentaram menor biomassa de parte aérea que seus pares M. Alguns trabalhos apontam ocorrências em que a associação micorrízica arbuscular pode causar diminuição de crescimento das plantas hospedeiras (Smith et al., 2009) indicando que há uma variação de respostas nutricionais nos vegetais, que podem depender de fatores como a alocação de C dos hospedeiros para os fungos simbiotes.

6.1. Avaliação da eficácia das plantas em utilizar fontes orgânicas de P: impacto na nutrição fosfatada e interação com FMA

Em relação a capacidade das plantas utilizarem o P de fontes orgânicas, observamos que as plantas que receberam fitato como única fonte de P apresentaram os menores conteúdos e concentrações de P na parte aérea (Figuras 15 e 16), indicando a baixa capacidade das raízes de eucalipto em hidrolisar o fosfato contido na molécula de fitato (Osborne & Rengel, 2002; Hayes et al., 2000), apesar da

substancial expressão das atividades fitase e APase nas raízes quando as plantas foram expostas a esta fonte de P (Figuras 17 e 18). Assim, e como consequência dessa baixa capacidade de usar o P do fitato e em resposta à baixa concentração interna de P, houve indução da secreção de enzimas envolvidas na mineralização de P (Ojeda Riveira et al., 2022). Fica em aberto se a exposição das plantas ao fitato como única fonte de P induziu a exsudação de ácidos orgânicos de baixa massa molecular (Ojeda Riveira et al., 2022).

A quantidade acumulada de P absorvido pelas plantas cultivadas com fitato (Figuras 15 e 16), foi quase quatro vezes inferior às de plantas expostas com outras fontes de P. Plântulas de *E grandis* tiveram menor capacidade de utilizar o P do fitato do que plântulas de *E. globulus*, as quais conseguiram acumular maiores conteúdos de P, talvez relacionado também com o maior comprimento das raízes de *E. globulus* o que pode facilitar a absorção de P uma vez mineralizado (Pang et al., 2015; Schwerdtner et al., 2022). Em plântulas de *E. globulus* expostas ao fitato, a micorrização reduziu a produção de biomassa e aumentou a atividade de hidrólise de P, mas sem resultar em alteração dos conteúdos de P em relação ao observado em plantas NM (Figuras 2, 15, 16, 17 e 18). Contudo, existe uma relação entre a capacidade de utilizar fitato e a concentração disponível no meio, sendo que quanto maior a concentração do fitato como única fonte de P, maior o P utilizado da fonte e maior o ganho relativo de biomassa (Hayes et al., 2000). Desta forma, no nosso estudo a concentração de P na forma de fitato foi de 0,1 mM, o que comparativamente com o estudo de Hayes et al. (2000) pode ser considerada baixa, já que eles utilizaram concentrações dentre 0,5 mM e 6 mM de P-fitato, o que pode ter contribuído para a baixa utilização do P do fitato no nosso trabalho. Além da secreção de fitases a exsudação de ácidos orgânicos, como o citrato, pode contribuir na solubilização do P do fitato (Wouterlood et al., 2004; Steffens et al., 2010).

Sabe-se que devido a suas propriedades polianiónicas, conferidas pela presença das cargas negativas dos 6 grupos ortofosfato e os 12 prótons ionizáveis, o fitato tem forte afinidade a ser adsorvido a fases sólidas e formar quelatos com íons metálicos, que podem formar precipitados pouco solúveis (Liu et al., 2022). O fitato não se liga apenas às partículas minerais do solo, mas também se incorpora às estruturas da matéria orgânica via pontes de Fe/Al (Liu et al., 2022). Turner et al., (2003) relataram que hexafitatos são fortemente ligados à fase sólida do solo e a

adsorção de fitatos aumenta com o aumento dos parâmetros de adsorção de P em óxidos de Fe/Al e argila. Desta forma, o fitato adsorve-se a óxidos metálicos, argilominerais e matéria orgânica, com até 4 vezes maior afinidade que formas de P_i (Celi & Barberis, 2005).

No entanto, ainda há muitas inconsistências na literatura avaliando a eficácia das plantas quanto ao uso do fitato como fonte de P. Adams & Pate (1992) em um estudo utilizando fitato, RNA e glicerofosfato, com 0,5 mM de P, como fontes de P em *Lupinus* spp., apontaram que as plantas que receberam fitato cresceram tanto quanto as que receberam as outras fontes de P, indicando que a diferença na disponibilidade das diferentes fontes de P esteve relacionada à sua solubilidade no solo, e não somente à suscetibilidade às fosfatases.

No nosso trabalho plantas que receberam fitato tiveram parte aérea e sistema radicular menores que plantas que receberam as demais fontes de P (Figuras 2 e 3), o que provavelmente afetou a quantidade de micélio externo produzido pelo FMA inoculado (Figura 14) e a sua atividade mAPase (Figura 19).

Plantas expostas ao fosfato de ferro como única fonte de P tiveram a menor produção de biomassa após às expostas a fitato, mostrando também a recalcitrância do P desta fonte de baixa solubilidade. Em solos, as propriedades da superfície dos minerais de fosfato de ferro desempenham um papel crucial em sua recalcitrância. Geralmente essa molécula tem área superficial baixa e reatividade superficial limitada o que dificulta a interação entre este composto inorgânico e componentes da solução do solo ou da atividade radicular (Violante et al., 2010). De forma similar ao observado no caso do fitato, plântulas de *E. globulus* foram mais eficientes na utilização do P do fosfato de ferro do que plântulas de *E. grandis* (Figura 16), o que pode estar relacionado com o maior comprimento das raízes de *E. globulus* (Figura 4), que favorece a absorção de P mineralizado dessas fontes (Pang et al., 2015; Schwerdtner et al., 2022). Estes resultados indicam que as diferentes fontes de P influenciaram a nutrição fosfatada de acordo com suas suscetibilidades às enzimas fosfatases, o grau de solubilidade no substrato e a capacidade das plantas em produzirem um sistema radicular que potencialize o efeito de mineralização e solubilização de fontes de P.

Na PCA, os tratamentos de *E. grandis* com fitato e fosfato de ferro se agruparam no mesmo quadrante (Figura 21), provavelmente devido a resposta similar das plantas frente à dificuldade de utilizarem o P contido nessas duas fontes.

Entretanto, os tratamentos de *E. globulus* com fosfato de ferro e fitato se agruparam de forma mais próxima com tratamentos com outras fontes de P, como ATP e necromassa bacteriana, corroborando a capacidade dessa espécie utilizar o P de fontes menos solúveis e mais recalcitrantes (Figura 21).

Plantas que receberam fontes orgânicas de P com ligações fosfomono- e diéster, como glucose-6-P, ATP e RNA apresentaram acúmulo de biomassa semelhante e próximo das plantas que receberam a fonte solúvel de P_i (Figura 2). Além disso, plantas que receberam ATP e RNA apresentaram conteúdo de P semelhantes (Figura 16), o que é corroborado na PCA (Figura 21), onde tratamentos com estas duas fontes se agruparam juntas frequentemente nas duas espécies estudadas. Da mesma forma, o conteúdo de P de plantas irrigadas com glucose-6-fosfato e com fosfato de potássio foi semelhante (Figura 16), o que foi corroborado na PCA, onde estas duas fontes se agruparam juntas tanto nas duas espécies estudadas quanto em relação à micorrização (Figura 21). A capacidade de utilizar P da glucose-6-fosfato também foi observado em plantas de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) que apresentaram maiores conteúdos de P do que plantas que receberam P_i (Amann & Amberger, 1989). Utilizando glucose-6-fosfato como fonte de P, foi indicado uma alta hidrólise da molécula, ao qual foi atribuída ao aumento da atividade fosfatase ácida “solúvel” nos exsudatos radiculares de *F. esculentum* presentes na rizosfera (Amann & Amberger, 1989). Corroborando com nossos resultados, estudos indicam que compostos como glucose-6-P, ácidos nucleicos e até fosfolipídios têm maior propensão a serem mineralizados e utilizados do que moléculas de fitato (Park et al., 2022; Dalai, 1977; Hayes et al., 2000).

A atividade fitase em raízes micorrizadas de *E. globulus* irrigadas com fitato, ATP e glucose-6-P foi maior que a atividade apresentada em plantas micorrizadas com as demais fontes (Figura 17), o que pode indicar que estas fontes de P_o têm maior propensão a serem mineralizadas na presença de FMAs, uma vez que o composto orgânico em conjunto com o FMA pode representar uma forma de recrutar microrganismos com esta atividade enzimática (Frey, 2019; Zhang et al., 2018). Mesmo que o presente o experimento tenha sido realizado com substratos estéreis e que a irrigação das plantas, realizada com soluções nutritivas e água estéreis, as plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação e a superfície do substrato pode ter sido uma fonte de entrada de microrganismos para o substrato.

As sementes utilizadas foram desinfestadas superficialmente, com presença de possíveis microrganismos em tecidos internos ao tegumento, ainda, o inóculo de FMA utilizado pode ter contribuído também ao estabelecimento de uma microbiota no ambiente da raiz. Por estes motivos o sistema utilizado foi considerado de baixa carga microbiana e não realizado totalmente em condições estéreis. Portanto, algumas das respostas observadas podem estar relacionadas à presença de microrganismos na superfície da raiz com capacidade solubilizadora e mineralizadora das fontes de P. Contudo, a atividade de enzimas secretadas em raízes de plantas M e NM foi em vários casos similar sugerindo que não houve contribuição significativa de possíveis microrganismos adicionados junto ao inóculo de FMA na capacidade de plantas usarem o P de fontes orgânicas.

Plantas de *E. globulus* supridas com necromassa bacteriana como fonte de P produziram maior biomassa, além de apresentarem maior PUE que plantas que receberam as demais fontes de P_o (Figuras 2 e 3, Tabela 5); e em ambas as espécies esta fonte de P resultou em raízes com maior intensidade de colonização micorrízica e maior comprimento do micélio externo de FMA, com maior atividade mAPase (Figuras 12, 14 e 19).

As necro- e biomassa microbianas presentes na rizosfera e no solo têm grande influência na ciclagem de nutrientes e na formação da matéria orgânica do solo, pois representam estágios intermediários de imobilização C, P, S e N e de energia retida antes de sua mineralização (Kästner et al., 2021). Ou seja, a necromassa bacteriana além de fornecer potencialmente P, pode fornecer outros nutrientes como N e micronutrientes, que podem ter contribuído com a nutrição da planta e com elementos essenciais ao FMA, como o Na, por exemplo, que se mostrou numa quantidade relativamente alta na necromassa bacteriana utilizada no presente estudo (Tabela 1) (Garcia et al., 2016). Além disso, a necromassa bacteriana pode ter sido fonte de C hidrolisável, estimulando o crescimento de microrganismos heterotróficos. Recentemente foi descrito um co-transportador de alta afinidade de Na⁺/P_i em FMAs, o RiPT5, que além de permitir a absorção de P_i em uma ampla faixa de pH do solo, podem exibir uma correlação positiva com a aquisição micorrízica de P_i (Garcia et al., 2016; Wipf et al., 2019). Desta forma, a alta quantidade de Na presente na necromassa bacteriana pode ter resultado na maior expressão dos genes

que codificam para este transportador, promovendo a absorção de P nas plantas M supridas com esta fonte de P.

Os FMAs são organismos biotróficos obrigatórios, que utilizam o C fixado pela planta na forma de ácidos graxos e de hexoses como fonte de C para construção da sua própria biomassa e como fonte de energia para seus processos metabólicos. É observado que há uma relação positivamente proporcional entre o crescimento do micélio do FMA e a quantidade de matéria orgânica presente no substrato (Ravnskov et al., 1999; Joner & Jakobsen 1995; Hodge et al., 2001). Um estudo apontou que a necromassa da levedura *Sacharomyces cerevisiae* aumentou o crescimento do micélio externo de *Glomus intraradices* (Ravnskov et al., 1999). Não obstante, Joner & Jakobsen (1995) observaram que a densidade do micélio de FMA foi duas vezes maior em solo com maior conteúdo de matéria orgânica do que em solos com menor conteúdo de matéria orgânica. Da mesma forma, no presente estudo observamos maior crescimento do micélio do FMA em substratos irrigados com necromassa bacteriana (Figura 14).

As hifas de FMA possuem capacidade de fornecer N para as plantas hospedeiras, uma vez que possuem transportadores para diferentes formas de N (Leigh et al., 2008). No presente estudo, plantas M apresentaram no geral maiores conteúdos de N, principalmente quando supridas com necromassa bacteriana como única fonte de P (Tabela 6). Com isso, outra possibilidade para o maior crescimento do micélio externo do FMA em plantas supridas com necromassa bacteriana está relacionada à maior disponibilidade de N nesta fonte, que pode se apresentar tanto em formas orgânicas quanto inorgânicas. As hifas de FMAs carecem de exoenzimas capazes de acessar diretamente formas orgânicas de N ou de outros nutrientes, no entanto, é observado que a interrelação das hifas com seu microbioma está envolvida na utilização de formas orgânicas de N pelo fungo (Rozmoš et al., 2022; Bucking & Kafle, 2015; Hodge et al., 2001).

A maior atividade fosfatase no micélio externo de plantas supridas com necromassa bacteriana pode estar relacionada à maior extensão do micélio externo produzido nesse tratamento, corroborado pela correlação positiva e significativa entre estas duas variáveis ($r = 0,95$ $p < 0,001$, Figura 20.a). A maior atividade rAPase pode também estar relacionada à maior disponibilidade de N para síntese de enzimas, o que pode ser observado nas proporções de maior atividade rAPase em plantas

expostas à necromassa bacteriana, que por sua vez, tiveram maior conteúdo de N (Tabela 7, Figura 18). Além disso, a necromassa bacteriana pode ter influenciado no crescimento de microrganismos associados ao fungo capazes de contribuir com a mineralização de compostos orgânicos e estimular o crescimento e atividade do micélio, podendo resultar no incremento da capacidade de fornecer mais P à planta (Sangwan & Prasanna, 2022; Frey, 2019).

6.3. Conclusão

Os resultados obtidos apontam que: (1) espécies de eucaliptos diferem na sua capacidade de utilizar fontes orgânica e pouco solúveis de P, e isto está associado com a atividade das enzimas secretadas pela raiz; (2) plântulas da espécie *E. globulus* se mostraram mais eficientes no uso de P proveniente de diferentes fontes do que plântulas de *E. grandis* e isso se reflete na maior capacidade de *E. globulus* em utilizar P de fontes mais recalcitrantes ou menos solúveis; (3) compostos orgânicos de P podem ter um bom potencial em suprir a necessidade nutricional de P de plantas de eucalipto, dependendo da sua susceptibilidade a mineralização pelas enzimas fosfatases secretadas tanto pelas raízes quanto a devida à atividade de hifas do FMA; (4) o FMA contribui de forma importante na aquisição de P de fontes orgânicas pelas plantas de eucalipto associadas, conferindo maior PUpE da planta; (5) as diferentes fontes de P utilizadas neste experimento supriram em diferentes graus a demanda de P das plantas, sendo o fitato e fosfato de ferro as fontes de P mais recalcitrantes e indisponíveis para as plantas, enquanto glucose-6-P, fosfato de potássio e até mesmo RNA e ATP as fontes que melhor forneceram P para as plantas de eucalipto; (6) a necromassa bacteriana pode fornecer elementos como N, P e C influenciando a atividade das hifas fúngicas e, possivelmente, de microrganismos associados ao micélio, contribuindo positivamente com a mAPase e o crescimento do micélio do FMA associados às plantas de eucalipto; (7) a necromassa bacteriana pode contribuir no aumento do conteúdo de N das plantas supridas com esta fonte de P, o que pode levar também ao aumento da atividade APase das raízes.

Para contribuir no entendimento de processos que levam a maior nutrição de P em plantas de eucalipto, podem ser feitos estudos que avaliem os genes que codificam fosfatases nestas plantas, bem como estudos que investiguem a nível

molecular a capacidade do micélio de FMA e microrganismos associados em utilizar nutrientes disponibilizados pela necromassa bacteriana e como esta influencia o desenvolvimento do microecossistema rizosférico.

Apesar deste experimento ter sido conduzido em casa de vegetação e com areia de quartzo como substrato, aqui demonstramos fenômenos possíveis em ambientes naturais como florestas ou plantações de eucalipto, que podem ser de grande importância para uma melhor produção agrícola de um grupo vegetal de relevante interesse comercial.

REFERÊNCIAS

- Abbott, L. K., Robson, A. D. & De Boer, G. (1984). The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhiza fungus *Glomus fasciculatum*. *New Phytologist*, 97(3), 437–446. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.1984.TB03609.X>
- Ait Lahmidi, N., Courty, P. E., Brulé, D., Chatagnier, O., Arnould, C., Doidy, J., Berta, G., Lingua, G., Wipf, D. & Bonneau, L. (2016). Sugar exchanges in arbuscular mycorrhiza: RiMST5 and RiMST6, two novel *Rhizophagus irregularis* monosaccharide transporters, are involved in both sugar uptake from the soil and from the plant partner. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 107, 354–363. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2016.06.023>
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 971. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00971/BIBTEX>
- Amann, C., & Amberger, A. (1989). Phosphorus efficiency of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, 152(2), 181–189. <https://doi.org/10.1002/JPLN.19891520208>
- Anderson, G. (1964) Investigations on the analysis of inositol hexa-phosphate in soils. In *8th International Congress of Soil Science*. Vol. 4. pp. 563–572, Bucharest, Romania.
- Anderson, G. (2015). Assessing organic phosphorus in soils. *ASA, CSSA, and SSSA Books*, 411–431. doi:10.2134/1980.roleofphosphorus.c16
- Annaheim, K. E., Doolette, A. L., Smernik, R. J., Mayer, J., Oberson, A., Frossard, E. & Bünemann, E. K. (2015). Long-term addition of organic fertilizers has little effect on soil organic phosphorus as characterized by ³¹P NMR spectroscopy and enzyme additions. *Geoderma*, 257–258, 67–77. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2015.01.014>
- Anderson, G., Williams, E. G. & Moir, J. O. (1974). A comparison of the sorption of inorganic orthophosphate and inositol hexaphosphate by six acid soils. *Journal*

of *Soil Science*, 25(1), 51–62. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2389.1974.TB01102.X>

- Anderson G. 1964. Investigations on the analysis of inositol hexa- phosphate in soils. In *8th International Congress of Soil Science*. Vol. 4. pp. 563–572, Bucharest, Romania.
- Andrade, S. A., López, Borghi, A. A., De Oliveira, V. H., De Moraes Gouveia, L., Paula, A., Martins, I. & Mazzafera, P. (2022). Phosphorus shortage induces an increase in root exudation in fifteen eucalypts species. *Agronomy* 2022, Vol. 12, Page 2041, 12(9), 2041. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12092041>
- Andreote, F. D., Gumiére, T. & Durrer, A. (2014). Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola*, 71(6), 528–539. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0195>
- Ao, G., Feng, J., Han, M., Wang, X., Tang, M., Ma, S. & Zhu, B. (2022). Responses of root and soil phosphatase activity to nutrient addition differ between primary and secondary tropical montane forests. *Rhizosphere*, 24, 100610.
- Babu-Khan, S., Tiong Chia Yeo, Martin, W. L., Duron, M. R., Rogers, R. D. & Goldstein, A. H. (1995). Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 972. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.3.972-978.1995>
- Baetz, U., & Martinoia, E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, 19(2), 90–98. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2013.11.006>
- Baker, A., Ceasar, S. A., Palmer, A. J., Paterson, J. B., Qi, W., Muench, S. P. & Baldwin, S. A. (2015). Replace, reuse, recycle: improving the sustainable use of phosphorus by plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(12), 3523–3540. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERV210>
- Balergue, C., Dartevelle, T., Godon, C., Laugier, E., Meisrimler, C., Teulon, J. M., Creff, A., Bissler, M., Brouchoud, C., Hagège, A., Müller, J., Chiarenza, S., Javot, H., Becuwe-Linka, N., David, P., Péret, B., Delannoy, E., Thibaud, M. C., Armengaud, J. & Desnos, T. (2017). Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to

rapidly inhibit root cell elongation. *Nature Communications*, 8.
<https://doi.org/10.1038/NCOMMS15300>

Barceló, J. & Poschenrieder, C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48(1), 75–92.
[https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00013-8)

Bariola, P. A., MacIntosh, G. C. & Green, P. J. (1999). Regulation of S-like ribonuclease levels in Arabidopsis. Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. *Plant Physiology*, 119(1), 331–342.
<https://doi.org/10.1104/PP.119.1.331>

Barrow, N. J. (2017). The effects of pH on phosphate uptake from the soil. *Plant and Soil*, 410(1–2), 401–410. <https://doi.org/10.1007/S11104-016-3008-9/FIGURES/10>

Bashan, Y., Kamnev, A. A. & de-Bashan, L. E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and fertility of soils*, 49(4), 465-479.

Baveye, P. C., Baveye, J. & Gowdy, J. (2016). Soil “ecosystem” services and natural capital: Critical appraisal of research on uncertain ground. *Frontiers in Environmental Science*, 4(JUN), 41.
<https://doi.org/10.3389/FENVS.2016.00041/BIBTEX>

Beardsley, T. M. (2011). Peak phosphorus. *BioScience*, 61(2), 91–91.
<https://doi.org/10.1525/BIO.2011.61.2.1>

Beacham, I. R. (1979). Periplasmic enzymes in gram-negative bacteria. *The International Journal of Biochemistry*, 10(11), 877–883.
[https://doi.org/10.1016/0020-711X\(79\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0020-711X(79)90117-4)

Bhalla, K., Qu, X., Kretschmer, M., & Kronstad, J. W. (2022). The phosphate language of fungi. *Trends in Microbiology*, 30(4), 338-349.

Bhat, K. K. S. & Nye, P. H. (1974). Diffusion of phosphate to plant roots in soil: III.

Depletion around onion roots without root hairs. *Plant and Soil*, 41, 383-394.

- Bhatt, M. K., Labanya, R. & Joshi, H. C. (2019). Influence of long-term chemical fertilizers and organic manures on soil fertility - a review. *Universal Journal of Agricultural Research*, 7(5), 177–188. <https://doi.org/10.13189/UJAR.2019.070502>
- Bichara, S., Mazzafera, P., & de Andrade, S. A. L. (2021). Root morphological changes in response to low phosphorus concentration in eucalypt species. *Trees-structure and function*, 35(6), 1933–1943. <https://doi.org/10.1007/S00468-021-02161-4>
- Blindauer, C. A., & Schmid, R. (2010). Cytosolic metal handling in plants: determinants for zinc specificity in metal transporters and metallothioneins. *Metallomics*, 2(8), 510–529. <https://doi.org/10.1039/C004880A>
- Bravo, A., York, T., Pumplun, N., Mueller, L. A., & Harrison, M. J. (2016). Genes conserved for arbuscular mycorrhizal symbiosis identified through phylogenomics. *Nature Plants*, 2(2). <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2015.208>
- Breullin, F., Schramm, J., Hajirezaei, M., Ahkami, A., Favre, P., Druège, U., Hause, B., Bucher, M., Kretschmar, T., Bossolini, E., Kuhlmeier, C., Martinoia, E., Franken, P., Scholz, U., & Reinhardt, D. (2010). Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant Journal*, 64(6), 1002–1017. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2010.04385.X>
- Bruce, A., Smith, S. E. and Tester, M. (1994), The development of mycorrhizal infection in cucumber: effects of P supply on root growth, formation of entry points and growth of infection units. *New Phytologist*, 127: 507-514. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb03968.x>
- Brundrett, M. C. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79(3), 473–495. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006316>
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1108–1115. <https://doi.org/10.1111/NPH.14976>

- Bucher, M. (2007). Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*, 173(1), 11–26. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2006.01935.X>
- Bulgarelli, R. G., de Oliveira Silva, F. M., Bichara, S., Andrade, S. A. L., & Mazzafera, P. (2019). Eucalypts and low phosphorus availability: between responsiveness and efficiency. *Plant and Soil*, 445(1–2), 349–368. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04316-2>
- Bunn, R.A., Simpson, D.T., Bullington, L.S. *et al.* Revisiting the ‘direct mineral cycling’ hypothesis: arbuscular mycorrhizal fungi colonize leaf litter, but why?. *ISME J* 13, 1891–1898 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0403-2>
- Camps, C., Jardinaud, M. F., Rengel, D., Carrère, S., Hervé, C., Debellé, F., Gamas, P., Bensmihen, S., & Gough, C. (2015). Combined genetic and transcriptomic analysis reveals three major signalling pathways activated by Myc-LCOs in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 208(1), 224–240. <https://doi.org/10.1111/NPH.13427>
- Celi, L., & Barberis, E. (2005). Abiotic stabilization of organic phosphorus in the environment. *Organic phosphorus in the environment*, 113-132.
- Chen, J., Liu, Y., Ni, J., Wang, Y., Bai, Y., Shi, J., Gan, J., Wu, Z., & Wu, P. (2011). OsPHF1 regulates the plasma membrane localization of low- and high-affinity inorganic phosphate transporters and determines inorganic phosphate uptake and translocation in rice. *Plant Physiology*, 157(1), 269–278. <https://doi.org/10.1104/PP.111.181669>
- Chiu, C. H., & Paszkowski, U. (2019). Mechanisms and impact of symbiotic phosphate acquisition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(6). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A034603>
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quarto levantamento, julho de 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 18 mar. 2023.
- Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Havens, K. E., Lancelot, C., & Likens, G. E. (2009). Controlling eutrophication: nitrogen

and phosphorus. *Science*, 323(5917), 1014–1015.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1167755>

- Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292-305.
- Dalai, R. C. (1977). Soil organic phosphorus. *Advances in agronomy*, 29, 83-117.
- Darch, T., Blackwell, M. S. A., Hawkins, J. M. B., Haygarth, P. M., & Chadwick, D. (2014). A meta-analysis of organic and inorganic phosphorus in organic fertilizers, soils, and water: implications for water quality. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44(19), 2172–2202.
<https://doi.org/10.1080/10643389.2013.790752>
- Das, D., Paries, M., Hobecker, K., Gigl, M., Dawid, C., Lam, H.-M., Zhang, J., Chen, M., & Gutjahr, C. (2022). PHOSPHATE STARVATION RESPONSE transcription factors enable arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Nature Communications*.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-27976-8>
- da Silveira, A. P. D., & Cardoso, E. J. B. N. (2004). Arbuscular mycorrhiza and kinetic parameters of phosphorus absorption by bean plants. *Scientia Agricola*, 61(2), 203–209. <https://doi.org/10.1590/S0103-901620040002000137>
- de Vries, J., Evers, J. B., Kuyper, T. W., van Ruijven, J., & Mommer, L. (2021). Mycorrhizal associations change root functionality: a 3D modelling study on competitive interactions between plants for light and nutrients. *New Phytologist*, 231(3), 1171–1182. <https://doi.org/10.1111/NPH.17435>
- Di Tomassi, I., Chatterjee, N., Barrios-Masias, F. H., Zhou, Q., Gu, C., & Margenot, A. J. (2021). Arbuscular mycorrhizae increase biomass and nutrient uptake of tomato fertilized with struvite compared to monoammonium phosphate. *Plant and Soil*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04957-2>
- Dickson, S. (2004). The Arum–Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 163(1), 187–200. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2004.01095.X>
- Djodjic, F., Börling, K., & Bergström, L. (2004). Phosphorus leaching in relation to soil type and soil phosphorus content. *Journal of Environmental Quality*, 33(2), 678–

684. <https://doi.org/10.2134/JEQ2004.6780>

- Duan, S., Declerck, S., Feng, G., & Zhang, L. (2023). Hyphosphere interactions between *Rhizophagus irregularis* and *Rahnella aquatilis* promote carbon-phosphorus exchange at the peri-arbuscular space in *Medicago truncatula*. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16333>
- Dunlop J, Bowling DJF. 1978. Uptake of phosphate by white clover. II. The effect of pH on the electrogenic phosphate pump. *J. Exp. Bot.* 29:1147–53
- Evert, R. F., Eichhorn, S. E., & Raven, P. H. (2013). *Raven Biology of plants* (8th ed.).
- Ezawa, T., & Saito, K. (2018). How do arbuscular mycorrhizal fungi handle phosphate? New insight into fine-tuning of phosphate metabolism. *New Phytologist*, 220(4), 1116–1121. <https://doi.org/10.1111/NPH.15187>
- Feng, G., Song, Y. C., Li, X. L., & Christie, P. (2003). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to utilization of organic sources of phosphorus by red clover in a calcareous soil. *Applied Soil Ecology*, 22(2), 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00133-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00133-6)
- Freschet, G. T., Roumet, C., Comas, L. H., Weemstra, M., Bengough, A. G., Rewald, B., Bardgett, R. D., De Deyn, G. B., Johnson, D., Klimešová, J., Lukac, M., McCormack, M. L., Meier, I. C., Pagès, L., Poorter, H., Prieto, I., Wurzbürger, N., Zadworny, M., Bagniewska-Zadworna, A., & Stokes, A. (2021). Root traits as drivers of plant and ecosystem functioning: current understanding, pitfalls and future research needs. *The New Phytologist*, 232(3), 1123–1158. <https://doi.org/10.1111/NPH.17072>
- Frey, S. D. (2019). Mycorrhizal fungi as mediators of soil organic matter dynamics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 50, 237–259. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ECOLSYS-110617-062331>
- Ganeteg, U., Ahmad, I., Jämtgård, S., Aguetoni-Cambui, C., Inselsbacher, E., Svennerstam, H., Schmidt, S., & Näsholm, T. (2017). Amino acid transporter mutants of *Arabidopsis* provides evidence that a non-mycorrhizal plant acquires organic nitrogen from agricultural soil. *Plant, Cell & Environment*, 40(3), 413–423. <https://doi.org/10.1111/PCE.12881>

- Garcia, K., Doidy, J., Zimmermann, S. D., Wipf, D., & Courty, P.-E. (2016). Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends in Plant Science*, *21*(11), 937–950. doi:10.1016/j.tplants.2016.07.010
- George, T. S., Gregory, P. J., Hocking, P., & Richardson, A. E. (2008). Variation in root-associated phosphatase activities in wheat contributes to the utilization of organic P substrates in vitro, but does not explain differences in the P-nutrition of plants when grown in soils. *Environmental and Experimental Botany*, *64*(3), 239–249. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2008.05.002>
- Gerloff, G. C. (1977). "Plant efficiencies in the use of N, P and K," in *Plant Adaptation to Mineral Stress in Problem Soils*, ed M. J. Wright (New York, NY: Cornell University Press), 161–174.
- Ghahremani, M., Plaxton, W.C. (2020). Phosphoprotein Phosphatase Function of Secreted Purple Acid Phosphatases. In: Pandey, G.K. (eds) *Protein Phosphatases and Stress Management in Plants*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48733-1_2
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M. N., van Tuinen, D., Redecker, D., & Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, *20*(8), 519–530. <https://doi.org/10.1007/S00572-010-0333-3>
- Giles, C. D., George, T. S., Brown, L. K., Mezeli, M. M., Richardson, A. E., Shand, C. A., Wendler, R., Darch, T., Menezes-Blackburn, D., Cooper, P., Stutter, M. I., Lumsdon, D. G., Blackwell, M. S. A., Wearing, C., Zhang, H., & Haygarth, P. M. (2017). Does the combination of citrate and phytase exudation in *Nicotiana tabacum* promote the acquisition of endogenous soil organic phosphorus? *Plant and Soil*, *412*(1–2), 43–59. <https://doi.org/10.1007/S11104-016-2884-3>
- Goebel, M. O., Adams, F., Boy, J., Guggenberger, G., & Mikutta, R. (2017). Mobilization of glucose-6-phosphate from ferrihydrite by ligand-promoted dissolution is higher than of orthophosphate. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *180*(3), 279–282. <https://doi.org/10.1002/JPLN.201600479>

- Goldstein, A. H., & Krishnaraj, P. U. (2007). Phosphate solubilizing microorganisms vs. phosphate mobilizing microorganisms: what separates a phenotype from a trait? *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, 203–213. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_31
- Goldstein, A. H., & Liu, S. T. (1987). Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Bio/Technology* 1987 5:1, 5(1), 72–74. <https://doi.org/10.1038/nbt0187-72>
- Golovan, S., Wang, G., Zhang, J., & Forsberg, C. W. (2000). Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(1), 59–71. <https://doi.org/10.1139/CJM-46-1-59>
- González-Muñoz, E., Avendaño, A. O. V., Chávez Montes, R. A., de Folter, S., Andrés-Hernández, L., Abreu-Goodger, C., & Sawers, R. J. H. (2015). The maize (*Zea mays* ssp. *mays* var. B73) genome encodes 33 members of the purple acid phosphatase family. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.00341/ABSTRACT>
- Gratz, R., Ahmad, I., Svennerstam, H., Jämtgård, S., Love, J., Holmlund, M., Ivanov, R., & Ganeteg, U. (2021). Organic nitrogen nutrition: LHT1.2 protein from hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *tremuloides* Michx) is a functional amino acid transporter and a homolog of *Arabidopsis* LHT1. *Tree Physiology*, 41(8), 1479–1496. <https://doi.org/10.1093/TREEPHYS/TPAB029>
- Greenfield, L.M., Hill, P.W., Paterson, E. et al. Do plants use root-derived proteases to promote the uptake of soil organic nitrogen?. *Plant Soil* 456, 355–367 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04719-6>
- Gruber, B. D., Giehl, R. F. H., Friedel, S., & von Wirén, N. (2013). Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiology*, 163(1), 161–179. <https://doi.org/10.1104/PP.113.218453>
- Guilbeault-Mayers, X., Turner, B. L., & Laliberté, E. (2020). Greater root phosphatase activity of tropical trees at low phosphorus despite strong variation among species. *Ecology* 101(8):e03090. [10.1002/ecy.3090](https://doi.org/10.1002/ecy.3090)

- Gutjahr, C., & Parniske, M. (2013). Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *29*, 593–617. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-101512-122413>
- Ham, B. K., Chen, J., Yan, Y., & Lucas, W. J. (2018). Insights into plant phosphate sensing and signaling. *Current Opinion in Biotechnology*, *49*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2017.07.005>
- Hammond, J. P., & White, P. J. (2011). Sugar signaling in root responses to low phosphorus availability. *Plant Physiology*, *156*(3), 1033–1040. <https://doi.org/10.1104/PP.111.175380>
- Hanyabui, E., Apori, S. O., Frimpong, K. A., Atiah, K., Abindaw, T., Ali, M., Asiamah, J. Y., & Byalebeka, J. (2020). Phosphorus sorption in tropical soils. *AIMS Agriculture and Food*, *5*(4), 599–616. <https://doi.org/10.3934/AGRFOOD.2020.4.599>
- Harris, J. M., & Dickstein, R. (2010). Control of root architecture and nodulation by the LATD/NIP transporter. *Plant signaling & behavior*, *5*(11), 1365-1369.
- Harrison, M. J. (1993). Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *6*(5), 643. <https://doi.org/10.1094/MPMI-6-643>
- Hayes, J. E., Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (1999). Phytase and acid phosphatase activities in extracts from roots of temperate pasture grass and legume seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology*, *26*(8), 801–809. <https://doi.org/10.1071/PP99065>
- Hayes, J. E., Simpson, R. J., & Richardson, A. E. (2000). The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. In *Plant and Soil* (Vol. 220).
- Hedin, L. O., Vitousek, P. M., & Matson, P. A. (2003). Nutrient losses over four million years of tropical forest development. *Ecology*, *84*(9), 2231-2255.
- Hermans, C., Hammond, J. P., White, P. J., & Verbruggen, N. (2006). How do plants

- respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science*, 11(12), 610–617. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2006.10.007>
- Hesterberg, D. (2010). Macroscale chemical properties and x-ray absorption spectroscopy of soil phosphorus. *Developments in Soil Science*, 34, 313–356. [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(10\)34011-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(10)34011-6)
- Hurry, V., Strand, Å., Furbank, R., & Stitt, M. (2000). The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 24(3), 383–396. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2000.00888.X>
- Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., & Borriss, R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 7), 2097–2109. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2097>
- Inselsbacher, E., & Näsholm, T. (2012). The below-ground perspective of forest plants: soil provides mainly organic nitrogen for plants and mycorrhizal fungi. *The New Phytologist*, 195(2), 329–334. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2012.04169.X>
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1617. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.01617/BIBTEX>
- Jahanian, A., Chaichi, M., Rezaei, K., Rezayazdi, K., & Khavazi, K. (2012). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination and primary growth of artichoke (*Cynara scolymus*). *Int J Agric Crop Sci*, 4, 923–929.
- Jeewani, P. H., Luo, Y., Yu, G., Fu, Y., He, X., Van Zwieten, L., Liang, C., Kumar, A., He, Y., Kuzyakov, Y., Qin, H., Guggenberger, G., & Xu, J. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi and goethite promote carbon sequestration via hyphal-aggregate mineral interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 162. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2021.108417>

- Jia, H., Ren, H., Gu, M., Zhao, J., Sun, S., Zhang, X., Chen, J., Wu, P., & Xu, G. (2011). The phosphate transporter gene *OsPht1;8* is involved in phosphate homeostasis in rice. *Plant Physiology*, 156(3), 1164–1175. <https://doi.org/10.1104/PP.111.175240>
- Jiang, Y., Wang, W., Xie, Q., Liu, N., Liu, L., Wang, D., Zhang, X., Yang, C., Chen, X., Tang, D., & Wang, E. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6343), 1172–1173. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAM9970>
- Joergensen, R.G. Phospholipid fatty acids in soil—drawbacks and future prospects. *Biol Fertil Soils* 58, 1–6 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00374-021-01613-w>
- Joner, E. J., & Jakobsen, I. (1995). Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(9), 1153–1159. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00047-I](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00047-I)
- Joner, E. J., & Johansen, A. (2000). Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 104(1), 81–86. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001240>
- Joner, E. J., Magid, J., Gahoonia, T. S., & Jakobsen, I. (1995). P depletion and activity of phosphatases in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal cucumber (*cucumis sativus* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, 27(9), 1145–1151. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00046-H](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00046-H)
- Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Marschner, P., Greiner, R., Fernández, M. T., Fernández, F., Romero, D., Menezes-Blackburn, D., De La, M., & Mora, L. (2011). Identification of β -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(1), 163–172. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2010.00995.X>
- Jost, W., Bak, H., Konrad, G., Terpstra, P., & Beintema, J. J. (1991). Amino acid sequence of an extracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from

cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *European Journal of Biochemistry*, 198(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1991.TB15978.X>

- Júnior, J. E. P., & Silveira, R. A. (2021). A introdução do eucalipto no Brasil pela Embrapa: bases institucionais e sua estruturação para a pesquisa com eucaliptos e corímbias. In E. B. de Oliveira & J. E. P. Junior (Eds.), *O eucalipto e a Embrapa: quatro décadas de pesquisa e desenvolvimento* (1st ed., pp. 33–112). Embrapa.
- Kaiser, C., Kilburn, M. R., Clode, P. L., Fuchslueger, L., Koranda, M., Cliff, J. B., Solaiman, Z. M., & Murphy, D. V. (2015). Exploring the transfer of recent plant photosynthates to soil microbes: mycorrhizal pathway vs direct root exudation. *The New Phytologist*, 205(4), 1537–1551. <https://doi.org/10.1111/NPH.13138>
- Kamerlin, S. C. L., Sharma, P. K., Prasad, R. B., & Warshel, A. (2013). Why nature really chose phosphate. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 46(1), 1–132. <https://doi.org/10.1017/S0033583512000157>
- Kästner, M., Miltner, A., Thiele-Bruhn, S., & Liang, C. (2021). Microbial necromass in soils—linking microbes to soil processes and carbon turnover. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 597. <https://doi.org/10.3389/FENVS.2021.756378/BIBTEX>
- Kavka, M., Majcherczyk, A., Kües, U., & Polle, A. (2021). Phylogeny, tissue-specific expression, and activities of root-secreted purple acid phosphatases for P uptake from ATP in P starved poplar. *Plant Science*, 307, 110906. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2021.110906>
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., & Apajalahti, J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2079–2085. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2079-2085.1998>
- Kidd, P. S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunsé, B., & Barceló, J. (2001). The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays L.*). *Journal of Experimental Botany*, 52(359), 1339–1352.

<https://doi.org/10.1093/JEXBOT/52.359.1339>

- Kim, K. Y., McDonald, G. A., & Jordan, D. (1997). Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*, 24(4), 347–352. <https://doi.org/10.1007/S003740050256/METRICS>
- Kim, Y.O., Lee, J.K., Kim, H.K., Yu, J.H., & Oh, T.K. (1998). Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus sp.* DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 162(1), 185–191. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1998.TB12997.X>
- Kirui, C. K., Njeru, E. M., & Runo, S. (2022). Diversity and phosphate solubilization efficiency of phosphate solubilizing bacteria isolated from semi-arid agroecosystems of eastern Kenya. *Microbiology Insights*, 15, 11786361221088991.
- Kloppholz, S., Kuhn, H., & Requena, N. (2011). A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology: CB*, 21(14), 1204–1209. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2011.06.044>
- Koide, R. T., & Kabir, Z. (2000). Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist*, 148(3), 511–517. <https://doi.org/10.1046/J.1469-8137.2000.00776.X>
- Kononova, S. V., & Nesmeyanova, M. A. (2002). Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry (Moscow)*, 67, 184-195.
- Kretschmar, T., Kohlen, W., Sasse, J., Borghi, L., Schlegel, M., Bachelier, J. B., Reinhardt, D., Bours, R., Bouwmeester, H. J., & Martinoia, E. (2012). A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature*, 483(7389), 341–344. <https://doi.org/10.1038/NATURE10873>
- Krishnaraj, P. U., & Goldstein, A. H. (2001). Cloning of a *Serratia marcescens* DNA fragment that induces quinoprotein glucose dehydrogenase-mediated gluconic acid production in *Escherichia coli* in the presence of stationary phase *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiology Letters*, 205(2), 215–220. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2001.TB10950.X>

- Kuo, S., Mahler, R. L., & Chien, S. H. (2015). Factors influencing microbial phytase activity in soil. *Soil Science Society of America Journal*, *79*(3), 717-727.
- Kuyper, T. W., Wang, X., & Muchane, M. N. (2021). The interplay between roots and arbuscular mycorrhizal fungi influencing water and nutrient acquisition and use efficiency. *The Root Systems in Sustainable Agricultural Intensification*, 193–220. <https://doi.org/10.1002/9781119525417.CH7>
- Lagrange, H., Jay-Allmand, C., & Lapeyrie, F. (2001). Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist*, *149*(2), 349–355. <https://doi.org/10.1046/J.1469-8137.2001.00027.X>
- Lambers, H. (2022). Phosphorus acquisition and utilization in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *73*, 17–42. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-102720-125738>
- Lambers, H., Martinoia, E., & Renton, M. (2015). Plant adaptations to severely phosphorus-impooverished soils. *Current Opinion in Plant Biology*, *25*, 23–31. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2015.04.002>
- Lambers, H., Raven, J. A., Shaver, G. R., & Smith, S. E. (2008). Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology & Evolution*, *23*(2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2007.10.008>
- Lambers, H., Wright, I. J., Guilherme Pereira, C., Bellingham, P. J., Bentley, L. P., Boonman, A., Cernusak, L. A., Foulds, W., Gleason, S. M., Gray, E. F., Hayes, P. E., Kooyman, R. M., Malhi, Y., Richardson, S. J., Shane, M. W., Staudinger, C., Stock, W. D., Swarts, N. D., Turner, B. L., & Xu, Y. (2021). Leaf manganese concentrations as a tool to assess belowground plant functioning in phosphorus-impooverished environments. *Plant and Soil*, *461*(1–2), 43–61. <https://doi.org/10.1007/S11104-020-04690-2>
- Lapis-Gaza, H. R., Jost, R., & Finnegan, P. M. (2014). *Arabidopsis* PHOSPHATE TRANSPORTER1 genes *PHT1;8* and *PHT1;9* are involved in root-to-shoot translocation of orthophosphate. *BMC Plant Biology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/S12870-014-0334-Z>

- Lee, Y. H., & Tegeder, M. (2004). Selective expression of a novel high-affinity transport system for acidic and neutral amino acids in the tapetum cells of Arabidopsis flowers. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *40*(1), 60–74. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2004.02186.X>
- Lewis, D. G., & Quirk, J. P. (1967). Phosphate diffusion in soil and uptake by plants. *Plant and Soil*, *26*(1), 99–118. <https://doi.org/10.1007/BF01978678>
- Li, J., Zhang, X., Luo, J., Lindsey, S., Zhou, F., Xie, H., Li, Y., Zhu, P., Wang, L., Shi, Y., He, H., & Zhang, X. (2020). Differential accumulation of microbial necromass and plant lignin in synthetic versus organic fertilizer-amended soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *149*, 107967. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2020.107967>
- Liang, Chao, Kästner, M., & Joergensen, R. G. (2020). Microbial necromass on the rise: the growing focus on its role in soil organic matter development. *Soil Biology and Biochemistry*, *150*, 108000. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2020.108000>
- Liang, Cuiyue, Tian, J., Lam, H. M., Lim, B. L., Yan, X., & Liao, H. (2010). Biochemical and molecular characterization of *PvPAP3*, a novel purple acid phosphatase isolated from common bean enhancing extracellular ATP utilization. *Plant Physiology*, *152*(2), 854–865. <https://doi.org/10.1104/PP.109.147918>
- Liu, J., Uhde-Stone, C., Li, A., Vance, C., & Allan, D. (2001). A phosphate transporter with enhanced expression in proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and Soil* *2001 237:2*, *237*(2), 257–266. <https://doi.org/10.1023/A:1013396825577>
- Liu, X., Han, R., Cao, Y., Turner, B. L., & Ma, L. Q. (2022). Enhancing phytate availability in soils and phytate-p acquisition by plants: A review. *Environmental Science & Technology*, *56*(13), 9196-9219.
- Li, Y., Li, H., Li, J., Wang, Y., Zhang, X., & Yang, X. (2020). Plant growth promotion and nutrient acquisition in low phosphorus soil by a phytase-producing strain of *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, *128*(1), 129-140.
- López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, L. (2014). Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Annual Review of Plant Biology*, *65*, 95-123.

- Luginbuehl, L. H., & Oldroyd, G. E. D. (2017). Understanding the arbuscule at the heart of endomycorrhizal symbioses in plants. *Current Biology*, *27*(17), R952–R963. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.06.042>
- Lynch, J. P. (2011). Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant Physiology*, *156*(3), 1041–1049. <https://doi.org/10.1104/PP.111.175414>
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ268>
- Marschner, P. (2011). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*, 1–651. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-63043-9>
- McCormack, M. L., & Iversen, C. M. (2019). Physical and functional constraints on viable belowground acquisition strategies. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1215. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01215/BIBTEX>
- McKercher, R. B., & Anderson, G. (1968). Content of inositol penta- and hexaphosphates in some Canadian soils. *Journal of Soil Science*, *19*(1), 47–55. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2389.1968.TB01519.X>
- Meyer, S., De Angeli, A., Fernie, A. R., & Martinoia, E. (2010). Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates. *Trends in Plant Science*, *15*(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2009.10.002>
- Mills, B. J. W., Batterman, S. A., & Field, K. J. (2018). Nutrient acquisition by symbiotic fungi governs Palaeozoic climate transition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *373* (1739). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2016.0503>
- Moll, R. H., Kamprath, E. J., & Jackson, W. A. (1982). Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization 1. *Agronomy journal*, *74*(3), 562-564.

- Montero, H., Choi, J., & Paszkowski, U. (2019). Arbuscular mycorrhizal phenotyping: the dos and don'ts. *New Phytologist*, 221(3), 1182–1186. <https://doi.org/10.1111/NPH.15489>
- Mudge, S. R., Rae, A. L., Diatloff, E., & Smith, F. W. (2002). Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 31(3), 341–353. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2002.01356.X>
- Müller, J., Toev, T., Heisters, M., Teller, J., Moore, K. L., Hause, G., Dinesh, D. C., Bürstenbinder, K., & Abel, S. (2015). Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Developmental Cell*, 33(2), 216–230. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2015.02.007>
- Näsholm, T., Kielland, K., & Ganeteg, U. (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist*, 182(1), 31–48. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2008.02751.X>
- Narayan, O. P., Kumar, P., Yadav, B., Dua, M., & Johri, A. K. (2022). Sulfur nutrition and its role in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 2030082.
- Novatero. *Agricultura de raiz, cultura de resultados: primeiro inoculante micorrízico registrado no Brasil*. 2019. Disponível em: <<https://www.novatero.com.br/>>. Acesso em: 13 out. 2023.
- Nürnberg, T., Abel, S., Jost, W., & Glund, K. (1990). Induction of an extracellular ribonuclease in cultured tomato cells upon phosphate starvation. *Plant Physiology*, 92(4), 970–976. <https://doi.org/10.1104/PP.92.4.970>
- Oberson, A., Friesen, D. K., Rao, I. M., Bühler, S., Frossard, E., & Culvenor, R. A. (2010). Plant phosphorus acquisition in an agricultural soil and its relation with the soil microbial biomass phosphorus. *Biology and Fertility of Soils*, 46(6), 589–601.
- O'Keefe, D. M., & Sylvia, D. M. (1991). Mechanisms of the vesicular-arbuscular mycorrhizal plant-growth response. *Handbook of applied mycology*, 1, 35-53.

- Olander, L.P., Vitousek, P.M. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* 49, 175–191 (2000). <https://doi.org/10.1023/A:1006316117817>
- Olsson, P. A., Rahm, J., & Aliasghar Zad, N. (2010). Carbon dynamics in mycorrhizal symbioses is linked to carbon costs and phosphorus benefits. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(1), 125–131. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2009.00833.X>
- Oulhen, N., Schulz, B. J., & Carrier, T. J. (2016). English translation of Heinrich Anton de Bary's 1878 speech, "Die Erscheinung der Symbiose" ('De la symbiose'). *Symbiosis*, July (69), 131–139. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0409-8>
- Pan, Y., Li, X., Wang, Z., Feng, L., Huang, L., Wang, B., & Sun, J. (2023). Soil extracellular enzymes characteristics and their controlling factors along the elevation gradient in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Applied Soil Ecology*, 188, 104862. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2023.104862>
- Park, Y., Solhtalab, M., Thongsomboon, W., & Aristilde, L. (2022), Strategies of organic phosphorus recycling by soil bacteria: acquisition, metabolism, and regulation. *Environmental Microbiology Reports*, 14: 3-24. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13040>
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T. G. A., Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R. I., Gamage, H. K., Carroll, B. J., Schenk, P. M., & Schmidt, S. (2008). Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(11), 4524–4529. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0712078105>
- Pavinato, P. S., Rocha, G. C., Cherubin, M. R., Harris, I., Jones, D. L., & Withers, P. J. A. (2020). Map of total phosphorus content in native soils of Brazil. *Scientia Agricola*, 78(6), 1–5. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2020-0077>
- Peršoh, D., Theuerl, S., Buscot, F., & Rambold, G. (2008). Towards a universally adaptable method for quantitative extraction of high-purity nucleic acids from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 19-24.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013).

Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(11), 789–799. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO3109>

Plaxton, W. C., & Tran, H. T. (2011). Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiology*, 156(3), 1006–1015. <https://doi.org/10.1104/PP.111.175281>

Quesada, C. A., Lloyd, J., Schwarz, M., Patiño, S., Baker, T. R., Czimczik, C., Fyllas, N. M., Martinelli, L., Nardoto, G. B., Schmerler, J., Santos, A. J. B., Hodnett, M. G., Herrera, R., Luizão, F. J., Arneith, A., Lloyd, G., Dezzio, N., Hilke, I., Kuhlmann, I., Paiva, R. (2010). Variations in chemical and physical properties of Amazon forest soils in relation to their genesis. *Biogeosciences*, 7(5), 1515–1541. <https://doi.org/10.5194/BG-7-1515-2010>

Rasmussen, H. N., & Rasmussen, F. N. (2014). Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 175(3), 313–327. <https://doi.org/10.1111/BOJ.12170>

Ravnskov, S., Larsen, J., Olsson, P. A., & Jakobsen, I. (1999). Effects of various organic compounds on growth and phosphorus uptake of an arbuscular mycorrhizal fungus. *The New Phytologist*, 141(3), 517–524. <https://doi.org/10.1046/J.1469-8137.1999.00353.X>

Reilly, T. J., Baron, G. S., Nano, F. E., & Kuhlenschmidt, M. S. (1996). Characterization and sequencing of a respiratory burst-inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(18), 10973–10983. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.18.10973>

Resende, M. D. V. de, & Alves, R. S. (2021). Genética: estratégias de melhoramento e métodos de seleção. In E. B. de Oliveira & J. E. P. Junior (Eds.), *O eucalipto e a Embrapa: quatro décadas de pesquisa e desenvolvimento* (2021st ed., pp. 171–202). Embrapa.

Rentsch, D., Schmidt, S., & Tegeder, M. (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters*, 581(12), 2281–2289. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2007.04.013>

Richardson, A. E., Hadobas, P. A., & Hayes, J. E. (2000). Acid phosphomonoesterase

and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant, Cell & Environment*, 23(4), 397–405. <https://doi.org/10.1046/J.1365-3040.2000.00557.X>

Richardson, Alan E., & Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiology*, 156(3), 989–996. <https://doi.org/10.1104/PP.111.175448>

Rodriguez, E., Han, Y., & Lei, X. G. (1999). Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (*appA2*) isolated from pig colon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1), 117–123. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1999.0361>

Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1–2), 15–21. <https://doi.org/10.1007/S11104-006-9056-9/METRICS>

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

Rui, W., Mao, Z., & Li, Z. (2022). The roles of phosphorus and nitrogen nutrient transporters in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, vol. 23, page 11027, 23(19), 11027. <https://doi.org/10.3390/IJMS231911027>

Ryan, P. R., Delhaize, E., & Jones, D. L. (2001). Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 527–560. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.52.1.527>

Sainju, U. M., Singh, B. P., Whitehead, W. F., & Wang, J. J. (2002). Long-term effects of tillage, cover crops, and nitrogen fertilization on organic carbon and nitrogen concentrations in sandy loam soils in Georgia, USA. *Soil and Tillage Research*, 63(3-4), 167-179.

- Sangwan, S., & Prasanna, R. (2022). Mycorrhizae helper bacteria: unlocking their potential as bioenhancers of plant–arbuscular mycorrhizal fungal associations. *Microbial Ecology*, *84*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S00248-021-01831-7/FIGURES/1>
- Scheerer, U., Trube, N., Netzer, F., Rennenberg, H., & Herschbach, C. (2019). ATP as phosphorus and nitrogen source for nutrient uptake by *fagus sylvatica* and *populus x canescens* roots. *Frontiers in Plant Science*, *10*(April), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00378>
- Schwacke, R., Schneider, A., Van Der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U. I., & Kunze, R. (2003). ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiology*, *131*(1), 16–26. <https://doi.org/10.1104/PP.011577>
- Schwerdtner, U., Lacher, U. & Spohn, M. Soy and mustard effectively mobilize phosphorus from inorganic and organic sources. *Nutr Cycl Agroecosyst* *124*, 211–226 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10705-022-10234-0>
- Secco, D., Bouain, N., Rouached, A., Prom-u-Thai, C., Hanin, M., Pandey, A. K., & Rouached, H. (2017). Phosphate, phytate and phytases in plants: from fundamental knowledge gained in Arabidopsis to potential biotechnological applications in wheat. *Critical reviews in biotechnology*, *37*(7), 898-910.
- Seshachala, U., & Tallapragada, P. (2012). Phosphate solubilizers from the rhizosphere of *Piper nigrum* L. in Karnataka, India. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *72*(3), 397–403. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392012000300014>
- Shane, M. W., & Lambers, H. (2005). Cluster roots: a curiosity in context. *Plant and Soil*, *274*(1–2), 101–125. <https://doi.org/10.1007/S11104-004-2725-7>
- 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*, *2*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587/FIGURES/3>
- Sharpley, A. N., Jarvie, H. P., Buda, A. R., May, L., Spears, B., Kleinman, P. J. & Bergström, L. (2014). Phosphorus legacy: overcoming the effects of past

- management practices to mitigate future water quality impairment. *Journal of environmental quality*, 43(6), 1786-1795.
- Shen, H., Chen, J., Wang, Z., Yang, C., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Matsumoto, H., & Yan, X. (2006). Root plasma membrane H⁺-ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany*, 57(6), 1353–1362. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERJ111>
- Siddiqi, M. Y., & Glass, A. D. (1981). Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. *Journal of plant nutrition*, 4(3), 289-302.
- Smeeckens, S., Ma, J., Hanson, J., & Rolland, F. (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3), 273–278. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2009.12.002>
- Smith, F.A., Grace, E.J. and Smith, S.E. (2009), More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 182: 347-358. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02753.x>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.
- Souza, F. A., Silva, I. C. L., & Berbara, R. L. L. (2008). Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. In *Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros* (pp. 483–536). UFPA.
- Spohn, M. (2020). Phosphorus and carbon in soil particle size fractions: A synthesis. *Biogeochemistry*, 147(3), 225–242. <https://doi.org/10.1007/S10533-019-00633-X/FIGURES/4>
- Steidinger, B. S., Turner, B. L., Corrales, A., & Dalling, J. W. (2015). Variability in potential to exploit different soil organic phosphorus compounds among tropical montane tree species. *Functional Ecology*, 29(1), 121-130.
- Strullu-Derrien, C. (2018). Fossil filamentous microorganisms associated with plants in early terrestrial environments. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 122–128. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2018.04.001>

- Stürmer, S. L., & Kemmelmeier, K. (2021). The Glomeromycota in the Neotropics. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 3200. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.553679/BIBTEX>
- Sulieman, S., & Mühlhng, K. H. (2021). Utilization of soil organic phosphorus as a strategic approach for sustainable agriculture. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *2018*, 1–9. <https://doi.org/10.1002/jpln.202100057>
- Sulpice, R., Ishihara, H., Schlereth, A., Cawthray, G. R., Encke, B., Giavalisco, P., Ivakov, A., Arrivault, S., Jost, R., Krohn, N., Kuo, J., Laliberté, E., Pearse, S. J., Raven, J. A., Scheible, W. R., Teste, F., Veneklaas, E. J., Stitt, M., & Lambers, H. (2014). Low levels of ribosomal RNA partly account for the very high photosynthetic phosphorus-use efficiency of Proteaceae species. *Plant, Cell and Environment*, *37*(6), 1276–1298. <https://doi.org/10.1111/PCE.12240/SUPPINFO>
- Svennerstam, H., Ganeteg, U., Bellini, C., & Näsholm, T. (2007). Comprehensive screening of Arabidopsis mutants suggests the lysine histidine transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. *Plant Physiology*, *143*(4), 1853. <https://doi.org/10.1104/PP.106.092205>
- Svennerstam, H., Ganeteg, U., & Näsholm, T. (2008). Root uptake of cationic amino acids by Arabidopsis depends on functional expression of amino acid permease 5. *New Phytologist*, *180*(3), 620–630. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2008.02589.X>
- Svennerstam, H., Jämtgård, S., Ahmad, I., Huss-Danell, K., Näsholm, T., & Ganeteg, U. (2011). Transporters in Arabidopsis roots mediating uptake of amino acids at naturally occurring concentrations. *The New Phytologist*, *191*(2), 459–467. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2011.03699.X>
- Tadano, T., & Sakai, H. (1991). Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, *37*(1), 129-140.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). Plant physiology and development. *Plant Physiology and Development*, Ed. 6.
- Tarafdar, J. C., & Marschner, H. (1994). Phosphatase activity in the rhizosphere and

- hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(3), 387–395. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90288-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90288-7)
- Tedersoo, L., Bahram, M., & Zobel, M. (2020). How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6480). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABA1223>
- Tegeder, M., & Masclaux-Daubresse, C. (2018). Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytologist*, 217(1), 35–53. <https://doi.org/10.1111/NPH.14876>
- Tibbett, M., & Sanders, F. E. (2002). Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany*, 89(6), 783–789. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCF129>
- Tibbett, Mark, Daws, M. I., & Ryan, M. H. (2021). Phosphorus uptake and toxicity is delimited by mycorrhizal symbiosis in P-sensitive *Eucalyptus marginata* but not in P-tolerant *Acacia celastrifolia*. *BioRxiv*, 2021.09.28.462111. <https://doi.org/10.1101/2021.09.28.462111>
- Tiessen, H. J. W. B. (1993). Characterization of available P by sequential extraction. *Soil sampling and methods of analysis*.
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., & Martin, F. (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(50), 20117-20122.
- Turan, V. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi and pistachio husk biochar combination reduces Ni distribution in mungbean plant and improves plant antioxidants and soil enzymes. *Physiologia Plantarum*, 173(1), 418–429. <https://doi.org/10.1111/PPL.13490>
- Turner, B. L., & Condon, L. M. (2013). Pedogenesis, nutrient dynamics, and ecosystem development: the legacy of T.W. Walker and J.K. Syers. *Plant and Soil* 2013 367:1, 367(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S11104-013-1750-9>

- Turner, B. L., & Haygarth, P. M. (2001). Phosphorus forms and concentrations in leachate under arable and grassland soils receiving long-term applications of fertilizer and manure. *Plant and Soil*, 237(2), 261-278.
- Tye, A., Siu, F., Leung, T., & Lim, B. (2002). Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2–3), 190–197. <https://doi.org/10.1007/S00253-002-1033-5>
- Vaccari, D. A. (2009). Phosphorus: a looming crisis. *Scientific American*, 300(6), 54-59.
- van Vuuren, D. P., Bouwman, A. F., Beusen, A. H. W., & Meinshausen, M. (2010). Phosphorus demand for the 1970-2100 period: a scenario analysis of resource depletion. *Global Environmental Change*, 20(3), 428-439.
- Vargas, L. M. P., Garcia, J. R., Campanha, M. M., Maia, C. M. B. de F., Queiroz, D. L. de, Peixoto, R. T. dos G., Fritzsos, E., & Wrege, M. S. (2021). Serviços ecossistêmicos e eucalipto. In E. B. de Oliveira & J. E. P. Junior (Eds.), *O eucalipto e a Embrapa: quatro décadas de pesquisa e desenvolvimento* (1st ed., pp. 611–666). Embrapa.
- Veneklaas, E. J., Lambers, H., Bragg, J., Finnegan, P. M., Lovelock, C. E., Plaxton, W. C., Price, C. A., Scheible, W. R., Shane, M. W., White, P. J., & Raven, J. A. (2012). Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *New Phytologist*, 195(2), 306–320. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2012.04190.X>
- Vincent, A. G., Turner, B. L., & Tanner, E. V. J. (2010). Soil organic phosphorus dynamics following perturbation of litter cycling in a tropical moist forest. *European Journal of Soil Science*, 61(1), 48–57. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2389.2009.01200.X>
- Waithaisong, K., Robin, A., Mareschal, L., Bouillet, J. P., Laclau, J. P., Deleporte, P., Gonçalves, J. L. de M., Harmand, J. M., & Plassard, C. (2020). Introducing N₂-fixing trees (*Acacia mangium*) in eucalypt plantations rapidly modifies the pools of organic P and low molecular weight organic acids in tropical soils. *Science of*

The Total Environment, 742, 140535.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140535>

- Wang, E., Schornack, S., Marsh, J. F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., Schultze, M., Kamoun, S., & Oldroyd, G. E. D. (2012). A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Current Biology: CB*, 22(23), 2242–2246. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.09.043>
- Wang, G., Jin, Z., George, T. S., Feng, G., & Zhang, L. (2023). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance plant phosphorus uptake through stimulating hyphosphere soil microbiome functional profiles for phosphorus turnover. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/NPH.18772>
- Wang, Y. & Lambers, H. (2020). Root-released organic anions in response to low phosphorus availability: recent progress, challenges and future perspectives. *Plant and Soil*, 447(1–2), 135–156. <https://doi.org/10.1007/S11104-019-03972-8>
- Wang, L., Zhang, L., George, T. S., & Feng, G. (2023). A core microbiome in the hyphosphere of arbuscular mycorrhizal fungi has functional significance in organic phosphorus mineralization. *New Phytologist*, 238(2), 859–873. <https://doi.org/10.1111/NPH.18642>
- Wanner, B. L. (1996). Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 1, 1357-1381.
- Watson, F. T., Smernik, R. J., Doolette, A. L., & Mosley, L. M. (2019). Phosphorus speciation and dynamics in river sediments, floodplain soils and leaf litter from the Lower Murray River region. *Marine and Freshwater Research*, 70(11), 1522–1532. <https://doi.org/10.1071/MF18360>
- Huo, W. G., Chai, X. F., Wang, X. H., Batchelor, W. D., Kafle, A., & Gu, F. E. N. G. (2022). Indigenous arbuscular mycorrhizal fungi play a role in phosphorus depletion in organic manure amended high fertility soil. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(10), 3051-3066.
- Williams, C. H., & Anderson, G. (1968). Inositol phosphates in some Australian soils. *Soil Research*, 6(1), 121–130. <https://doi.org/10.1071/SR9680121>

- Wipf, D., Krajinski, F., van Tuinen, D., Recorbet, G. and Courty, P.-E. (2019), Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytol*, 223: 1127-1142. <https://doi.org/10.1111/nph.15775>
- Wolff, L. F., & Schuhli, G. S. e. (2021). Eucaliptos e abelhas. In E. B. de Oliveira & J. E. P. Junior (Eds.), *O eucalipto e a Embrapa: quatro décadas de pesquisa e desenvolvimento* (1st ed., pp. 685–700). Embrapa.
- Wu, F., Li, Z., Lin, Y., & Zhang, L. (2021). Effects of *Funneliformis mosseae* on the utilization of organic phosphorus in *Camellia oleifera* Abel. *Canadian Journal of Microbiology*, 67(5), 349-357.
- Yadav, R., & Tarafdar, J. (2001). Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biology and Fertility of Soils*, 34(3), 140–143. <https://doi.org/10.1007/S003740100376/METRICS>
- Yang, X., & Post, W. M. (2011). Phosphorus transformations as a function of pedogenesis: A synthesis of soil phosphorus data using Hedley fractionation method. *Biogeosciences*, 8(10), 2907-2916.
- Yang, X., Post, W. M., Thornton, P. E., & Jain, A. (2013). The distribution of soil phosphorus for global biogeochemical modeling. *Biogeosciences*, 10(4), 2525–2537. <https://doi.org/10.5194/BG-10-2525-2013>
- Yli-Halla, M. (2016). Fate of fertilizer P in soils: inorganic pathway. *Phosphorus in Agriculture: 100% Zero*, 27–40. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7612-7_3
- Yuan, J., Zhang, N., Huang, Q., Raza, W., Li, R., Vivanco, J. M., & Shen, Q. (2015). Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Scientific Reports*, 5(August), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep13438>
- Zhang, L., Fan, J., Ding, X., He, X., Zhang, F., & Feng, G. (2014). Hyphosphere interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate solubilizing bacterium promote phytate mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 74, 177–183. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2014.03.004>
- Zhang, L., Shi, N., Fan, J., Wang, F., George, T. S., & Feng, G. (2018). Arbuscular

mycorrhizal fungi stimulate organic phosphate mobilization associated with changing bacterial community structure under field conditions. *Environmental Microbiology*, 20(7), 2639–2651. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14289>

Zhao, F. J., Lehmann, J., Solomon, D., Fox, M. A., & McGrath, S. P. (2006). Sulphur speciation and turnover in soils: evidence from sulphur K-edge XANES spectroscopy and isotope dilution studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5), 1000–1007. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2005.08.013>

Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., & Chen, Q. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological Research*, 169(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2013.07.003>

Zheng, H., Phillips, R. P., Rousk, J., Yue, K., Inger, J., Schmidt, K., Peng, Y., Wang, S., & Vesterdal, L. (2023). Imprint of tree species mycorrhizal association on microbial-mediated enzyme activity and stoichiometry. *Functional Ecology*, 00, 1–11. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14311>

Zhou, J., Zhang, L., Feng, G., & George, T. S. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi have a greater role than root hairs of maize for priming the rhizosphere microbial community and enhancing rhizosphere organic P mineralization. *Soil Biology and Biochemistry*, 171, 108713. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2022.108713>

Zhu, F., Qu, L., Hong, X., & Sun, X. (2011). Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the Coast of Yellow Sea of China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/615032>

Zhu, S., Chen, M., Liang, C., Xue, Y., Lin, S., & Tian, J. (2020). Characterization of purple acid phosphatase family and functional analysis of *GmPAP7a/7b* involved in extracellular ATP utilization in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 0, 661. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.0066>



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
 INSTITUTO DE BIOLOGIA
 Universidade Estadual de Campinas
 Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
 Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada **“POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE FÓSFORO DE FONTES ORGÂNICAS EM *Eucalyptus grandis* E *E. globulus*: INFLUÊNCIA DA MICORRIZA ARBUSCULAR**”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Documento assinado digitalmente
 LEONARDO SOUZA DE ANDRADE
 Data: 23/10/2023 19:42:41-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura: _____
 Nome do(a) aluno(a): Leonardo Souza de Andrade

Documento assinado digitalmente
 SARA ADRIAN LOPEZ DE ANDRADE
 Data: 24/10/2023 06:40:29-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura: _____
 Nome do(a) orientador(a): Sara Adrián López de Andrade

Data: 05/09/2023

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE FÓSFORO DE FONTES ORGÂNICAS EM Eucalyptus grandis E E. globulus: INFLUÊNCIA DA MICORRIZA ARBUSCULAR"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 05/09/2023

Documento assinado digitalmente
 LEONARDO SOUZA DE ANDRADE
Data: 23/10/2023 19:36:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Leonardo Souza de Andrade**

RG n.º 69.416.900-6

Documento assinado digitalmente
 SARA ADRIAN LOPEZ DE ANDRADE
Data: 24/10/2023 06:40:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Sara Adrián López de Andrade**

RG n.º V234072-8 (RNE)