

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO
E SUA INTERAÇÃO FUNCIONAL COM MILHO-PIPOCA: ANÁLISES
MORFOFISIOLÓGICAS E EFEITOS GÊNICOS ENVOLVIDOS

BRUNA ROHEM SIMÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2025

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO
E SUA INTERAÇÃO FUNCIONAL COM MILHO-PIPOCA: ANÁLISES
MORFOFISIOLÓGICAS E EFEITOS GÊNICOS ENVOLVIDOS

BRUNA ROHEM SIMÃO

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Genética e Melhoramento de Plantas”

Orientador: Prof. Dr. Antônio Teixeira do Amaral Junior

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S588

Simão, Bruna Rohem.

Prospecção de bactérias solubilizadoras de fosfato e sua interação funcional com milho-pipoca : análises morfofisiológicas e efeitos gênicos envolvidos / Bruna Rohem Simão. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

105 f.

Bibliografia: 70 - 87.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2025. Orientador: Antonio Teixeira do Amaral Junior.

1. Estresses Abióticos. 2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. 3. Fósforo. 4. Deficiência nutricional. 5. Dialelo. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO E SUA INTERAÇÃO FUNCIONAL COM MILHO-PIPOCA: ANÁLISES MORFOFISIOLÓGICAS E EFEITOS GÊNICOS ENVOLVIDOS

BRUNA ROHEM SIMÃO

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 10 de fevereiro de 2025.

Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente
JURANDIR VIEIRA DE MAGALHAES
Data: 28/04/2025 10:00:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Jurandir Vieira Magalhães (Ph.D., Field Crop Science) - EMBRAPA



Documento assinado digitalmente
COSME DAMIAO CRUZ
Data: 28/04/2025 17:48:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Cosme Damiano Cruz (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF

Prof. Fábio Lopes Olivares (D.Sc., Ciência do Solo) - UENF

Prof. Antônio Teixeira do Amaral Junior (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) -
UENF
(Orientador)

“É justo que muito te custe o que muito te vale.”

- Santa Teresa D'Ávila

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação à memória da minha tia Edila,
que foi e sempre será uma fonte inesgotável de amor, fé e perseverança.
Seu apoio incondicional e suas palavras de motivação ecoam em cada conquista
da minha vida, inclusive nesta que tanto sonhei e agora realizo.
Mesmo não estando mais entre nós, carrego comigo suas lições,
sua força e o exemplo de sua dedicação.
Espero que esta obra, fruto do seu incentivo,
lhe faça sentir orgulho onde quer que você esteja.
Eternamente grata.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e a Nossa Senhora das Graças por Seu amor e cuidado, por toda força que me concederam, por cada oração ouvida. Por me acompanharem durante todo o caminho e nunca me deixarem desistir do propósito;

Agradeço aos meus pais, exemplos de garra e perseverança, por sempre me incentivarem, mostrando que o estudo é o melhor caminho a se seguir. Por toda base, fortaleza e apoio em cada momento da minha vida. E ao meu irmão pelo companheirismo, confiança e amizade que sempre me dedicou;

Agradeço, imensamente, ao meu orientador, Dr. Antônio Teixeira do Amaral Junior, e aos meus conselheiros e membros da banca, Dr. Fábio Olivares, Dr. Cosme Damião Cruz e Dr. Jurandir Vieira Magalhães pela orientação, paciência, generosidade, acolhimento, confiança, por serem parte fundamental na construção deste trabalho;

Ao Dr. Talles de Oliveira Santos deixo meu mais sincero agradecimento por toda a ajuda e dedicação durante a escrita desta dissertação. Sua orientação, paciência e valiosos ensinamentos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço, especialmente, pelo apoio constante e pela confiança depositada em mim ao longo desta trajetória. Sua contribuição foi essencial para que este estudo se tornasse realidade;

Ao Dr. Valter Jário de Lima agradeço a parceria e pelos ensinamentos compartilhados ao longo do desenvolvimento deste trabalho. À Dra. Flávia Nicácio

Viana e à Dra. Gabriela Petroceli expresseo meu sincero agradecimento pela presença constante e pelo suporte incansável durante a condução dos experimentos. Suas contribuições, sempre embasadas e precisas, foram essenciais para o progresso e a conclusão deste estudo. Estendo também minha sincera gratidão aos colegas do laboratório, que, com sua colaboração e companheirismo, tornaram a jornada mais leve e enriquecedora;

A toda minha família, que sempre apoiou e acreditou no meu caminho. Em especial a minhas avós Silvane e Isaura, meus tios Elildo, Preta, Hilda e Clemilda e minha madrinha Milena por todo amor e carinho;

Ao Wallace por toda paciência, amor, carinho, confiança e companheirismo que a mim foram atribuídos. Por ter tornado meus dias mais leves para conseguir finalizar essa etapa;

À Luana, Karol e a todos os amigos que fiz durante essa jornada, pela amizade e companheirismos de sempre. E ainda por terem tornado a caminhada mais leve e terem sido essenciais na minha vida;

Ao Gou Halam, família pela qual nutro um imenso carinho, agradeço por terem sido sempre meu refúgio e ombro amigo nos dias mais difíceis;

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica, muito obrigada!

Agradeço em especial à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e aos órgãos de fomento CAPES e FAPERJ, pela oportunidade que me foi dada, por não desistirem da luta nos tempos difíceis e por acreditarem na transformação pela educação. Com certeza eu encerro essa jornada melhor que a iniciei.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 A cultura do milho-pipoca.....	7
3.2 Fósforo no <i>continuum</i> solo-planta.....	9
3.3 Mecanismos de solubilização de fosfato.....	13
3.4 Promoção do crescimento de plantas por microrganismos solubilizadores de fosfatos.....	15
3.5 Efeito gênico em <i>Zea mays</i> para eficiência no uso do P.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato.....	21
4.1.1 Isolados bacterianos.....	21
4.1.2 Seleção em meio sólido.....	22
4.1.3 Seleção em meio líquido.....	22
4.2 Genótipos avaliados.....	23
4.3 Ensaio para avaliação de linhagens e híbridos.....	24
4.3.1 Características morfológicas avaliadas.....	25

4.3.1.1	Medições foliares	25
4.3.1.2	Massa seca da parte aérea.....	26
4.3.2	Quantificação de fósforo nas plantas.....	26
4.3.3	Variáveis fisiológicas avaliadas	26
4.3.3.1	Pigmentos foliares.....	26
4.3.3.2	Trocas gasosas foliares	27
4.3.3.3	Fluorescência da clorofila.....	27
4.4	Contagem de bactérias	27
4.5	Análises estatístico-genéticas	28
4.5.1	Estimativas da capacidade geral e específica de combinação	28
5.	RESULTADOS	29
5.1	Prospecção de cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato.....	29
5.2	Consequências da inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato na morfologia vegetal e na eficiência no uso do fósforo	32
5.3	Impactos da inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato nas trocas gasosas foliares, conteúdos de pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila	40
5.4	Quantificação de bactérias associadas às raízes das plantas de milho-pipoca em diferentes condições de inoculação	55
6.	DISCUSSÃO	58
6.1.	Prospecção de cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato como alternativa para o suprimento de P	58
6.2.	Impacto das bactérias solubilizadoras de fosfato na promoção do crescimento e na eficiência do uso do fósforo em milho-pipoca.....	60
6.3.	As mudanças fisiológicas subjacentes à promoção no desenvolvimento de milho-pipoca em ambiente com baixo P em resposta à inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato	62
6.4.	Implicações para o melhoramento de plantas em face à inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato	64
7.	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
	APÊNDICES	88

RESUMO

SIMÃO, Bruna Rohem; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro 2025; PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO E SUA INTERAÇÃO FUNCIONAL COM MILHO-PIPOCA: ANÁLISES MORFOFISIOLÓGICAS E EFEITOS GÊNICOS ENVOLVIDOS; Orientador: D.Sc. Antônio Teixeira do Amaral Junior.

A busca por práticas agrícolas sustentáveis e eficientes impulsiona a exploração das intrincadas interações entre plantas e microrganismos. O presente estudo investigou a simbiose entre bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP) e o milho-pipoca, uma cultura de expressivo valor econômico, mas que carece de pesquisas para a geração de produtos tecnológicos que atendam ao agronegócio brasileiro. O objetivo primordial foi elucidar como essa interação pode otimizar a eficiência na utilização de fósforo (P), um macronutriente essencial ao desenvolvimento vegetal, notadamente em solos tropicais, onde sua biodisponibilidade frequentemente se apresenta como fator limitante. Para tanto, realizou-se a prospecção de BSPs, avaliando diferentes espécies quanto à capacidade de solubilizar fosfato de cálcio e termofosfato em meios de cultura específicos. Posteriormente, foi analisada a interação dessas bactérias com linhagens de milho-pipoca contrastantes para a eficiência no uso de P, bem como com seus híbridos dialélicos, visando a compreender a influência da constituição genética da planta sobre essa relação simbiótica. Os genótipos foram cultivados em vasos com baixa disponibilidade de P em casa de vegetação e submetidos a três tratamentos: inoculação com *Azospirillum brasilense*, inoculação com *Leclercia adecarboxylata* e não inoculado.

Foram avaliadas características morfofisiológicas, a eficiência de absorção e do uso P, bem como a contagem de bactérias associadas às raízes. Os resultados revelaram que, de maneira geral, os híbridos apresentaram desempenho superior em comparação às linhagens, demonstrando maior capacidade de utilizar os recursos disponibilizados pelos microrganismos selecionados. A inoculação com *A. brasilense* promoveu incrementos significativos no crescimento dos híbridos, resultando em aumentos expressivos na altura da planta aos 20 dias, na área foliar e em massa seca da parte aérea e radicular. A inoculação com *L. adecarboxylata*, embora tenha apresentado efeitos mais modestos, demonstrou potencial na promoção do crescimento vegetal, com desempenho superior no híbrido L75xL80. Adicionalmente, as BSPs otimizaram a eficiência do uso e absorção do P pelas plantas. Esses resultados corroboram a capacidade desses microrganismos em converter o P presente no solo em formas mais biodisponíveis para as plantas, potencializando seu desempenho. A análise fisiológica demonstrou que as bactérias promoveram melhorias na fotossíntese, na condutância estomática e na transpiração. *A. brasilense* induziu os maiores incrementos na taxa fotossintética líquida, evidenciando seu impacto mais expressivo na otimização do metabolismo do milho-pipoca. Para elucidar os mecanismos genéticos subjacentes a essas interações, foi implementada a análise dialélica de Griffing, em que se estimou a contribuição de efeitos gênicos aditivos e não-aditivos. Verificou-se que os efeitos da capacidade específica de combinação (CEC), associados à dominância e epistasia, foram mais proeminentes para a massa seca foliar e para características fisiológicas. Estes resultados revelam que a exploração da heterose constitui a estratégia mais apropriada para a obtenção de genótipos superiores nessas condições. Em síntese, este estudo ressalta o elevado potencial das BSPs, especialmente *A. brasilense*, como biofertilizante para o milho-pipoca. Os resultados demonstram que a seleção de genótipos que interagem mais eficazmente com esses microrganismos é crucial para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e sustentáveis. Ademais, esse trabalho é pioneiro ao investigar a interação de BSFs com características de crescimento e fisiologia do milho-pipoca, abrindo novas perspectivas para pesquisas visando ao desenvolvimento de uma agricultura ecologicamente responsável.

Palavras-Chave: Estresses Abióticos; bactérias promotoras de crescimento vegetal; fósforo; deficiência nutricional; dialelo.

ABSTRACT

SIMÃO, Bruna Rohem; M.Sc.; State University of the North Fluminense Darcy Ribeiro; february 2025; PROSPECTING FOR PHOSPHATE SOLUBILIZING BACTERIA AND THEIR FUNCTIONAL INTERACTION WITH POPCORN: MORPHOPHYSIOLOGICAL ANALYSES AND GENE EFFECTS INVOLVED; Advisor: D.Sc. Antônio Teixeira do Amaral Junior.

The pursuit of sustainable and efficient agricultural practices drives the exploration of the intricate interactions between plants and microorganisms. This study investigated the symbiosis between phosphate-solubilizing bacteria (PSB) and popcorn, a crop of significant economic value but whose genetic improvement has yet to be deeply explored. The primary objective was to elucidate how this interaction can optimize phosphorus (P) use efficiency, an essential macronutrient for plant development, particularly in tropical soils where its bioavailability is often a limiting factor. To achieve this, PSBs were prospected by evaluating different genera for their ability to solubilize calcium phosphate and thermophosphate in specific culture media. Subsequently, the interaction of these bacteria with contrasting popcorn maize lines for P-use efficiency, as well as their diallel hybrids, was analyzed to understand the influence of the plant's genetic makeup on this symbiotic relationship. The genotypes were cultivated in a greenhouse with low P availability and subjected to three treatments: inoculation with *Azospirillum brasilense*, inoculation with *Leclercia adecarboxylata*, and non-inoculated controls. Morphophysiological traits were assessed, alongside P-use and uptake efficiency and the bacterial count associated with the roots. The results revealed that, overall,

the hybrids outperformed the inbred lines, demonstrating a greater ability to utilize the resources made available by the selected microorganisms. Inoculation with *A. brasilense* significantly enhanced hybrid growth, resulting in remarkable increases in plant height, leaf area, and shoot and root dry mass. Inoculation with *L. adecarboxylata*, although showing more modest effects, demonstrated potential for promoting plant growth, with superior performance observed in the L75xL80 hybrid. Additionally, PSBs optimized the plants' P-use and uptake efficiency. These results support the ability of these microorganisms to convert soil P into more bioavailable forms for plants, thereby boosting their performance. Physiological analysis revealed that the bacteria improved photosynthesis, stomatal conductance, and transpiration. *A. brasilense* induced the greatest increases in net photosynthetic rate, highlighting its more pronounced impact on optimizing the metabolism of popcorn. To elucidate the genetic mechanisms underlying these interactions, diallel analyses were conducted using Griffing's method, which enabled the estimation of additive and non-additive genetic effects. It was found that specific combining ability (SCA) effects, associated with dominance and epistasis, were more prominent for leaf dry mass and physiological traits. These results indicate that exploiting heterosis is the most appropriate strategy for developing superior genotypes under these conditions. In summary, this study highlights the high potential of PSBs, especially *A. brasilense*, as biofertilizers for popcorn. The findings demonstrate that selecting genotypes that interact effectively with these microorganisms is crucial for developing more productive and sustainable cultivars. Furthermore, this research is pioneering in investigating PSB interactions with growth and physiological traits in popcorn, opening new perspectives for genetic improvement and the development of ecologically responsible agriculture

Keywords: Abiotic stresses; plant growth promoting bacteria; phosphorus; nutritional deficiency; diallel.

1. INTRODUÇÃO

A expansão da agricultura, aliada à necessidade de cultivos mais sustentáveis e mais adaptados às condições de estresses abióticos, representa um dos maiores desafios da comunidade científica que trabalha para o desenvolvimento de novas cultivares (Yassitepe et al., 2019). Dentre os estresses, a baixa disponibilidade de fósforo (P) é particularmente relevante, uma vez que a deficiência desse mineral é um fator limitante para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Zhang et al., 2014; Sun et al., 2018; Gerhardt et al., 2019). Estima-se que cerca de 30% dos solos aráveis em todo o mundo sejam deficientes em P, requerendo uma contínua aplicação desse fertilizante para manter a produtividade das grandes culturas (MacDonald et al., 2011; Jiang et al., 2017; De Oliveira et al., 2021).

A expectativa é que a população mundial continue crescendo nos próximos 30 anos, chegando a 9,6 bilhões de habitantes (ONU, 2012). Esse aumento populacional resultará em uma maior demanda por alimentos, o que intensifica ainda mais a pressão sobre a produção agrícola para atender as necessidades alimentares globais. A escassez de fósforo disponível no solo pode limitar a produtividade agrícola, resultando em menor rendimento das colheitas e afetando a segurança alimentar global (Liu et al., 2015; Alewell et al., 2020; Solangi et al., 2023).

Historicamente, os agricultores dependiam do fósforo natural do solo para cultivar. No entanto, devido ao aumento da demanda de alimentos e a degradação

do solo, houve menor disponibilidade do nutriente; por conseguinte, a busca por fontes externas de fertilizantes fosfatados se tornou necessária. Neste cenário, a rocha fosfática, devido à sua abundância, configurou-se em escolha frequente. No entanto, esses insumos embora amplamente utilizados e considerados uma fonte relativamente acessível, são caros e derivam de fontes não renováveis (Schroder et al., 2010). Estimativas indicam que as reservas de rocha fosfática de fácil acesso se esgotarão antes do final deste século, tornando a fertilização com P globalmente inatingível, especialmente para agricultores com recursos financeiros limitados (Balemi e Negisho, 2012; Heuer et al., 2017).

Além disso, os preços dos fertilizantes aumentaram devido a conflitos na Europa Oriental, uma região-chave na produção desses insumos. Esse cenário ressalta a vulnerabilidade do sistema agrícola global, altamente dependente de mercados externos de fertilizantes. Esse contexto é particularmente relevante para o Brasil, reconhecido como um dos maiores produtores e exportadores de grãos, mas que depende fortemente de fertilizantes importados. Trata-se do quarto maior importador mundial de nitrogênio (N), P e potássio (K), adquirindo do exterior cerca de 95% de K, 60% de P e 80% de N utilizados na agricultura (Agrolink, 2023).

Por outro lado, a aplicação de fertilizantes contendo P é desafiada pela baixa eficiência na absorção do nutriente pelas plantas, com menos de 20% do fertilizante fosfatado adicionado aos solos sendo efetivamente absorvido (Cordell e White, 2014). Isso ocorre devido à sua baixa solubilidade e pouca mobilidade na solução do solo (Ouyang et al., 2016; Liu et al., 2020). Em solos agrícolas tropicais, o teor total de P pode ser bastante elevado, variando entre 200 e 800 mg kg⁻¹. No entanto, apenas uma pequena fração desse fósforo está facilmente disponível para as plantas, devido à alta capacidade de adsorção no solo (Pavinato e Rosolem, 2008; Alori et al., 2017; Oliveira-Paiva et al., 2023). Isso ocorre porque o P solúvel tende a se ligar fortemente a minerais de argila e cátions metálicos (Hinsinger, 2001; Kalayu, 2019; Pavinato et al., 2020).

Em solos alcalinos, o fósforo inorgânico (Pi; forma absorvível pelas plantas) é fixado principalmente por compostos de cálcio, enquanto em solos ácidos, especialmente os tropicais, a fixação ocorre predominantemente por óxidos de ferro e alumínio, tornando-o indisponível para a absorção pelas raízes. A alta presença desses óxidos em solos tropicais intensifica a adsorção do fósforo, diminuindo sua disponibilidade para as plantas. Por outro lado, o fósforo que não é adsorvido pelo

solo permanece na solução e pode ser facilmente lixiviado para lagos e rios, causando sérios impactos ambientais (Mpanga et al., 2019).

Diante deste cenário desafiador, uma estratégia para mitigar os impactos atrelados ao uso excessivo do P ou da escassez desse nutriente no solo, é o desenvolvimento de cultivares mais eficientes na sua aquisição e utilização (Lynch, 2007; Jiang et al., 2017; Gerhardt et al., 2019). Em diversos países, programas de melhoramento com o milho têm desenvolvido pesquisas para identificar fontes de germoplasma que sejam eficientes no uso do P (Gerhardt et al., 2017; Silva et al., 2019; Fritsche-Neto e Borém, 2022; Simão et al., 2023; Bispo et al., 2024). Entretanto, esse enfoque tem sido menos explorado para o milho-pipoca, uma cultura agrícola de alto valor agregado e com uma demanda global significativa, mas pouco explorada por programas de melhoramento.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) é uma das poucas Instituições públicas que desenvolve pesquisas com o melhoramento do milho-pipoca no Brasil. Uma vertente do programa de melhoramento da UENF envolve o estudo da nutrição mineral para a eficiência no uso do P. Nessa linha de pesquisa, que é única no país, foi possível identificar variabilidade genética na Coleção de Germoplasma da UENF, em que genótipos apresentaram diferentes níveis de eficiência e responsividade ao uso de P (Silva et al., 2019; Santos et al., 2022; Bispo et al., 2024). Além disso, análises genéticas revelaram prevalência de efeitos de dominância para essa característica, indicando a exploração da heterose como meio eficaz para obter genótipos superiores para condições de baixa disponibilidade de P (Gerhardt et al., 2019; Bispo et al., 2025). Contudo, mesmo com a identificação de genótipos eficientes, as perdas de rendimento sob estresse em comparação com as condições normais de P ainda são elevadas (Gerhardt et al., 2017; 2019).

Neste sentido, uma das alternativas para aumentar a capacidade da planta em adquirir o P no solo é a associação com bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP). Os microrganismos associados às plantas desempenham um papel crucial no suprimento de nutrientes e na produtividade do vegetal, com efeitos benéficos para com a resiliência e a adaptação em condição estressante (Busby et al., 2017). Esses microrganismos são capazes de secretar ácidos orgânicos, produzir enzimas fosfatases e usar troca iônica para converter fosfato insolúvel em solúvel; além disso, a associação com bactérias oferece benefícios adicionais às plantas,

incluindo fixação de nitrogênio, resistência a patógenos, aumento na absorção de água e nutrientes, produção de hormônios vegetais e desintoxicação de metais pesados (Patil et al., 2012; Dias et al., 2016; O'Callaghan et al., 2022; Silva et al., 2023).

No Brasil, diversos produtos biológicos à base de BSP foram desenvolvidos e comercializados para melhorar a solubilização de fosfato, como o BiomaPhos, desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo, que contém bactérias dos gêneros *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* para promover a liberação de fósforo no solo e melhorar a nutrição das plantas. Além disso, produtos como Omsugo™ P e Omsugo™ ECO, desenvolvidos pela Corteva Agriscience em parceria com a Embrapa, utilizam cepas exclusivas de *Bacillus* para culturas como soja e cana-de-açúcar, contribuindo para um manejo mais sustentável dos fertilizantes fosfatados. Esses bioinsumos vêm ganhando destaque como alternativas sustentáveis para reduzir a dependência de fertilizantes eficientes e promover a eficiência na utilização de nutrientes no sistema agrícola.

Com o intuito de aprimorar a eficiência na solubilização e na disponibilização do fosfato inorgânico, a exploração de microrganismos possui elevado potencial, destacando-se como estratégia biotecnológica promissora, com resultados comprovados em milho comum (Batista et al., 2018; Caporossi et al., 2024; Pereira et al., 2024), sorgo (Soares et al., 2013), arroz (Bonilla et al., 2011; Tejera-Hernández et al., 2013; Simões et al., 2023), trigo (Cabral et al., 2016), dentre outras (Elhaissofi et al., 2022). Essa abordagem tem atraído considerável interesse global ao longo das últimas décadas (Elhaissofi et al., 2022; Oliveira-Paiva et al., 2023). Nesse contexto, o uso de inoculantes microbianos emerge como uma oportunidade significativa capaz de modernizar práticas agrícolas, reduzir custos e se alinhar aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável delineados pela Organização das Nações Unidas (Oliveira-Paiva et al., 2023).

As plantas são responsáveis por realizar uma seleção criteriosa dos microrganismos que colonizam a rizosfera (Bulgarelli et al., 2013; Philippot et al., 2013). Assim, o microbioma presente na rizosfera das plantas é influenciado pela trajetória genética e evolutiva da própria planta (Yeoh et al., 2017). Embora se saiba que esse processo de seleção é transmitido geneticamente, as implicações hereditárias têm sido exploradas de maneira limitada até então (Walters et al., 2018). Portanto, a avaliação da capacidade de interação entre espécies bacterianas

solubilizadoras de fosfato e genótipos de milho-pipoca se torna conveniente, posto que estudos sobre os mecanismos genéticos envolvidos na interação são de extrema relevância para se obter avanços significativos para o agronegócio. Outrossim, ainda há carência de estudos fundamentais para o desenvolvimento de inoculantes eficientes em milho-pipoca. Por todos esses fatos, apesar do potencial de microrganismos em suplementar o fornecimento de P para as plantas, a utilização destes permanece um campo de pesquisa relativamente pouco explorado para a cultura do milho-pipoca.

Isto posto, o estudo ainda não explorado dos efeitos gênicos envolvidos na interação entre espécies bacterianas solubilizadoras de fosfato em genótipos de milho-pipoca configura o principal objetivo do presente trabalho. Além disso, esse trabalho buscou selecionar espécies bacterianas com capacidade de solubilização de fosfato e de interação com genótipos de milho-pipoca.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da interação entre espécies bacterianas solubilizadoras de fosfato e quantificar os efeitos gênicos envolvidos na interação destes microrganismos com linhagens de milho-pipoca contrastantes para a eficiência e responsividade no uso do fósforo juntamente com seus híbridos dialélicos.

2.2 Objetivos específicos

- A- Discriminar a capacidade de bactérias para a solubilização de fosfato inorgânico em meio sólido e líquido;
- B- Avaliar características morfofisiológicas de linhagens e híbridos de milho-pipoca cultivados com fonte inorgânica de fósforo na presença de bactérias solubilizadoras de P;
- C- Discriminar linhagens e híbridos de milho-pipoca eficientes na interação com espécies bacterianas solubilizadoras de P; e
- D- Estimar os efeitos gênicos envolvidos no controle de características morfofisiológicas da interação bactérias solubilizadoras de fosfato *versus* genótipos de milho-pipoca.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A cultura do milho-pipoca

O milho-pipoca é um tipo especial de milho, considerado uma subespécie de *Zea mays*, denominado *Zea mays* L. var. *everta* (Sturtev) L.H. Bailey (Galinat, 1979). Pertencente à família Poaceae, é uma planta monocotiledônea da tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *mays* (*Zea mays* L.) (Goodman e Smith, 1987). É interessante notar que o milho-pipoca e o milho comum compartilham o mesmo número de cromossomos ($n = 10$) (Ranum et al., 2014).

A origem geográfica do milho é temática de interesse histórico e científico. Acredita-se que o milho tenha sido uma das primeiras espécies cultivadas por agricultores há cerca de 7.000 a 10.000 anos. Evidências arqueológicas, como espigas de milho pequenas com mais de 5.000 anos encontradas em cavernas no México, apoiam essa hipótese (Ranum et al., 2014). No entanto, a origem exata do milho tem sido debatida ao longo do tempo.

Alguns estudiosos argumentam que o milho se originou do teosinto, um tipo de capim silvestre que é substancialmente diferente do milho atual (Beadle, 1939). Outros sugerem que o milho é o resultado de um híbrido entre duas gramíneas silvestres: o teosinto *Zea diploperennis* e uma espécie de *Tripsacum* (Ranum et al., 2014). No entanto, a teoria mais amplamente aceita na atualidade é que o milho evoluiu na região central do México a partir do teosinto, aproximadamente 9.000 anos atrás (Iltis, 1983). Essa perspectiva ganhou maior aceitação devido a evidências genéticas, arqueológicas e botânicas que conectam o teosinto ao milho

e às populações indígenas do México, onde o milho foi um dos principais alimentos cultivados. Essa é uma história fascinante de domesticação de plantas que teve um impacto significativo na agricultura e na alimentação ao longo dos séculos (Smith, 2021).

A domesticação do milho envolveu a seleção de plantas com características desejáveis, como grãos maiores e mais produtivos. Conforme os agricultores nativos cultivavam variedades de milho ao longo de gerações, eles notaram que algumas espigas desenvolviam cascas duras e densas que não se rompiam facilmente quando cozidas. Essas espigas eram, de fato, as precursoras do milho-pipoca. Portanto, a domesticação seletiva do milho ao longo dos séculos resultou em variedades específicas que tinham essa característica única de expandir quando aquecidas. As populações indígenas da América Central e do Sul estavam entre as primeiras a descobrir e apreciar esse fenômeno. A pipoca logo se tornou uma iguaria valorizada por muitas culturas nativas americanas e sua popularidade se espalhou à medida que as pessoas ao redor do mundo a descobriram. Hoje, a pipoca é consumida em todo o mundo e é uma das formas mais antigas e apreciadas de lanche (Smith, 2021).

O milho-pipoca possui características distintas em relação ao milho comum. Estas diferenças incluem colmos mais finos, folhas geralmente em menor número e espigas menores, mais numerosas e normalmente posicionadas em uma altura mais elevada. Essas características tornam a planta mais suscetível ao acamamento e quebra do colmo, além de maior suscetibilidade a doenças e estresses abióticos (Sawazaki, 2001). Todavia, a principal característica que diferencia a pipoca dos outros tipos de milho é a capacidade de expansão dos grãos em resposta ao aquecimento (Ziegler, 2000). Quando os grãos são aquecidos a temperaturas acima de 180°C, eles sofrem expansão devido à presença de óleo e umidade no grão (Silva et al., 1993). Quanto maior a capacidade de expansão, melhor a qualidade da pipoca (Sawazaki, 2001).

O milho-pipoca é uma cultura altamente apreciada e com mercado global avaliado em US\$ 13,4 bilhões em 2023 (Gopinath et al., 2024). Assim como o milho comum, há um aumento significativo na demanda e representa um mercado promissor. Embora as empresas de empacotamento brasileiras possuíssem híbridos de alta qualidade, é relevante destacar que a maioria desses híbridos foi desenvolvida fora do país, principalmente nos Estados Unidos da América e na

Argentina. Como resultado, apesar do crescente volume de exportações, o Brasil ainda importa uma parcela significativa do milho-pipoca que consome, conforme informações do Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços (MDIC) (2024). Para diminuir essa dependência de importações e impulsionar a produção nacional, uma estratégia eficiente é o desenvolvimento de genótipos mais adaptados e produtivos, que apresentem qualidade comparável aos híbridos norte-americanos.

A região centro-oeste é a principal produtora de milho-pipoca no Brasil, com destaque especial para o estado do Mato Grosso. Os produtores de milho-pipoca no Brasil são em sua maioria os mesmos que cultivam soja, uma vez que a pipoca é uma cultura de baixo custo e com preços competitivos no mercado. Por essa razão, a produção de milho-pipoca se tornou uma opção atrativa para os plantios de safrinha, ou seja, para o período de cultivo após a colheita da safra principal de soja (Chancellor, 2021).

Neste contexto, o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes a estresses abióticos, com maior eficiência na utilização de recursos como água e nutrientes, é fundamental para garantir a segurança alimentar e o sucesso dessa cultura no Brasil. Portanto, a pesquisa contínua e o avanço na adaptação do milho-pipoca às condições nacionais são vitais para o fortalecimento da produção interna e a promoção de uma agricultura sustentável no país.

3.2 Fósforo no *continuum* solo-planta

A disponibilidade adequada de fósforo é essencial para o crescimento saudável das plantas e para alcançar altos níveis de produtividade agrícola. O fósforo é um dos principais macronutrientes necessários para o desenvolvimento vegetal, atuando em processos vitais, como na transferência de energia e síntese de compostos essenciais, incluindo o DNA, o RNA e os fosfolípidios que compõem as membranas celulares (Fageria et al., 2017; Kleinert et al., 2017; Vengavasi et al., 2017; Alewell et al., 2020).

Apesar de sua importância, a deficiência de fósforo no solo é um problema global de grande relevância. Estudos relatam que aproximadamente 30% dos solos aráveis em todo o mundo são deficientes em P (MacDonald et al., 2011; Su et al., 2021). No contexto brasileiro, em aproximadamente 90% das análises realizadas nos solos do país há indícios de teores baixos de P disponível para as culturas, o

que implica na necessidade de aplicação de altas quantidades desse nutriente para suprir a demanda das plantas, representando um custo significativo para os agricultores (Yang et al., 2017; Lambers e Plaxton, 2018; Pavinato et al., 2021). Além disso, a baixa disponibilidade de fósforo pode limitar a produtividade agrícola, impactando a segurança alimentar e a economia do país.

O ciclo do P é um processo fundamental na dinâmica dos nutrientes e tem implicações cruciais na agricultura e na qualidade da água. A ciclagem do nutriente no ambiente começa com o intemperismo das rochas ricas em fosfatos, liberando íons fosfato no solo. O fósforo é, então, absorvido pelas partículas do solo, retido por adsorção e também é liberado pela mineralização da matéria orgânica. As plantas absorvem o fósforo do solo e esse nutriente é transferido ao longo da cadeia alimentar. Resíduos orgânicos retornam o fósforo ao solo, que pode ser lixiviado pelas águas e fixado a partículas do solo, limitando sua disponibilidade para as plantas (De Godoy et al., 2021).

Naturalmente, o fósforo presente no solo pode existir em diferentes formas químicas, sendo classificado em formas orgânicas e inorgânicas (Pi). As formas orgânicas desse mineral consistem em uma variedade de compostos que diferem em termos de biodisponibilidade e solubilidade (Novais e Barros, 1997; Condrón et al., 2005; Weihrauch e Opp, 2018; Doydora et al., 2020). No solo, a maior proporção de fósforo encontra-se fixada em formas que as plantas não conseguem absorver diretamente. É essencial compreender que as formas disponíveis e assimiláveis pelas plantas são os íons ortofosfatos (H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-}), os quais estão presentes na solução do solo, correspondendo a apenas 0,01% do total de fósforo disponível (Penn e Camberato, 2019; Mitter et al., 2021).

A maioria das formas orgânicas de P é geralmente encontrada como inositol P, anidridos de ácido fosfórico e fosfonatos, os quais têm origem em resíduos vegetais e esterco animal, estando indisponível para a absorção imediata pelas plantas (Gerke, 2015; Fageria et al., 2017; Weihrauch e Opp, 2018; Pavinato et al., 2021). Já as formas inorgânicas de P, prontamente disponíveis para absorção e utilização pelas plantas, englobam minerais contendo P precipitado, nos quais o fósforo é parte integrante de sua estrutura. Exemplos desses minerais incluem apatitas, estrengita e variscita, todos caracterizados por alta estabilidade, cuja solubilidade é influenciada pelo pH do solo (Figura 1). Outros fatores, como o teor inicial de fósforo no solo, a textura, a temperatura, a umidade e a aeração, também influenciam a disponibilidade do nutriente (Filippelli, 2002; Kozerski e Ferreira, 2023).

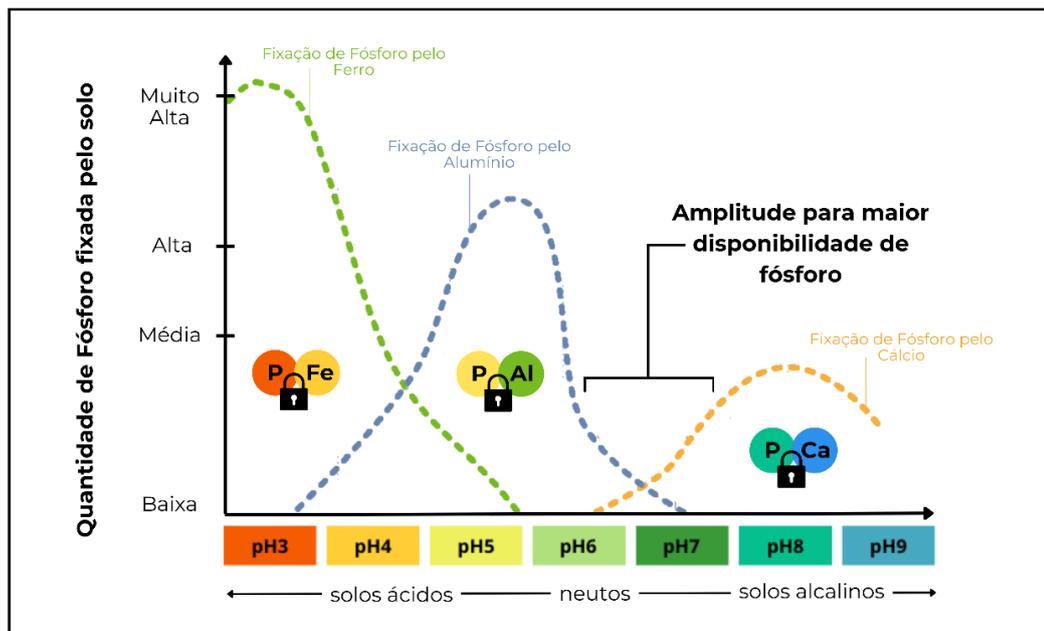


Figura 1. Efeito do pH na disponibilidade de P no solo para as plantas.
Fonte: Adaptado de Hyland et al. (2005).

Mesmo com aplicação de fertilizantes no solo, o fósforo é um dos elementos menos acessíveis para as plantas. Essa baixa acessibilidade decorre principalmente de sua moderada solubilidade e pouca mobilidade no ambiente do solo (Ouyang et al., 2016; Liu et al., 2020; Oliveira-Paiva et al., 2023). O fósforo interage rapidamente com diversos cátions, o que reduz sua disponibilidade para as plantas, tornando-se, assim, escassamente disponível para absorção pelas plantas, principalmente devido aos fluxos difusivos limitados de P no solo em direção à superfície das raízes (Novais e Smith, 1999; Amadou et al., 2022). Essa interação é notadamente significativa com cátions divalentes, como cálcio (Ca), ferro (Fe) e alumínio (Al), formando minerais fosfatados insolúveis (Figura 1). A dissolução depende de vários fatores, incluindo o pH do solo e a presença de partículas específicas (Shen et al., 2011; Barrow, 2017; Fageria et al., 2017; Doydora et al., 2020).

Os óxidos de alumínio e ferro, que se concentram na fração argilosa de solos ácidos devido ao intemperismo intenso de minerais primários, desempenham função fundamental na geração de estresses abióticos, resultando em ocorrência generalizada de toxicidade de alumínio e baixa disponibilidade de fósforo em solos tropicais. Além disso, a difusão de fósforo em solos altamente intemperizados é

acentuadamente influenciada pelo teor de umidade do solo, que varia sazonalmente, resultando em suprimento descontínuo de P para as plantas e, conseqüentemente, em absorção irregular desse nutriente (Liebisch et al., 2014; Zhu et al., 2018). Os solos tropicais apresentam características particulares, como alta intemperização, baixa disponibilidade de fósforo e forte interação com a matéria orgânica e os minerais de argila, exigindo abordagens específicas para a otimização da nutrição vegetal (De Novais et al., 1985).

O *continuum* solo-planta é bem dinâmico, sendo difícil definir o pH ótimo para as diversas culturas. Em geral, a máxima disponibilidade do fósforo para as plantas ocorre com os valores de pH entre 6 e 7 (Figura 1). Com o aumento do pH ocorre menor adsorção entre o fosfato e a superfície adsorvente. Contudo, em solos com pH muito alcalino, quase todo o P inorgânico encontra-se como PO_4^{3-} , forma não absorvida pelas plantas. Ademais, em solos calcários o P pode ser precipitado como hidroxiapatita ou como carbonatoapatita (Haefele et al., 2014).

Essas formas inorgânicas de P possuem função fundamental na retenção e liberação gradual de fósforo, afetando diretamente sua disponibilidade para as plantas. A dinâmica das formas inorgânicas de P é influenciada por diversos fatores, incluindo a acidez do solo e as atividades biológicas da rizosfera, destacando a importância da interação entre os componentes do solo, plantas e microrganismos para otimizar a disponibilidade desse nutriente vital para o crescimento das culturas (Shen et al., 2011; Elhaissofi et al., 2022). Além da fração de P orgânico e dos fertilizantes fosfatados prontamente disponíveis para as plantas, atividades tanto das raízes quanto dos microrganismos associados desempenham função essencial em melhorar a disponibilidade de fósforo na rizosfera (Blume et al., 2016; Elhaissofi et al., 2022).

Após a absorção nas células da raiz, o Pi é subsequentemente usado para sintetizar compostos contendo P, como ATP ou fosfolipídios, ou pode entrar no vacúolo, onde é armazenado (Siddiqi et al., 1981; Mlodzińska e Zboińska, 2016). Dessa forma, quando há excesso de Pi disponível, ele é absorvido e armazenado em vacúolos na forma de ortofosfato em células vegetativas (Liu et al., 2015), enquanto nas sementes o Pi é acondicionado em vacúolos especializados no armazenamento de proteínas na forma de fitato (Yang et al., 2017).

Como o Pi pode não estar disponível em concentrações ideais durante todo o ciclo de vida da planta, sempre que há um declínio na concentração de Pi no

citósol os suprimentos de Pi são operados pelo *pool* de vacúolos-Pi (Liu et al., 2015). Portanto, o influxo e o efluxo otimizados de Pi dos vacúolos são essenciais para manter a homeostase do Pi em outras organelas e tecidos, o que se amplia também de forma regular para toda a planta (Srivastava et al., 2018).

A importância de controlar o nível de Pi também se estende a outras organelas, incluindo plastídios, mitocôndrias e Golgi (Versaw e Garcia, 2017). Ademais, a deficiência de Pi reduz a produção de ATP e diminui a assimilação de CO₂, ocasionando escassez de disponibilidade de sacarose solúvel e acúmulo de amido (Guo et al., 2014). Inobstante, o Pi tem efeito importante no metabolismo do carbono vegetal (Carstensen et al., 2018) envolvido na fotossíntese (Guo et al., 2014).

Em conclusão, o estudo de respostas fisiológicas, como a expressão fotossintética ao déficit de Pi em genótipos de milho-pipoca tende a contribuir para com o entendimento da adaptação da planta ao estresse desse fundamental nutriente.

3.3 Mecanismos de solubilização de fósforo

A disponibilidade limitada de fósforo na forma de íons ortofosfatos representa um desafio para as plantas (Penn e Camberato, 2019; Mitter et al., 2021). Isso resultou na evolução de estratégias adaptativas em plantas cultivadas em solos com baixa disponibilidade de P (Fritsche-Neto e Borém, 2022), como alterações morfológicas nas raízes, por meio do crescimento de pelos radiculares mais densos e longos, que estão relacionados à secreção de ácidos orgânicos e fosfatases ácidas para liberar fósforo inorgânico (Pi) de fontes orgânicas no solo (López-Arredondo et al., 2014; Zhang et al., 2014; Lan et al., 2018).

Outro mecanismo envolvido na aquisição do P é o recrutamento seletivo de microrganismos presentes no solo (Figura 2), processo fundamental que a planta desempenha (Edwards et al., 2015). Acredita-se que sob estresse a planta ajusta a composição dos exsudatos radiculares com o objetivo de selecionar microrganismos benéficos, formando, assim, uma comunidade ativa que age como sua primeira linha de defesa contra possíveis danos (Castrillo et al., 2017)

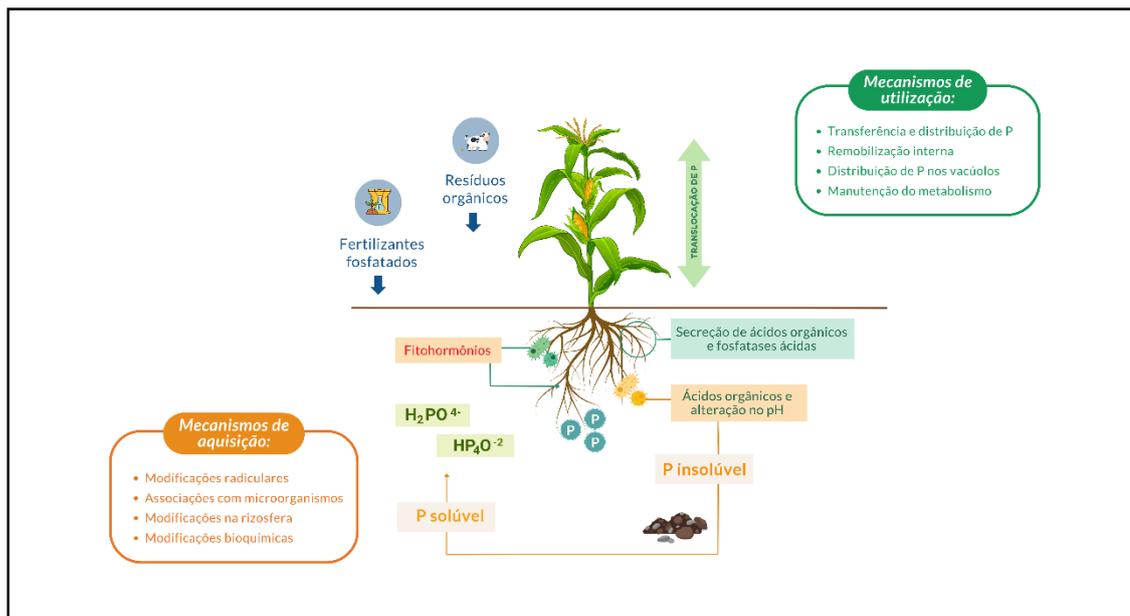


Figura 2. Mecanismos de aquisição e utilização de fósforo (P) em plantas.
 Fonte: Adaptado de Fritsche-Neto e Borém (2022).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato atuam transformando e tornando acessíveis para as plantas as formas complexadas de fósforo solúvel. Isso ocorre por meio de processos como solubilização, quelação, mineralização e imobilização do fósforo, que contribuem diretamente ou indiretamente para o desenvolvimento das plantas (Yahya et al., 2021; Timofeeva et al., 2022; Pang et al., 2024).

A relação entre os microrganismos e o solo na rizosfera envolve a ocorrência de processos metabólicos importantes, tais como a liberação de ácidos orgânicos, a produção de sideróforos, a secreção de íons H^+ , a produção de enzimas fosfatases, a fixação de nitrogênio e a produção de fitormônios (Souto, 2020; Mendes et al., 2021; Pang et al., 2024). Dentre esses mecanismos, a liberação de ácidos orgânicos é um dos mais importantes (Barroso, 2006; Inacio et al., 2020).

Os ácidos orgânicos são produtos resultantes do metabolismo microbiano, predominantemente provenientes de processos de respiração oxidativa ou fermentação de fontes orgânicas, como a glicose. Sua composição pode variar dependendo da natureza do meio, das condições nutricionais, fisiológicas e do crescimento da cultura (Barroso, 2006). Diferentes espécies bacterianas, tais como *Serratia* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. e *Azospirillum* sp. têm a capacidade de

sintetizar diversos ácidos orgânicos, incluindo o lático, o málico, o acético, o oxálico e o glucônico (Tahir et al., 2013; Behera et al., 2014; Liang et al., 2020). Dentre esses, o ácido glucônico é especialmente conhecido por quelar os cátions fixados ao P insolúvel, favorecendo a sua solubilização (Yu et al., 2019).

Além disso, a produção de sideróforos pelos microrganismos rizosféricos também possui grande importância para a dissolução do fosfato agregado ao ferro (Sharma et al., 2013; Batista et al., 2018; Singh et al., 2022). Em estudos de Batista et al. (2018) implementados na Embrapa Milho e Sorgo, a produção de sideróforos pelos isolados bacterianos solubilizadores de fosfato variou significativamente e foi correlacionada com a capacidade de solubilização de P-Fe. No entanto, a eficiência desses ácidos inorgânicos para a disponibilização do P ainda se mostra consideravelmente menor em comparação aos ácidos orgânicos (Alori et al., 2017).

Ademais, a mineralização do fósforo ocorre pela ação de microrganismos produtores de enzimas denominadas fosfatases e fitases, que catalizam a hidrólise de ésteres e anidridos de H_3PO_4 . Assim, o fósforo é liberado de forma imediata para a solução do solo e se torna disponível para as plantas (Gobelak et al., 2015; Li et al., 2015; Afzal et al., 2017; Lidbury et al., 2022; Fitriatin e Joy, 2024).

Compreender os intrincados mecanismos de solubilização de fosfato é essencial para desvendar a complexa relação entre plantas e microrganismos no solo. Os processos de solubilização, quelação e liberação de fósforo representam um elo crítico na nutrição vegetal e na manutenção da fertilidade do solo. Ao desvendar esses mecanismos, pode-se não apenas ampliar o conhecimento sobre a dinâmica do fósforo no ecossistema, mas também explorar oportunidades promissoras para aprimorar a eficiência do uso desse nutriente vital na agricultura e, assim, contribuir para a promoção do crescimento mais sustentável das plantas.

3.4 Promoção do crescimento de plantas por microrganismos solubilizadores de fosfatos

Para otimizar a eficácia agronômica da solubilização e disponibilização do fosfato inorgânico, a utilização de microrganismos benéficos para a agricultura envolvidos na ciclagem de fósforo tem emergido como uma estratégia biotecnológica promissora, conquistando interesse em âmbito global ao longo das últimas décadas (Elhaissofi et al., 2022). Esses microrganismos são comumente denominados solubilizadores de fosfato e considerados promotores do crescimento

de plantas, em razão de suas habilidades de estimulação do desenvolvimento vegetal, donde adveio a sigla PGPM, abreviatura dos termos ingleses *plant growth promotion microorganisms* (Compant et al., 2019).

Dentre os PGPM, as rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) se destacam pela notável capacidade de solubilização de fosfato, acarretando benefícios substanciais para o crescimento e produtividade das plantas (Fahad et al., 2015). Por exemplo, *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia gladioli*, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas* sp e *Serratia marcescens* têm demonstrado evidente capacidade de solubilizar fosfato e disponibilizar fósforo para as plantas, conforme mencionado em estudos como os de Rodríguez e Fraga (1999), Abreu (2014), Bodhankar et al., (2017), Chen et al., (2022) e Luo et al., (2024).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSPs) possuem a capacidade de tornar o fósforo disponível mesmo quando complexado com cálcio, ferro e alumínio no solo (Richardson e Simpsons, 2011; Vassilev et al., 2014). Além disso, esses MSPs também produzem compostos que inibem o crescimento de fungos e bactérias fitopatogênicas, bem como induzem à resistência sistêmica em plantas contra patógenos (Rodríguez et al., 2020).

A utilização combinada de fosfatos de rocha e microrganismos solubilizadores tem sido reconhecida como uma estratégia sustentável, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental. Essa abordagem tem proporcionado ganhos significativos em produtividade, economia de investimentos e aumento da renda para os agricultores (Richardson, 2001; Gomes et al., 2014; Elhaissofi et al., 2022; Aslam et al., 2024).

Em estudo realizado com sementes de algodão, soja e milho inoculadas com a bactéria *Bacillus subtilis*, constatou-se aumento significativo na concentração de fósforo nas folhas em comparação com o grupo controle. Especificamente no caso do milho, que estava sendo desenvolvido em solo com deficiência desse nutriente, a absorção de fósforo foi ainda mais acentuada. Os resultados indicam que a presença do *Bacillus subtilis* no solo promove o aumento da atividade das enzimas fosfatases, contribuindo para uma maior disponibilidade de fósforo no ambiente (Araujo, 2008).

Foi demonstrado por Kaur e Reddy (2015) que a inoculação das plantas de milho comum e trigo com os microrganismos solubilizadores de fosfato *Pantoea cyripedii* e *P. plecoglossicida*, em combinação com a fertilização de Pi, resultou em notável melhoria nos teores de fósforo tanto na parte aérea (37% com *Pantoea cyripedii* e 186% com *P. plecoglossicida*), quanto nas raízes (76% e 91%, respectivamente, com *P. cyripedii* e *P. plecoglossicida*), bem como no rendimento dessas culturas, com aumento de 20% para o milho e de 16% para o trigo.

Outra vantagem do uso de microrganismos solubilizadores de fosfatos é a capacidade de promover alterações na morfologia radicular das plantas, o que resulta em maior eficiência na absorção de nutrientes de baixa mobilidade, como o fósforo. Essa modificação na estrutura radicular pode contribuir para aumentar o contato entre as superfícies das raízes e as partículas do solo, um fator essencial para a absorção efetiva de água e nutrientes minerais presentes no solo por meio delas (Lyu et al., 2016; Wang et al., 2019; Deng et al., 2022; Silveira et al., 2024).

Estudos avaliando o efeito da inoculação com MSPs na cultura do milho comum demonstram que plantas que receberam microrganismos apresentaram maiores teores foliares de nitrogênio e fósforo (Bomfim et al., 2020; Pereira et al., 2020). Além disso, as plantas inoculadas também exibiram maior teor relativo de clorofila (Ferreira et al., 2022), maior massa seca (Cassan et al., 2016), incremento dos componentes de produção (Garcia et al., 2017), bem como maior produtividade da cultura (Machado et al., 2020).

Essa diversidade de atividades retrata o grande potencial dos microrganismos solubilizadores de fosfato como alternativas eficazes para implementação de uma agricultura sustentável, ecologicamente responsável e lucrativa (Rizvi et al., 2017; Rodríguez et al., 2020). Assim, a abordagem integrada, que combina o uso de fosfatos de rocha e microrganismos, abre caminho para a realização de práticas agrícolas mais eficientes e amigáveis para com o meio ambiente, contribuindo para uma produção agrícola mais resiliente e ecologicamente equilibrada.

Ao longo das últimas décadas a agricultura moderna tem sido caracterizada por avanços tecnológicos no melhoramento de culturas em resposta à crescente aplicação de fertilizantes. Os pesquisadores dedicaram-se a otimizar o rendimento sob diferentes práticas de manejo agrícola (Smith et al., 2004). Nesse período, o germoplasma foi selecionado visando à obtenção de alto rendimento de grãos,

especialmente em face do aumento do suprimento de nutrientes, sem consideração ao potencial do microbioma vegetal para melhorar a adaptação e a produtividade das culturas (Favela et al., 2021).

A promoção do crescimento de plantas por meio da interação com esses microrganismos representa um passo significativo em direção a uma agricultura mais sustentável e produtiva, na qual as plantas não apenas se adaptem melhor a solos com baixa disponibilidade de fósforo, mas também possam aproveitar de forma mais eficaz os nutrientes presentes. A combinação de esforços no melhoramento genético e na exploração biotecnológica de microrganismos benéficos, unindo ações de pesquisadores de diferentes áreas, portanto, promete oferecer soluções abrangentes para os desafios enfrentados na produção de milho-pipoca, contribuindo para um futuro agrícola mais resiliente e sustentável.

3.5 Efeito gênico em *Zea mays* para eficiência no uso do P

Algumas pesquisas têm se dedicado ao desenvolvimento de cultivares de milho comum que apresentem maior eficácia na resposta à deficiência de fósforo (P), como os exemplos dos trabalhos realizados por Machado et al. (1999), Brasil et al. (2007), Fidelis et al. (2010), Martins et al. (2015), Reis et al. (2017), Ribeiro et al. (2023) e Zeffa et al. (2024). Nesse contexto, para aprofundar a compreensão das causas genéticas subjacentes à eficiência do uso de P no milho, abordagens visando a investigar o tipo de ação gênica têm recebido destaque. O entendimento dessas ações gênicas é fundamental para orientar estratégias de seleção nos programas de melhoramento, resultando em ganhos expressivos.

A análise dialélica tem se revelado uma abordagem de elevado potencial em programas de melhoramento para a compreensão de efeitos gênicos envolvidos em características de importância econômica (Scapim et al., 2000; Hallauer et al., 2010; Cruz et al., 2016; Meirelles et al., 2016; Liu et al., 2018). Tal abordagem envolve o cruzamento de genitores geneticamente distintos para a característica de interesse, permitindo a análise da ação genética associada a essa característica (Cruz et al., 2016). Além disso, a partir dos cruzamentos dialélicos é possível avaliar a expressão da heterose e identificar híbridos superiores (Hallauer et al., 2010; Cruz et al., 2016).

Dentre os tipos de análise dialélica, o procedimento de Griffing é amplamente empregado e permite a estimação da capacidade geral de combinação

(CGC), que se refere à média da resposta de um genitor em uma série de cruzamentos e está relacionada aos efeitos aditivos dos alelos, bem como da capacidade específica de combinação (CEC), que quantifica a diferença entre o comportamento observado de um cruzamento específico em relação ao comportamento esperado com base nas capacidades gerais de combinação de seus genitores, sendo atribuída aos efeitos não-aditivos, quais sejam, dominância e epistasia (Cruz et al., 2012). A análise da capacidade combinatória é uma ferramenta valiosa, uma vez que auxilia na identificação de combinações híbridas superiores. Isso é relevante tanto para a produção imediata de híbridos comerciais quanto para a seleção de genitores que contribuirão para a formação de populações-base com alto potencial genético (Hallauer et al., 2010; Cruz et al., 2014).

A análise dialélica de Griffing tem se demonstrado particularmente promissora em estudos sobre efeitos gênicos em milho comum para a eficiência no uso do P. Nesse aspecto, estudo realizado por Fritsche-Neto et al. (2010) que investigaram os efeitos genéticos que regem a hereditariedade de características relacionadas à eficiência do uso de fósforo em 15 híbridos de milho comum, destacaram a maior importância dos efeitos não-aditivos sobre as características de massa seca da planta e P acumulado. Tal pesquisa destacou a necessidade de seleção nas combinações híbridas. Em outra análise, focada no comprimento do sistema radicular e na acumulação de matéria seca na parte aérea de 41 híbridos de milho comum submetidos a diferentes disponibilidades de fósforo, DoVale e Fritsche-Neto (2013) constataram que a capacidade da planta em adquirir P resultou em uso mais eficiente desse nutriente, evidenciando novamente a prevalência dos efeitos genéticos não-aditivos. Colombo et al. (2018) também observaram a predominância de efeitos não-aditivos sobre a produtividade de grãos em milho comum cultivado em diferentes níveis de adubação fosfatada, identificando genótipos que demonstraram eficiência e responsividade tanto em níveis altos quanto baixos de P.

Em milho-pipoca, Gerhardt et al. (2019) implementaram uma pesquisa com análise dialélica, em que foram avaliados 28 híbridos e seus genitores em diferentes locais e condições de disponibilidade de P no solo. Os resultados indicaram que a eficiência de utilização do P é característica com predomínio dos efeitos não-aditivos. Nesse cenário, a exploração da heterose, especialmente com a utilização de genitores com elevada capacidade de expansão, demonstrou ser a estratégia mais eficaz para obter genótipos eficientes e responsivos a baixos níveis

de P. Híbridos promissores, tais como P7 x L80, P7 x L59, P7 x L76 e P6 x L80, foram identificados e considerados como alternativas viáveis para cultivo em solos com carência de fósforo.

Em pesquisa correlata, Simão et al. (2022) avaliaram a morfofisiologia de genótipos de milho-pipoca em casa de vegetação utilizando vasos com substrato contendo menor disponibilidade do P. Demonstrou-se que menores reduções proporcionais ocorreram em características da parte aérea; portanto, os genótipos, ao se adaptarem à baixa disponibilidade de P, produziram folhas mais finas, com área foliar levemente menor. Além disso, foi possível inferir que os efeitos gênicos não-aditivos desempenharam função significativa no controle da maioria das características morfológicas e fisiológicas fundamentadas por pigmentos fotossintéticos, reforçando a importância do uso de híbridos como estratégia para mitigar o estresse ao nutriente. Contudo, devido ao efeito recíproco significativo para características relacionadas às trocas gasosas, a escolha do genitor feminino é essencial para obter maior desempenho em condição de baixo conteúdo de P.

Mais recentemente, Bispo et al. (2024) investigaram as respostas morfofisiológicas e proteômicas de duas linhagens de milho-pipoca contrastantes quanto à eficiência no uso do fósforo, L80 (P-ineficiente) e P7 (P-eficiente), sob condições de baixa e alta disponibilidade de P, tendo sido detectadas diferenças significativas na expressão de proteínas. Ao todo, 421 proteínas foram diferencialmente expressas em L80, ao passo que 436 em P7, as quais estão relacionadas à fotossíntese, biossíntese de proteínas e metabólitos, bem como no metabolismo energético. Detectou-se também que pigmentos flavonoides se acumularam em maior quantidade na linhagem P-eficiente. Essas descobertas oferecem novos *insights* para colaboração com programas de melhoramento para uso eficiente de fósforo em milho-pipoca.

No entanto, apesar dos avanços nesse campo, ainda há muito a ser explorado. As investigações com milho-pipoca em relação à eficiência no uso de P permanecem incipientes. Para enfrentar os desafios da agricultura moderna, é fundamental que se incentivem pesquisas com a busca de genótipos mais eficientes que atendam aos preceitos de uma agricultura sustentável. O desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições específicas de solo e ambientais é essencial para garantir a segurança alimentar e a preservação do meio ambiente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato

4.1.1 Isolados bacterianos

Os isolados bacterianos *Serratia marcescens* (UENF 22GI), *Herbaspirillum seropedicae* (UENF 19), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (UENF III501), *Bacillus* sp. (LMS71), *Bacillus megaterium* strains (B11), *Bacillus cereus* (J28), *Azospirillum brasilense* (AbV5) e *Leclercia adecarboxylata* (LMS 25) foram derivados da Coleção de Bactérias Promotoras do Crescimento do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBT), localizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Com o auxílio de alça bacteriológica de platina, cada isolado bacteriano foi plaqueado em placas de *Petri* contendo meio sólido DYGS (Rodrigues Neto, 1986), sendo incubado por 72h a 30°C em estufa bacteriológica de incubação. Para a obtenção do pré-inóculo, foi retirada uma colônia bacteriana da placa de *Petri* com o auxílio da alça bacteriológica, sendo disposta em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio líquido DYGS. A bactéria foi crescida a 30°C em 180 rpm durante 24h em agitador orbital. O inóculo foi preparado a partir de 150 µL do pré-inóculo, pipetado em *erlenmeyer* contendo 100 mL de meio líquido DIGYS e incubado novamente em agitador orbital a 180 rpm durante 24h a 30°C. Posteriormente, a leitura de

densidade óptica (DO) foi realizada em espectrofotômetro a 600 nm, objetivando-se uma concentração de $1,8 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹).

4.1.2 Seleção em meio sólido

A avaliação em meio NBRIP sólido contendo fosfato de cálcio (5 g L⁻¹) foi realizada até o 15º dia após a inoculação com repique no centro de uma placa de *Petri*, contendo duas repetições. Foi mensurado o diâmetro do halo da colônia e, então, no 15º dia foi calculado o índice de solubilização (IS) por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia mais um (Berraqueiro et al., 1976). A partir de então, estimou-se o índice de solubilização para cada estirpe bacteriana, cujas estimativas foram classificadas com base na escala proposta por Silva Filho e Vidor (2000), a saber: baixa solubilização (IS < 2), média solubilização ($2 \leq \text{IS} \leq 3$) e alta solubilização (IS > 3).

4.1.3 Seleção em meio líquido

Para a avaliação da eficiência de solubilização de termofosfato natural, foi utilizado o meio líquido MS para solubilização, conforme descrito por Nahas et al. (1994) (Barroso e Nahas, 2005). Foram colocados 40 mL de meio de cultivo distribuídos em *erlenmeyer* de 125 mL contendo 2,0 g.L⁻¹ de termofosfato natural como única fonte de P. Posteriormente, o meio foi autoclavado por 15min a 121°C e o pH foi ajustado para 7,5 com 110 µL de hidróxido de sódio (NaOH) a 1 M estéril. Em seguida, alíquotas de 200 µL de cada suspensão de células foram inoculadas em triplicata nesse meio de cultura e incubadas durante dez dias, sob agitação constante de 130 rpm, à temperatura de 28°C ± 2. Em seguida, as culturas foram transferidas para tubos do tipo Falcon e centrifugadas por 10min a 8.000 rpm, com o sobrenadante sendo, então, filtrado em papel de filtro tipo *whatman* nº42. Para a determinação do fósforo solubilizado foi utilizado o método colorimétrico de Murphy e Riley (1962) em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 880 nm, subtraindo-se o P solúvel contido nas amostras que foram incubadas do valor de P contido na amostra controle (meio de cultura com termofosfato sem inoculação), adotando-se uma curva padrão de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) para a quantificação do P em mg.L⁻¹. A partir dos oito isolados, *Serratia marcescens* (UENF 22GI), *Herbaspirillum seropedicae* (UENF 19), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (UENF III501), *Bacillus* sp. (LMS71), *Bacillus megaterium* strains

(B11), *Bacillus cereus* (J28), *Azospirillum brasilense* (AbV5) e *Leclercia adecarboxylata* (LMS 25), foram selecionadas as duas bactérias com maior índice de solubilização.

4.2 Genótipos avaliados

Foram utilizadas quatro linhagens S₇ genitoras – pré-selecionadas por suas categorizações quanto à eficiência no uso do P em solo (Gerhardt et al., 2017) – (Tabela 1) e seus seis híbridos dialélicos sem os recíprocos (Tabela 2).

Tabela 1. Caracterização das linhagens genitoras utilizadas.

Genitores	Geração de endogamia	Genealogia	Adaptação climática	Ciclo	Classificação EUP
P2	S ₇	Composto CMS-42: Embrapa	Temperada/Tropical	Precoce	ER
P7	S ₇	Híbrido Zaeli	Temperada/Tropical	Precoce	ER
L75	S ₇	UFV	Temperada/Tropical	Tardio	INR
L80	S ₇	UFV	Temperada/Tropical	Tardio	INR

ER: eficiente e responsiva no uso do fósforo; INR: ineficiente e não-responsiva no uso do fósforo.

Tabela 2. Esquema dos cruzamentos em dialelo.

Linhagens	P2	P7	L75	L80
P2	P2	P2 × P7	P2 × L75	P2 × L80
P7		P7	P7 × L75	P7 × L80
L75			L75	L75 × L80
L80				L80

Os cruzamentos para a obtenção da geração F₁ foram realizados em casa de vegetação da Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), no *Campus* Leonel Brizola da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ.

Foram semeadas três sementes em vasos de 35 L contendo substrato (terra) e N-P-K na seguinte proporção: 30 kg ha⁻¹ de N (na forma de ureia), 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅ (superfosfato triplo) e 60 kg ha⁻¹ de K₂O (cloreto de potássio). O desbaste foi feito aos 20 e 30 dias após a semeadura, mantendo-se duas plantas por vaso. Posteriormente, a adubação de cobertura (50 kg ha⁻¹ de N na forma de ureia) foi realizada aos 30 e 40 dias após a semeadura. A irrigação foi fornecida por meio de sistema automatizado com gotejadores, mantendo o solo a 70% da capacidade de campo.

Por ocasião do florescimento foram realizadas polinizações manuais aos pares, conforme descrito na Tabela 2. Para tanto, as espigas das plantas femininas foram cobertas antes do surgimento do estilo-estigmas com sacos plásticos transparentes. Essas espigas protegidas foram polinizadas com pólen coletado ao cobrir os pendões com sacos de papel (aproximadamente 24h). O pólen perde sua viabilidade em 8h e manter o pendão coberto por 24h garante que qualquer pólen viável presente no saco de papel seja proveniente do próprio pendão coberto. Foram realizados dez cruzamentos para obtenção de cada híbrido, com o intuito de obter quantidades suficientes de sementes para a etapa de avaliação dos genótipos.

4.3 Ensaio para avaliação de linhagens e híbridos

Essa etapa experimental também foi realizada em casa de vegetação da Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), situada no *Campus* Leonel Brizola da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ.

O experimento foi arranjado em blocos completos casualizados com quatro repetições, utilizando-se dez genótipos – quatro linhagens e seis híbridos dialélicos – em três condições [inoculação com *A. brasilense* (AbV5), inoculação com *L. adecarboxylata* (LMS 25) e sem inoculação], com uma planta por vaso, totalizando 120 unidades experimentais (Figura 3).

Para tanto, três sementes de cada genótipo foram pré-germinadas em papel *germitest* embebido em água destilada por 72h e, então, transferidas para vasos plásticos com 2,3 dm³, contendo substrato inerte composto por areia lavada, previamente submetida à análise de solo (Tabela Suplementar 1), com posterior adição de 20 g de termofosfato natural (Figura 3).

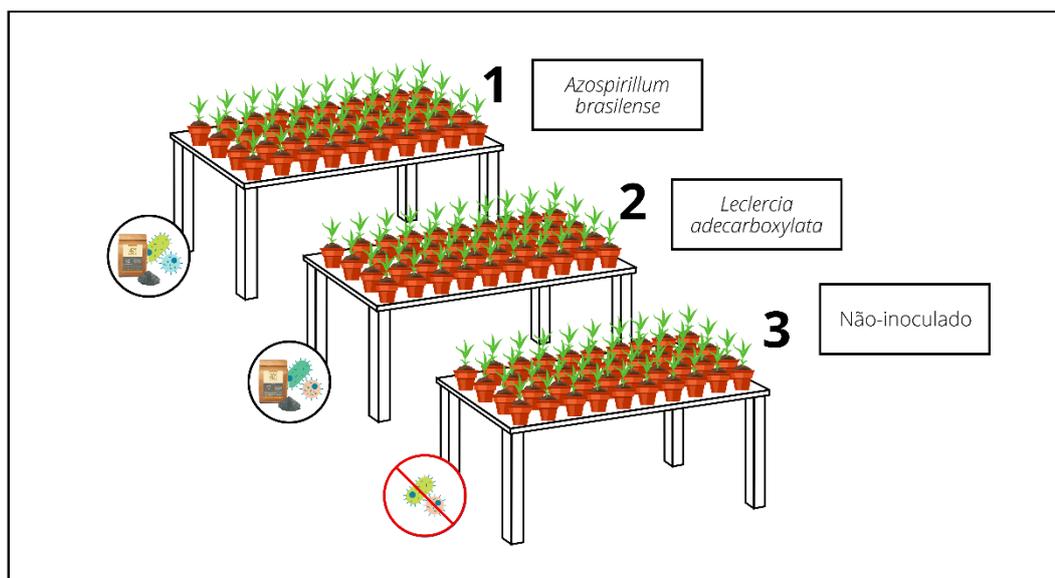


Figura 3. Representação ilustrativa da composição dos vasos e da disposição destes no experimento.

A partir do terceiro dia após a emergência das plantas foi aplicada a solução nutritiva, conforme descrito por Hoagland e Arnon (1950), diluída em $\frac{1}{4}$ da força, com modificação no fornecimento de P, na forma de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ contendo baixa concentração, no valor de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$. O volume de solução nutritiva foi aplicado de acordo com o crescimento da planta e fornecido diariamente até atingir o estágio vegetativo V4 (quatro folhas totalmente expandidas) aos vinte dias após a semeadura.

4.3.1 Características morfológicas avaliadas

4.3.1.1 Medições foliares

A altura de planta aos 20 dias foi quantificada utilizando uma régua graduada e expressa em cm. As estimativas da área foliar, expressas em cm^2 , foram obtidas por meio do *software ImageJ*, em que as folhas foram retiradas e identificadas, a partir das quais as imagens foram registradas por meio do *scanner Plustek OpticPro (A320L)*. O diâmetro de colmo foi estimado com o auxílio de paquímetro digital e expresso em cm.

4.3.1.2 Massa seca da parte aérea

Folhas e colmos foram separados das raízes e coletados em estágio V4 com o auxílio de um estilete. Após, foram acondicionados em sacos de papel e armazenados em estufa a 70°C por 72h para determinação da massa seca da parte aérea (g).

4.3.2 Quantificação de fósforo nas plantas

Após a secagem do material em estufa, as amostras da parte aérea foram moídas. Em seguida, essas amostras foram submetidas à digestão com ácido nítrico (HNO₃) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O fósforo (P) foi determinado em espectrômetro de emissão atômica, modelo ICPE-9000, com fonte de indução de plasma acoplada.

A eficiência do uso do fósforo (PUE – mg.mg⁻¹) foi calculada pela razão entre a massa seca da parte aérea da planta (SDW) e o P total aplicado, por meio da seguinte expressão proposta por Moll et al. (1982):

$$PUE = \frac{(SDW)}{P \text{ total aplicado}}$$

A eficiência de absorção do fósforo (mg.mg⁻¹) – sem o conteúdo de P na raiz (PU_pE-w/oR) – foi calculada pela razão entre o conteúdo de P na parte aérea e o P total aplicado, pela seguinte fórmula proposta por Moll et al. (1982):

$$PU_{pE} = \frac{(\text{conteúdo de P na parte aérea})}{P \text{ total aplicado}}$$

4.3.3 Variáveis fisiológicas avaliadas

4.3.3.1 Pigmentos foliares

Os teores de clorofila (Chl, μmol cm⁻²), flavonoides (Flav, μmol cm⁻²), antocianinas (Anth, μmol cm⁻²) e o índice de balanço de nitrogênio (NBI, μmol cm⁻²)

²) foram quantificados no terço médio da última folha desenvolvida (V4) de cada planta, utilizando-se o medidor portátil Dualox® (FORCE-A, Orsay, França). As avaliações foram realizadas no período das 09h às 10h, um dia antes da colheita do experimento, aos vinte dias após a semeadura.

4.3.3.2 Trocas gasosas foliares

As trocas gasosas – taxa fotossintética líquida (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e taxa de transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) – foram estimadas na última folha desenvolvida de cada planta com o auxílio de um analisador de gás infravermelho (IRGA), modelo LI-6400 (LI-COR, Lincoln, NE, USA), equipado com fonte de luz 6400-40 LCF (LI-COR), um dia antes da colheita, entre 10h30min e 14h30min. As condições ambientais da câmara foliar consistiram na densidade de fluxo de fótons fotossintetizantes de $1.500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, na concentração de 400mmol mol^{-1} de CO_2 , com umidade relativa do ar entre 55 e 60% e temperatura de 25°C .

4.3.3.3 Fluorescência da clorofila

Para a estimativa dos índices de fluorescência da clorofila – F_0 (fluorescência inicial), F_m (fluorescência máxima) e da razão entre essas (F_v/F_m , em que: $F_v = F_m - F_0$) – foi utilizado o dispositivo portátil FluorPen FP 110 (PSI, Drásov, República Tcheca), adotando-se o protocolo OJIP, que permite observar as principais mudanças que ocorrem durante a exposição de plantas à alta irradiância. Para garantir a precisão das estimativas, as avaliações foram realizadas entre 3h e 5h da manhã, sempre no terço médio da última folha desenvolvida.

4.4 Contagem de bactérias

Para a quantificação de bactérias heterotróficas totais e bactérias diazotróficas associadas às raízes das plantas de milho-pipoca, 1 g de raiz lavada em água corrente foi macerado em 9 mL de solução salina NaCl a 0,85% (10^{-1}) e diluído serialmente até 10^{-7} . Alíquotas de 100 μL de cada diluição (três repetições por diluição) foram pipetadas em vidros de penicilina contendo 5 mL de meio JNFB semissólido sem nitrogênio (Baldani et al., 2014) e incubadas em estufa a 30°C por sete dias. A formação de uma película branca em forma de véu caracteriza o

crescimento diazotrófico positivo típico. O tamanho da população foi estimado com base em Tabela de Mc Crady, empregada para determinar o número mais provável (NMP) (Baldani et al., 2014). Para a quantificação de bactérias totais, alíquotas de 100 µL das diluições seriadas foram inseridas em placas de *Petri* contendo meio sólido, com sua população quantificada por meio da contagem de colônias expressas em UFC.mL⁻¹ (unidades formadoras de colônia). Os resultados foram categorizados em porcentagem por grama de massa fresca da raiz.

4.5 Análises estatístico-genéticas

Foi realizada a análise de variância individual de acordo com o modelo $Y_{ij} = \mu + g_i + b_j + \varepsilon_{ij}$, em que Y_{ij} : valor observado do *i*-ésimo genótipo no *j*-ésimo bloco, μ : constante geral, g_i : efeito fixo atribuído ao *i*-ésimo genótipo, b_j : efeito aleatório do bloco *j*, e ε_{ij} : erro aleatório associado à observação Y_{ij} .

Posteriormente, foi realizada a análise de variância conjunta com base no modelo estatístico: $Y_{ijk} = \mu + G_i + B/A_{jk} + A_j + GA_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, em que Y_{ijk} : observação do *i*-ésimo genótipo na *j*-ésima disponibilidade de P no *k*-ésimo bloco; μ : é a constante geral, G_i : efeito fixo do *i*-ésimo genótipo, B/A_{jk} : efeito aleatório do *k*-ésimo bloco dentro da condição *j* de P, A_j : efeito fixo da *j*-ésima condição de P, GA_{ij} : efeito fixo da interação entre o *i*-ésimo genótipo e a *j*-ésima condição de P, e ε_{ijk} : erro aleatório experimental médio associado à observação Y_{ijk} .

4.5.1 Estimativas da capacidade geral e específica de combinação

As análises de capacidade combinatória foram realizadas de acordo com o Método 1, Modelo B, de Griffing (1956), no qual são incluídas $p(p+1)/2$ combinações e considera-se os genótipos como efeito fixo, sem inclusão dos recíprocos. O modelo estatístico considerado para a análise foi $Y_{ij} = \mu + g_i + g_j + s_{ij}$, em que Y_{ij} é a observação da combinação híbrida ($i \neq j$), μ é média, g_i e g_j são os efeitos da capacidade geral do *i*-ésimo ou *j*-ésimo genitor ($i, j = 1, 2, 3$ e 4), s_{ij} é o efeito da capacidade específica de combinação para os cruzamentos entre os genitores *i* e *j*, e ε_{ij} = erro experimental médio associado à observação Y_{ij} [$NID(0, \sigma^2)$].

5. RESULTADOS

5.1 Prospecção de cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato

Em meio sólido o isolado *A. brasilense* se destacou por seu mais elevado índice de solubilização, sendo um candidato promissor para futuros ensaios de associação com plantas. *S. marcescens*, *B. cereus* e *L. adecarboxylata* também apresentaram capacidade de solubilização de P, sendo classificadas como estirpes de média solubilização. Já os isolados *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Bacillus* sp. e *B. megaterium* não demonstraram qualquer atividade de solubilização (Figura 4 e Tabela 3).

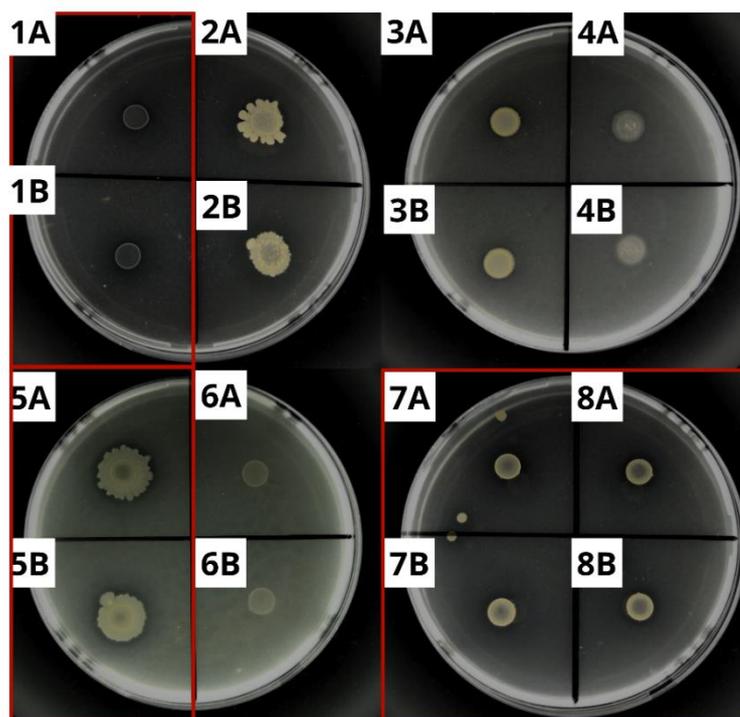


Figura 4. Imagens ilustrativas da disposição de culturas bacterianas cultivadas em placas de Petri para estimação de índices de solubilização de fósforo, na seguinte ordem de repetições A e B: 1- *Leclercia adecarboxylata*; 2- *Bacillus megaterium*; 3- *Herbaspirillum seropedicae*; 4- *Bacillus sp.*; 5- *Bacillus cereus*; 6- *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; 7- *Azospirillum brasilense*; e 8- *Serratia marcescens*.

Tabela 3. Estimativas do índice de solubilização de fósforo de isolados bacterianos cultivados em meio sólido.

Bactéria	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice de Solubilização (IS)
<i>A. brasilense</i>	1,7	0,6	3,8
<i>S. marcescens</i>	1,0	0,7	2,4
<i>B. cereus</i>	1,6	1,4	2,1
<i>H. rubrisubalbicans</i>	0,0	0,7	0,0
<i>H. seropedicae</i>	0,0	0,7	0,0
<i>Bacillus sp.</i>	0,0	0,9	0,0
<i>L. adecarboxylata</i>	0,7	0,6	2,1
<i>B. megaterium</i>	0,0	1,2	0,0

A averiguação dos resultados de solubilização em meio líquido revelou que embora os índices de solubilização tenha variado entre os isolados estudados ao

longo dos quinze dias de avaliação, *A. brasilense* e *L. adecarboxylata* apresentaram as melhores dinâmicas. Nesse sentido, apesar de *L. adecarboxylata* ter se alocado na quarta colocação com base na avaliação da solubilização, esse isolado destacou-se por expressar o maior valor de solubilização inicial do P, evidenciando-se também como um candidato promissor para testes de inoculação em plantas. Além disso, a curva de solubilização em meio líquido demonstrou que, apesar de alguns isolados não terem apresentado índice de solubilização satisfatório no teste de meio sólido, em meio líquido todos foram capazes de solubilizar o P, com exceção de *H. rubrisubalbicans*, que não demonstrou atividade de solubilização (Figura 5).

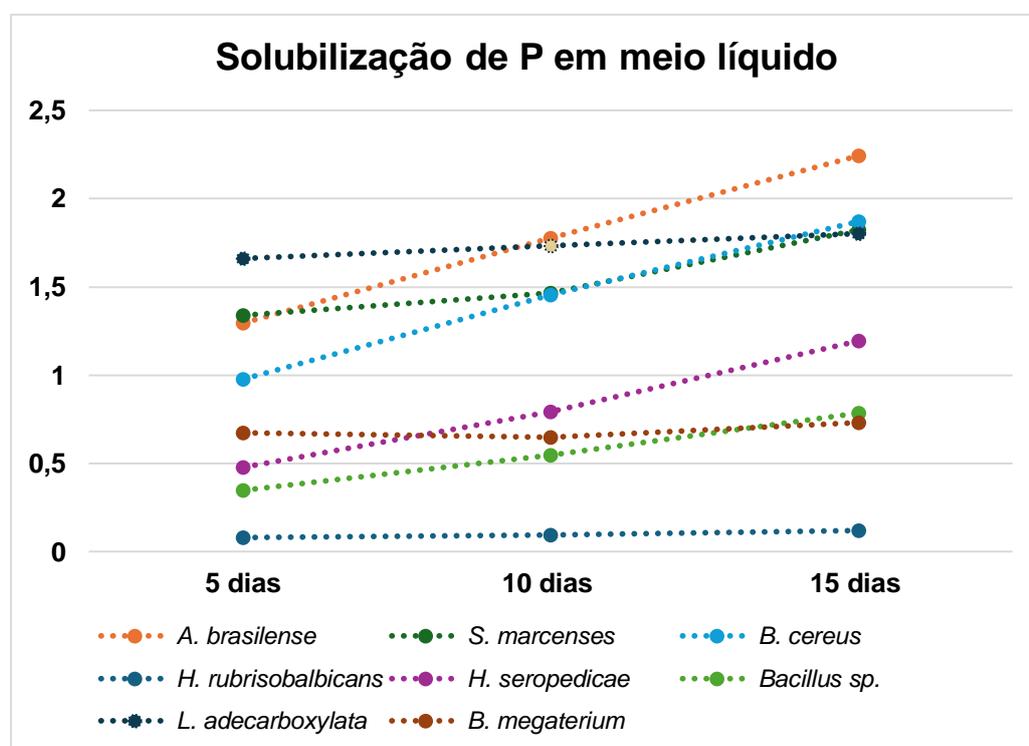


Figura 5. Índices de solubilização de fósforo em meio líquido contendo termofosfato natural como única fonte de P para oito espécies bacterianas.

Em conjunto, os resultados da solubilização possibilitaram selecionar as espécies *A. brasilense* e *L. adecarboxylata* para continuidade desta pesquisa visando à inoculação destas em linhagens e híbridos de milho-pipoca em casa de vegetação, próximo passo deste trabalho.

5.2 Consequências da inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato na morfologia vegetal e na eficiência no uso do fósforo

Decorrente da inoculação com *A. brasilense* e *L. adecarboxylata*, bem como para com ausência de inoculação (controle), a análise de variância individual foi estruturada com a partição de genótipos em linhagens (L) e híbridos simples (H); por sua vez, a análise de variância conjunta considerou os efeitos associados das linhagens e híbridos como genótipos (G) e as inoculações como efeito de ambientes (A), obtendo-se, por conseguinte, a interação genótipos *versus* ambientes (GxA). Na ANOVA conjunta observou-se diferença significativa entre os genótipos (G) e em condições de inoculação (A) em $p \leq 0,01$ para todas as características morfológicas estudadas (altura da planta aos 20 dias, AP; área foliar, AF; diâmetro do colmo, DC; e massa seca foliar, MSF), bem como para a eficiência no uso do fósforo (PUE) e eficiência na aquisição do fósforo (PUPE). Na interação GxA a significância ocorreu para MSF e PUE em nível de 1% de probabilidade pelo teste F (Tabela 4).

Na condição inoculada com *A. brasilense* foi observada diferença significativa entre os genótipos avaliados para AP, AF, MSF, PUE e PUPE. Em se tratando das linhagens, observou-se diferença significativa para AF, MSF, PUE e PUPE. Entre os híbridos, foram observadas diferenças significativas para AP, DC, PUE e PUPE. Avaliando o contraste L vs H, houve diferenças significativas para as quatro características morfológicas avaliadas, além de PUE e PUPE (Tabela 4).

Considerando-se a inoculação com *L. adecarboxylata* os genótipos se diferiram significativamente para AP, AF e PUE em $p \leq 0,01$ e para MSF e PUPE em $p \leq 0,05$, enquanto as linhagens se diferiram apenas para as características de uso e aquisição de P. Os híbridos exibiram diferenças significativas para AP, AF, MSF e PUPE, o mesmo ocorrendo com o contraste L vs H, mas com a inclusão de PUE (Tabela 4).

Em relação à condição controle (não inoculada), observaram-se diferenças significativas entre os genótipos para todas as características morfológicas, o que também ocorreu entre os híbridos. Já entre as linhagens, essas diferenças não foram detectadas apenas para DC. No contraste L vs H houve diferença significativa para DC e os estimadores da aquisição e uso do fósforo (PUE e PUPE) (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância individual por ambiente e conjunta de características morfológicas de quatro genitores e seis combinações híbridas de milho-pipoca cultivados com duas espécies bacterianas e sem inoculação.

		Quadrados Médios												
		F V	GL	AP	AF	DC	MSF	PUE	PUpE					
Análise Conjunta	Genótipo (G)	9	12,50	**	365,39	**	3,51	**	1,12	**	6989,17	**	6,09	**
	Ambiente (A)	2	191,97	**	5299,06	**	48,56	**	3,22	**	96116,77	**	4,05	**
	GXA	18	43,97	ns	134,65	ns	1,67	ns	0,84	**	5343,60	**	1,52	ns
CV (%)				10,68	20,33	14,76	21,67	19,19	24,42					
<i>Azospirillum brasiliense</i>	Genótipo (G)	9	6,20	**	358,02	**	3,72	ns	0,14	**	9078,56	**	3,73	**
	Linhagem (L)	3	1,34	ns	399,64	*	1,35	ns	0,18	*	10505,22	**	4,17	*
	Híbrido (H)	5	4,64	**	119,80	ns	1,91	*	0,03	ns	4799,20	**	4,03	*
	L vs H	1	25,61	**	1424,28	**	5,28	*	0,45	**	26195,41	**	3,31	*
CV (%)				10,44	20,62	17,81	22,62	17,03	26,31					

Tabela 4 – Cont.

		Quadrados Médios												
		F V	GL	AP	AF	DC	MSF	PUE	PUpE					
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Genótipo (G)	9	7,55	**	151,73	**	1,13	ns	0,05	*	3232,44	**	0,01	*
	Linhagem (L)	3	6,43	ns	67,71	ns	1,80	ns	0,02	ns	5195,38	*	4,05	*
	Híbrido (H)	5	6,59	**	158,12	*	0,89	ns	0,05	*	1601,64	ns	3,89	**
	L vs H	1	11,40	*	371,88	**	0,26	ns	0,12	*	5497,67	*	8,15	**
CV (%)			11,33		17,07		11,42		17,07		18,97		17,12	
Não inoculado	Genótipo (G)	9	3,63	**	124,93	*	2,00	**	0,03	**	5365,35	**	3,32	**
	Linhagem (L)	3	2,80	*	37,93	*	0,63	ns	0,01	*	10754,42	**	2,50	*
	Híbrido (H)	5	3,70	**	183,31	**	2,62	**	0,04	**	2718,16	**	1,25	*
	L vs H	1	0,00	ns	94,01	ns	1,89	*	0,01	ns	2434,11	*	2,20	*
CV (%)			9,70		23,88		12,26		26,24		22,41		28,37	

ns = não-significativo, ** e * = significativos em 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

AP = altura da planta aos 20 dias (cm), AF = área foliar (cm²), DC = diâmetro do colmo (cm), MSF = massa seca foliar (g), PUE = eficiência de uso de fósforo (mg), e PUpE = eficiência de absorção de fósforo (mg).

Em relação à condição controle (não inoculada), observaram-se diferenças significativas entre os genótipos para todas as características morfológicas, o que também ocorreu entre os híbridos. Já entre as linhagens, essas diferenças não foram detectadas apenas para DC. No contraste L vs H houve diferença significativa para DC e os estimadores da aquisição e uso do fósforo (PUE e PUpE) (Tabela 4).

Decorrente da inoculação com *A. brasilense* e *L. adecarboxylata*, de modo geral houve desempenho superior dos híbridos inoculados em relação aos congêneres não inoculados, o que pode ser constatado de forma exemplar na Figura 6, utilizando-se como referência a característica altura de plantas.

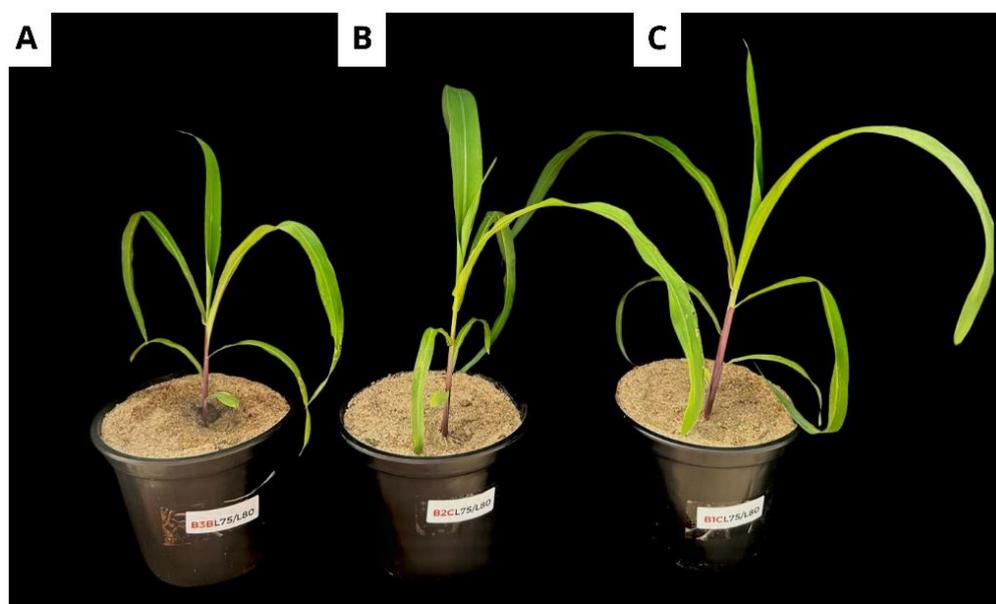


Figura 6. Plantas de milho-pipoca quinze dias após o plantio em condição de baixa disponibilidade de fósforo. (A) Híbrido L75xL80 sem inoculação com BSP. (B) Híbrido L75xL80 inoculado com *Leclercia adecarboxylata*. (C) Híbrido L75xL80 inoculado com *Azospirillum brasilense*.

Na visualização dos histogramas representativos das diferenças nas estimativas de altura de plantas entre os genótipos, destaca-se a supremacia das bactérias na expressão de majorações significativas em relação à condição não inoculada, exceção ocorrida apenas para com a linhagem P2, eficiente e responsiva ao fósforo, para a qual a inoculação propiciou diferenciação, porém, sem alcançar significância estatística (Figura 7).

Em valores percentualizados, nas linhagens e híbridos considerados em conjunto, a inoculação com *A. brasilense* promoveu aumento médio na altura das plantas aos 20 dias de cerca de 23% em comparação ao controle (não inoculado). Em se tratando apenas das linhagens o incremento foi de aproximadamente 18%, enquanto nos híbridos alcançou 27%. Por sua vez, a inoculação com *L. adecarboxylata* resultou em incrementos mais modestos na altura das plantas aos 20 dias (de 20% em média), sendo de cerca de 15% nas linhagens e de 20% nos híbridos, em comparação às plantas não inoculadas (Figura 7).

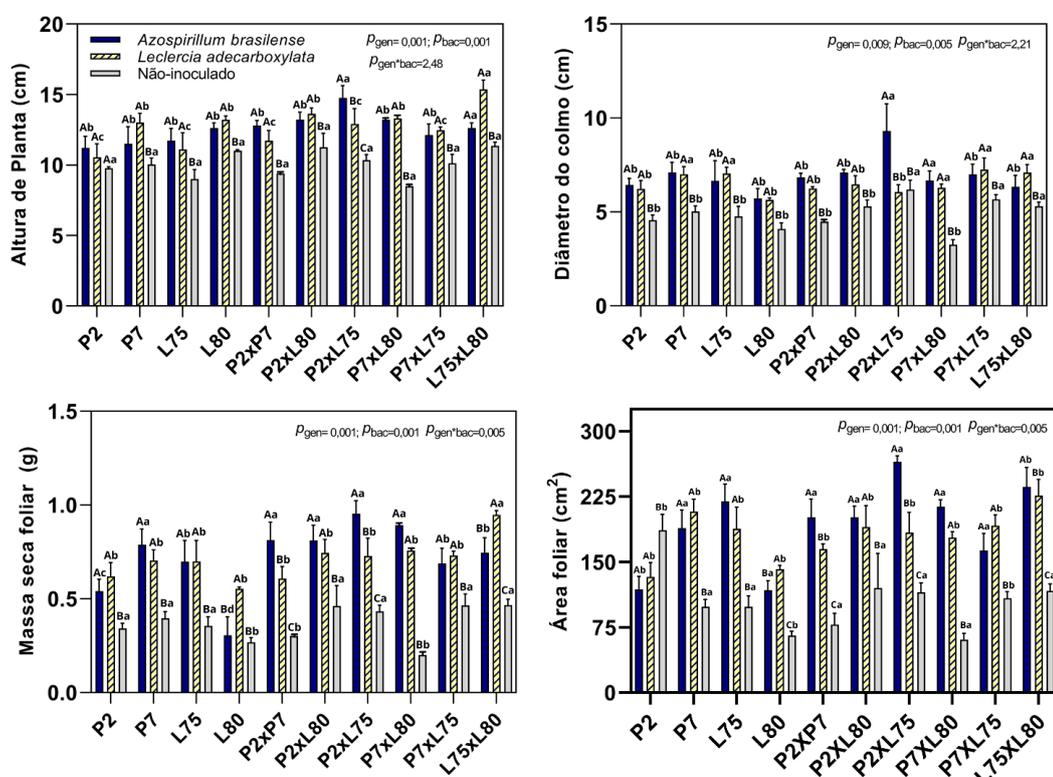


Figura 7. Estimativas de médias e desvios-padrão de características morfológicas em linhagens e híbridos de milho-pipoca cultivados com *Azospirillum brasilense*, com *Leclercia adecarboxylata* e sem inoculação. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre as inoculações para com a condição não inoculada pelo teste Tukey, enquanto letras minúsculas representam diferenças entre os genótipos pelo teste Scott-Knott. Os valores de p indicam a significância (F) para os efeitos de genótipos (p_{gen}), bactérias (p_{bac}) e sua interação ($p_{gen*bac}$). AP = altura da planta aos 20 dias (cm), DC = diâmetro do colmo (cm), MSF = massa seca foliar (g), e AF = área foliar (cm²).

Diferenças significativas entre os genótipos na comparação gráfica das inoculações para com a condição não-inoculada em relação ao diâmetro de colmo (DC) revelam estimativas de DC com elevações significativas quando da inoculação com ambas as bactérias, exceto para a combinação P2xL75 na comparação entre a inoculação com *L. adecarboxylata* e condição não inoculada (Figura 7).

Em termos percentuais, a inoculação com *L. adecarboxylata* apresentou incrementos satisfatórios (de 27% em média) para diâmetro do colmo (DC), com aumento de 33% nas linhagens e de 22% nos híbridos quando comparados ao controle. A inoculação com *A. brasilense* também promoveu incrementos satisfatórios (de 38% em média), com valores de 32% para as linhagens e de 17% para os híbridos (Figura 7).

A condição não inoculada revelou-se minoritária e com diferenciação estatística para as estimativas da característica massa seca da parte aérea (MSF) para todos os genótipos, exceto para a linhagem L80 na confrontação entre a inoculação com *A. brasilense* e a condição não inoculada (Figura 7).

Para MSF houve destaque do impacto das inoculações com o isolado *A. brasilense*, que proporcionou aumento de cerca de 70% nas linhagens e de 85% nos híbridos quando comparados ao controle. A inoculação com *L. adecarboxylata* também revelou resultados favoráveis, com incrementos de 66% nas linhagens e de 51% nos híbridos (Figura 7).

A área foliar evidenciou expressivo impacto decorrente das inoculações com os isolados bacterianos selecionados, com destaque para *A. brasilense*, que proporcionou aumento médio de cerca de 107%. Nas linhagens esse acréscimo foi de 87%, ao passo que nos híbridos houve incremento de 121%. A inoculação com *L. adecarboxylata* também revelou resultados comparativamente satisfatórios, com incremento de 89% nos genitores e híbridos, quando comparados às plantas não inoculadas. Especificamente, houve aumento de 76% e 97% nas linhagens e nos híbridos, respectivamente (Figura 7)

Considerando-se no todo as características morfológicas, dentre os híbridos avaliados é importante destacar que apenas para L75xL80 a inoculação com *L. adecarboxylata* superou os ganhos promovidos por *A. brasilense*, com valores superlativos em relação às médias gerais de magnitudes de 35% (AP), 33% (DC) e 103% (MSF), respectivamente. Em contraposição, para os demais híbridos

os maiores incrementos observados para essas características se deram pela inoculação com *A. brasilense* (Figura 7).

Em relação ao acúmulo de P foi observado aumento significativo tanto para a eficiência do uso (PUE), quanto para a eficiência de absorção (PUPE), com ganhos médios na inoculação com *A. brasilense* de 96% e 154%, respectivamente. Em se tratando das linhagens, os aumentos foram de 71% (PUE) e 134% (PUPE), e nos híbridos de 111% e 157%, respectivamente. Para a inoculação com *L. adecarboxylata* o aumento médio foi de 92% e de 130% para PUE e PUPE, respectivamente. Por seu turno, nas linhagens os percentuais sobrelevados às médias foram de 137% e nos híbridos de 128%, respectivamente, para PUE e PUPE (Figura 8).

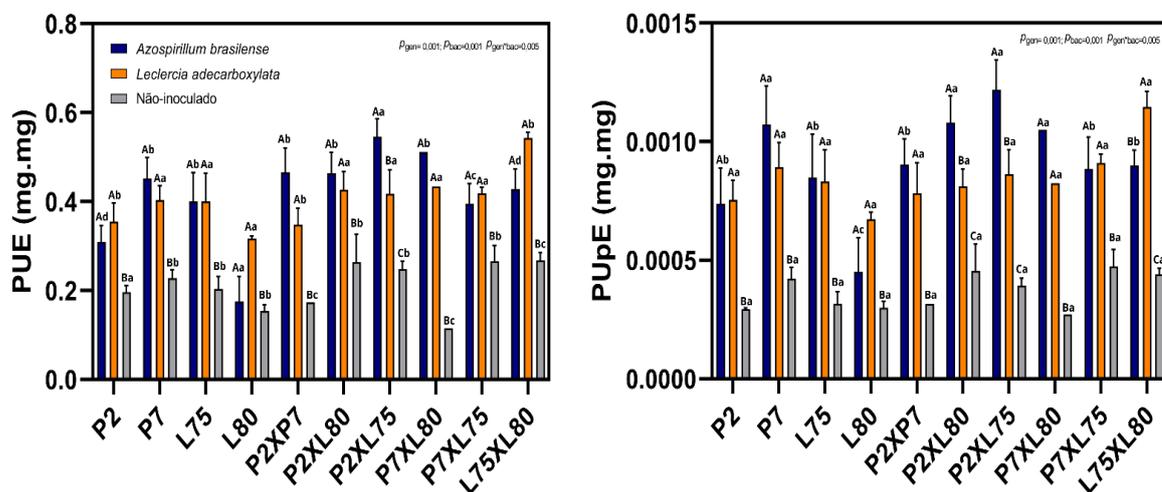


Figura 8. Estimativas de médias e desvios-padrão de eficiências de uso e aquisição de fósforo avaliadas entre genótipos (linhagens e híbridos) de milho-pipoca cultivados sob inoculação com *Azospirillum brasilense*, com *Leclercia adecarboxylata* e sem inoculação. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre as inoculações para com a condição não inoculada pelo teste Tukey, enquanto letras minúsculas representam diferenças entre os genótipos pelo teste Scott-Knott. Os valores de p indicam a significância (F) para os efeitos de genótipos (p_{gen}), bactérias (p_{bac}) e sua interação ($p_{gen*bac}$). PUE = eficiência no uso do fósforo e PUPE = eficiência na aquisição do fósforo.

Buscando trazer à baila a dinâmica do controle genético das características relacionadas ao crescimento vegetal frente às inoculações com os isolados bacterianos selecionados, arrimou-se às informações proporcionadas pela análise dialélica, cujos resultados evidenciaram efeitos significativos de CGC para AP, e de

CEC para AF, DC, MSF e PUpE. Para todas as características morfológicas (AP, AF, DC, MSF e PUpE) foram observadas interações significativas de CECxA (Tabela Suplementar 2).

Na condição inoculada com *A. brasilense* foi detectada significância de CEC para todas as características morfológicas e eficiência e aquisição do fósforo (AP, AF, DC, MSF, PUE e PUpE), já para CGC observou-se ausência de significância em $p \leq 0,05$ para DC. Na condição inoculada com *L. adecarboxylata*, os efeitos de CGC e CEC foram significativos para AP, AF, MSF, PUE e PUpE. Já na condição controle os efeitos de CGC e CEC foram significativos para todas as características morfológicas, exceto CGC para AF e PUpE (Tabela Suplementar 2).

No intento de conhecer a contribuição dos componentes quadráticos associados à CGC (φg) e CEC (φs), detectou-se que para a condição inoculada com *A. brasilense* os efeitos gênicos de dominância (φs) foram os de primazia na expressão de PUE, MSF, AF, AP e DC, na ordem de 66%, 60%, 50%, 32% e 31%, respectivamente, em comparação às contribuições da aditividade, que foram de 5%, 2%, 5%, 9% e 0%. De forma semelhante, na condição inoculada com *L. adecarboxylata*, as contribuições de φs foram de supremacia, com percentuais em ordem decrescente de 41% (MSF), 38% (AF), 30% (AP), 21% (PUE) e 20% (DC), em comparação à ação da aditividade, que foi de tão somente 6%, 3%, 14%, 8% e 3%, nesta ordem, para as mesmas características. Na condição não inoculada, notou-se prevalência também dos efeitos de dominância, com contribuições de 60% (AP), 52% (DC), 50% (MSF), 43% (PUE) e 29% (AP) para φs , em contraposição às magnitudes de 0% (AF), 9% (DC), 11% (MSF), 24% (PUE) e 21% (AP) para φg . Destacam-se os valores majoritários dos efeitos residuais para todas essas características na condição de inoculação com *L. adecarboxylata*, bem como para AP e DC na inoculação com *A. brasilense* e para AP na condição não inoculada (Figura 9).

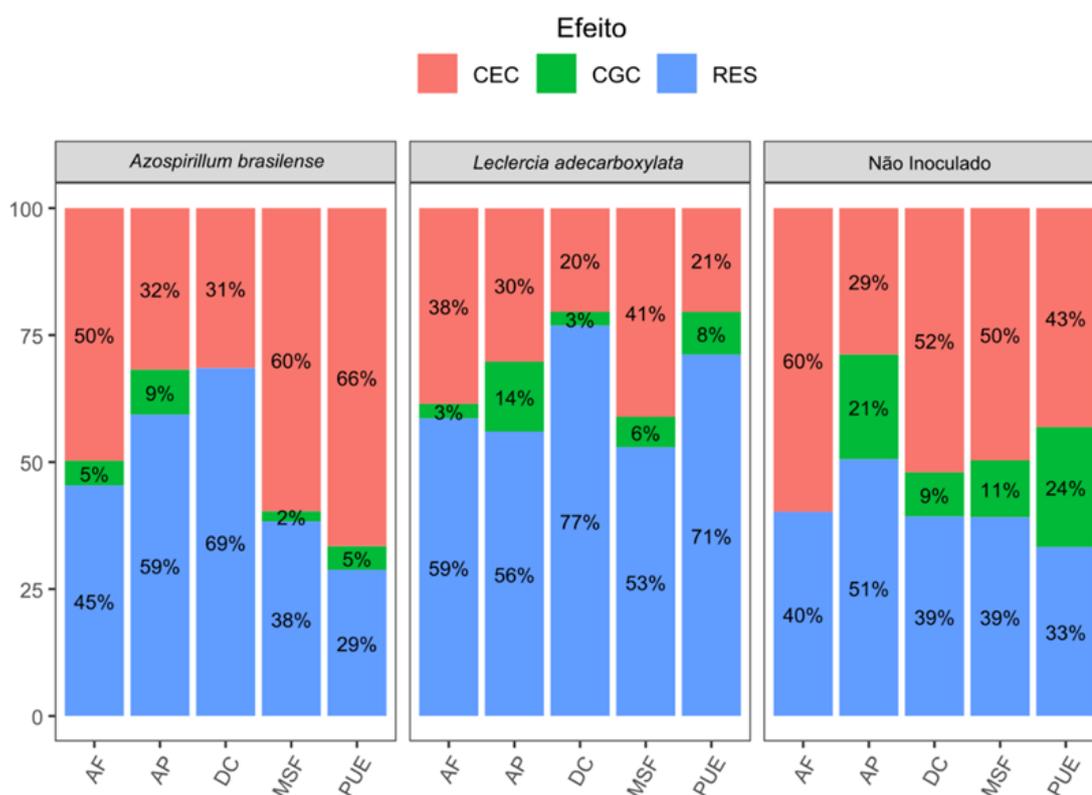


Figura 9. Importância percentual dos componentes quadráticos relacionados à capacidade geral de combinação (CGC), capacidade específica de combinação (CEC) e efeito residual (RES) em linhagens e híbridos de milho-pipoca cultivados sob inoculação bacteriana com *A. brasilense*, com *L. adecarboxylata* e sem inoculação.

AF = área foliar, AP = altura de planta aos 20 dias, DC = diâmetro do colmo, MSF = massa seca foliar, e PUE = eficiência no uso do fósforo.

5.3 Impactos da inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato nas trocas gasosas foliares, conteúdos de pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila

Para os índices relacionados às trocas gasosas foliares – fotossíntese (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i) e transpiração (E) – houve diferenças significativas para as fontes de variação genótipos (G) e ambientes (A , considerando duas condições de inoculação e uma sem inóculo) na ANOVA conjunta. Por sua vez, apenas C_i e NBI expressaram significância para a interação $G \times A$ (Tabela 5).

Em se tratando dos pigmentos foliares, diferenças significativas foram detectadas para genótipos quanto a clorofila (Chl), flavonoides (Flav) e índice de

balanço de nitrogênio (NBI). Por sua vez, apenas NBI expressou significância ($p \leq 5\%$) para ambientes, de forma semelhante ao ocorrido para a interação $G \times A$, todavia com NBI se diferenciando com significância em 1% para essa interação (Tabela 5).

Na condição inoculada com *A. brasilense* para os índices de trocas gasosas foliares, com exceção de C_i não foram identificadas diferenças significativas entre os genótipos estudados, o mesmo detectado para com os híbridos. Por sua vez, sequer uma significância ocorreu para com o conjunto de linhagens e para o contraste L vs H em relação às variáveis de trocas gasosas foliares (Tabela 5).

Ainda em alusão à inoculação com *A. brasilense*, em relação aos conteúdos de pigmentos foliares Chl, Flav e NBI, ocorrência de significância foram observadas nas fontes de variação genótipos e linhagens, ao passo que para os híbridos não houve diferenciação significativa para qualquer pigmento. Já para o contraste L vs H apenas Flav e NBI proporcionaram diferenças estatísticas significativas (Tabela 5).

Considerando-se a condição inoculada com *L. adecarboxylata*, não se detectou diferença significativa para os índices de trocas gasosas foliares entre genótipos, bem como dentro do grupo de linhagens, de híbridos ou para o contraste linhagens \times híbridos. O mesmo pode ser observado para os pigmentos foliares, em que não se observaram diferenças significativas, com exceção de Flav para com o contraste L vs H (Tabela 5).

Para a condição controle (não inoculado) houve diferenciação estatística altamente significativa para genótipos com relação às características relacionadas às trocas gasosas foliares. Situação semelhante ocorreu com a fonte de variação híbridos, diferenciando-se apenas por g_s exibir significância em 5% de probabilidade. Já as linhagens não se diferiram significativamente quanto a g_s e E . Por último, para o contraste L vs H não foi observada diferença significativa apenas para C_i (Tabela 5).

Em relação aos pigmentos foliares na condição não inoculada, perceberam-se diferenças significativas entre os genótipos para Chl, Flav e NBI, o mesmo sendo constatado para com o grupo de híbridos. Entre as linhagens não foi observada diferença significativa apenas para Chl e Anth. Por outro lado, entre as linhagens *versus* híbridos (L vs H), não houve diferença significativa para F em relação ao quadratório médio de qualquer pigmento avaliado (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da análise de variância individual por ambiente e conjunta de índices fisiológicos de trocas gasosas e de pigmentos foliares de quatro genitores e seis combinações híbridas de milho-pipoca cultivados com duas espécies bacterianas e sem inoculação.

		Quadrados Médios																
		FV	GL	A	gs	C _i	E	Chl	Flav	Anth	NBI							
Análise Conjunta	Genótipo (G)	9	35,65	**	0,00	**	3525,98	**	0,84	*	8,60	**	0,04	**	0,00	<i>ns</i>	19,11	**
	Ambiente (A)	2	1115,91	**	0,21	**	16142,26	**	34,22	**	23,70	<i>ns</i>	0,01	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	10,53	*
	G×A	18	18,77	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	1417,99	*	0,55	<i>ns</i>	3,91	<i>ns</i>	0,01	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	8,41	**
	CV (%)			13,23		17,49		10,84		12,55		6,07		6,31		4,30		9,67
<i>Azospirillum brasilense</i>	Genótipo (G)	9	8,40	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	1.196,52	*	0,53	<i>ns</i>	3,84	*	0,03	**	0,00	<i>ns</i>	14,33	**
	Linhagem (L)	3	20,58	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	347,63	<i>ns</i>	0,19	<i>ns</i>	8,42	*	0,04	*	0,00	<i>ns</i>	27,62	**
	Híbrido (H)	5	2,43	<i>ns</i>	0,01	<i>ns</i>	1.906,73	*	0,82	<i>ns</i>	1,24	<i>ns</i>	0,01	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	2,53	<i>ns</i>
	L vs H	1	1,68	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	193,39	<i>ns</i>	0,04	<i>ns</i>	3,10	<i>ns</i>	0,06	**	0,00	<i>ns</i>	33,42	**
	CV (%)			10,25		16,46		9,91		11,47		5,47		6,43		4,39		9,61
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Genótipo (G)	9	15,10	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	402,26	<i>ns</i>	0,16	<i>ns</i>	3,23	<i>ns</i>	0,01	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	3,75	<i>ns</i>
	Linhagem (L)	3	22,97	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	823,58	<i>ns</i>	0,24	<i>ns</i>	3,97	<i>ns</i>	0,01	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	4,23	<i>ns</i>
	Híbrido (H)	5	13,39	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	153,80	<i>ns</i>	0,13	<i>ns</i>	3,11	<i>ns</i>	0,01	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	3,43	<i>ns</i>
	L vs H	1	0,04	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	380,62	<i>ns</i>	0,06	<i>ns</i>	1,56	<i>ns</i>	0,04	*	0,00	<i>ns</i>	3,92	<i>ns</i>
	CV (%)			15,17		14,55		11,80		11,00		6,15		7,14		4,31		9,36

Tabela 5. Cont.

		Quadrados Médios																
	FV	GL	A	gs	C _i	E	Chl	Flav	Anth	NBI								
Não Inolucado	Genótipo (G)	9	49,69	**	0,04	**	4.763,17	**	1,26	**	9,36	**	0,02	**	0,00	<i>ns</i>	17,85	
	Linhagem (L)	3	32,48	*	0,00	<i>ns</i>	3.859,47	*	0,29	<i>ns</i>	5,84	<i>ns</i>	0,04	*	0,00	<i>ns</i>	18,66	*
	Híbrido (H)	5	54,18	**	0,01	*	6.256,78	**	1,34	**	13,15	**	0,02	**	0,00	<i>ns</i>	20,86	**
	L vs H	1	78,91	**	0,01	**	6,22	<i>ns</i>	3,78	**	0,95	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	0,32	<i>ns</i>
CV (%)			15,09		20,52		10,98		16,01		6,61		5,15		4,21		10,02	

ns = não-significativo, ** e * = significativos em 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste *F*.

A = taxa de fotossíntese líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), gs = condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), C_i = concentração interna de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), E = taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), Chl = teor relativo de clorofila ($\mu\text{mol cm}^{-2}$), Flav = teor de flavonoides ($\mu\text{mol cm}^{-2}$), Anth = conteúdo foliar de antocianinas ($\mu\text{mol cm}^{-2}$), e NBI = índice de balanço de nitrogênio ($\mu\text{mol cm}^{-2}$).

A análise conjunta dos índices de fluorescência da clorofila revelou diferença significativa entre os genótipos para todas as variáveis estudadas. Quanto às condições de inoculação (Ambiente), por sua vez, diferenças foram exibidas apenas para Pi_Abs e ABS/RC. A interação GxA não foi significativa apenas para Phi_Po (Tabela 6).

Na condição inoculada com *A. brasilense* foi possível detectar diferença entre os genótipos e híbridos para todos os estimadores de fluorescência da clorofila, exceto para ABS/RC. De forma contrária, para esses índices de fluorescência, tanto em relação às linhagens quanto para com a interação L vs H não foram observadas diferenças estatísticas (Tabela 6).

A interpretação das resultantes da inoculação com *L. adecarboxylata* permitiu evidenciar diferenças estatísticas para genótipos, linhagens e para o contraste L vs H quanto às estimativas dos quadrados médios dos índices de fluorescência da clorofila estudados, com exceção dos híbridos, que se diferiram somente para Pi_Abs (Tabela 6).

Em consideração à condição não inoculada, tanto os genótipos quanto as linhagens possibilitaram diferenças significativas em todas as variáveis de fluorescência da clorofila avaliadas. Nos híbridos, entretanto, F_v/F_m e Phi_Po não se diferiram com significância estatística em 5%. Por sua vez, para o contraste L vs H não houve diferenciação significativa com relação a F_o e ABS/RC (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância individual por ambiente e conjunta de índices fisiológicos de fluorescência da clorofila de quatro genitores e seis combinações híbridas de milho-pipoca cultivados com duas espécies bacterianas e sem inoculação.

		Quadrados Médios										
		FV	GL	Fo		Fv/Fm	Phi_Po	Pi_Abs	ABS/RC			
Análise Conjunta	Genótipo (G)	9	6.414.560,61	**	0,99	**	0,75	**	2,78	**	0,16	**
	Ambiente (A)	2	3.527.870,86	ns	0,00	ns	0,19	ns	1,12	*	0,32	*
	GxA	18	2.396.660,64	**	0,43	**	0,19	ns	0,49	**	0,08	**
CV (%)			8,21		1,28		5,43		21,64		7,42	
<i>Azospirillum Brasilense</i>	Genótipo (G)	9	2.132.889,18	*	0,06	**	0,42	**	1,23	**	0,05	ns
	Linhagem (L)	3	2.866.645,17	ns	0,00	ns	0,26	ns	0,69	ns	0,05	ns
	Híbrido (H)	5	1.669.596,77	**	0,08	**	0,58	**	1,65	**	0,04	ns
	L vs H	1	2.248.083,27	ns	0,00	ns	0,08	ns	0,70	ns	0,07	ns
CV (%)			8,50		1,16		1,16		23,28		8,44	
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Genótipo (G)	9	3.794.529,85	**	0,41	**	0,31	**	1,33	**	0,09	*
	Linhagem (L)	3	7.696.265,90	**	0,86	**	0,63	**	1,74	**	0,10	*
	Híbrido (H)	5	956.890,67	ns	0,00	ns	0,08	ns	0,85	*	0,05	ns
	L vs H	1	6.277.517,60	**	0,67	*	0,51	*	2,52	**	0,32	**
CV (%)			7,27		1,11		1,11		20,94		6,49	

Tabela 6. Cont.

		Quadrados Médios										
FV		GL	Fo		Fv/Fm		Phi_Po		Pi_Abs		ABS/RC	
Não inoculado	Genótipo (G)	9	5.280.462,86	**	0,61	*	0,40	**	1,20	**	0,18	*
	Linhagem (L)	3	5.603.783,73	*	0,97	*	0,57	*	1,96	**	0,15	*
	Híbrido (H)	5	6.013.663,77	**	0,02	ns	0,18	ns	0,80	**	0,21	**
	L vs H	1	644.495,70	ns	0,15	**	0,95	*	0,95	*	0,07	ns
CV (%)			8,50		1,49		1,49		19,96		7,27	

^{ns} = não-significativo, ** e * = significativos em 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste *F*.

Pi_Abs = índice de desempenho baseado na absorção, F_o = fluorescência mínima, F_v/F_m = eficiência quântica máxima do PSII, Phi_Po = rendimento quântico máximo da fotoquímica primária, e ABS/RC = energia de absorção média por centro de reação.

Analisando-se os efeitos das inoculações sobre os genótipos estudados, de modo geral, a interação com as bactérias solubilizadoras de fosfato promoveu melhorias significativas em todos os índices fisiológicos analisados, tanto para linhagens quanto em híbridos. A taxa fotossintética elevou-se significativamente em todos os genótipos quando da inoculação bacteriana. Concretamente, a inoculação com *A. brasilense* proporcionou o maior incremento na taxa fotossintética líquida, com estimativa média de 70%, especificamente de 87% nas linhagens e de 55% nos híbridos. O tratamento com *L. adecarboxylata*, apesar de expressar impactos mais modestos (37%), também resultou em ganhos relevantes, com incremento de 50% nas linhagens e de 26% nos híbridos (Figura 10).

Outros índices subjacentes à fotossíntese também apresentaram incrementos expressivos para os genótipos estudados. A condutância estomática, por exemplo, expressou aumento de 107% (103% nas linhagens e 94% nos híbridos) em decorrência da inoculação com *A. brasilense*, ao passo que para *L. adecarboxylata* esse aumento foi de 31% (51% nas linhagens e 15% nos híbridos). Os valores de transpiração seguiram a mesma tendência, com destaque para as plantas inoculadas com *A. brasilense*, que apresentaram aumento médio 79% (95% nas linhagens e 65% nos híbridos). O tratamento com *L. adecarboxylata* também resultou em ganhos notórios (41%), sendo 58% nas linhagens e 28% nos híbridos (Figura 10).

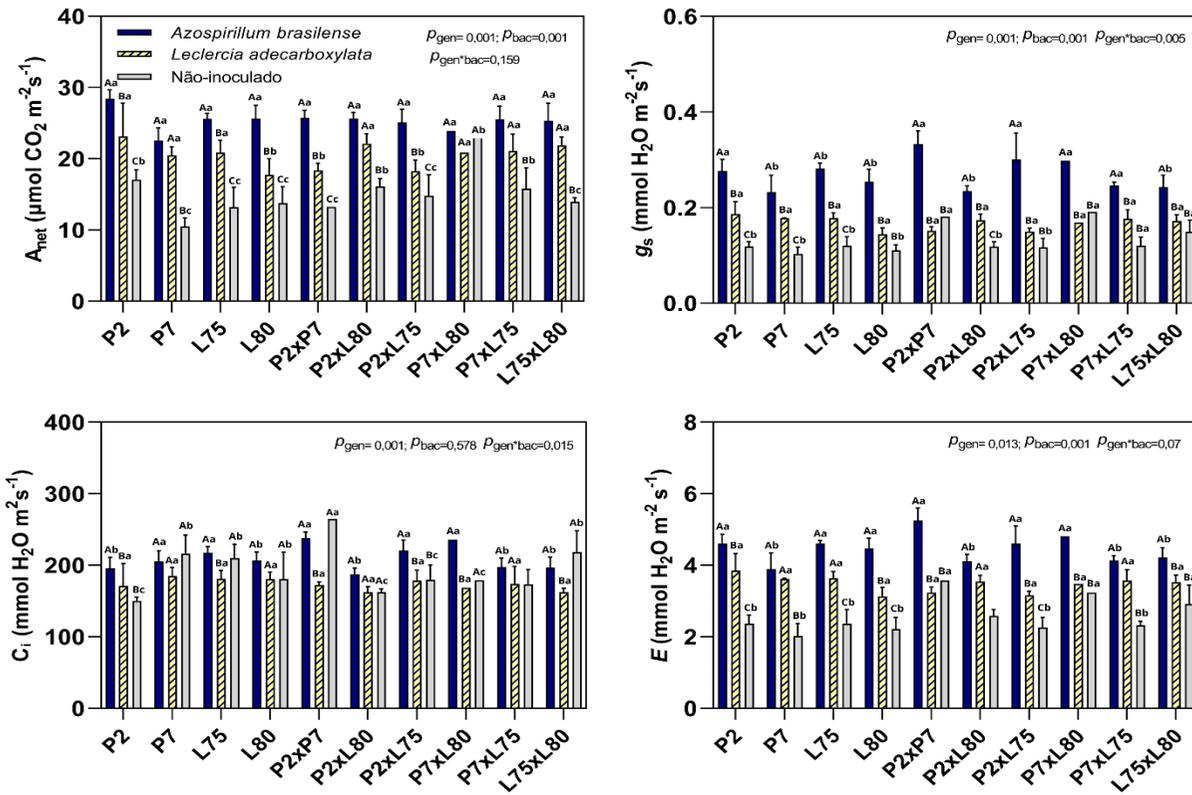


Figura 10. Estimativas de médias e desvios-padrão de índices fisiológicos de trocas gasosas avaliadas em linhagens e híbridos de milho-pipoca cultivados sob inoculação bacteriana com *Azospirillum brasilense*, com *Leclercia adecarboxylata* e sem inoculação. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre as inoculações para com a condição não inoculada pelo teste Tukey, enquanto letras minúsculas representam diferenças entre os genótipos pelo teste Scott-Knott. Os valores de p indicam a significância (F) para os efeitos de genótipos (p_{gen}), bactérias (p_{bac}) e sua interação ($p_{gen*bac}$). A = taxa de fotossíntese líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), g_s = condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), C_i = concentração interna de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), e E = taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

A concentração intercelular de CO₂ não apresentou ganhos tão expressivos em decorrência das inoculações. A interação com *A. brasilense* resultou nos maiores incrementos, com aumento médio de 13% nas linhagens e de 9% nos híbridos; de modo contrário, *L. adecarboxylata* causou decréscimo para essa característica, com diminuição de 5% nas linhagens e de 8% nos híbridos.

Em se tratando do conteúdo de pigmentos foliares, não foram observados incrementos comparativamente consideráveis para as diferentes condições de inoculação (Figura 11). Já para a fluorescência da clorofila, a inoculação com *A. brasilense* promoveu aumento significativo em Pi_Abs, resultando em incremento médio de 21% nas linhagens e de 15% nos híbridos. O tratamento com *L. adecarboxylata* também demonstrou efeitos favoráveis, com aumentos de 9% nas linhagens e de 15% nos híbridos (Figura 12).

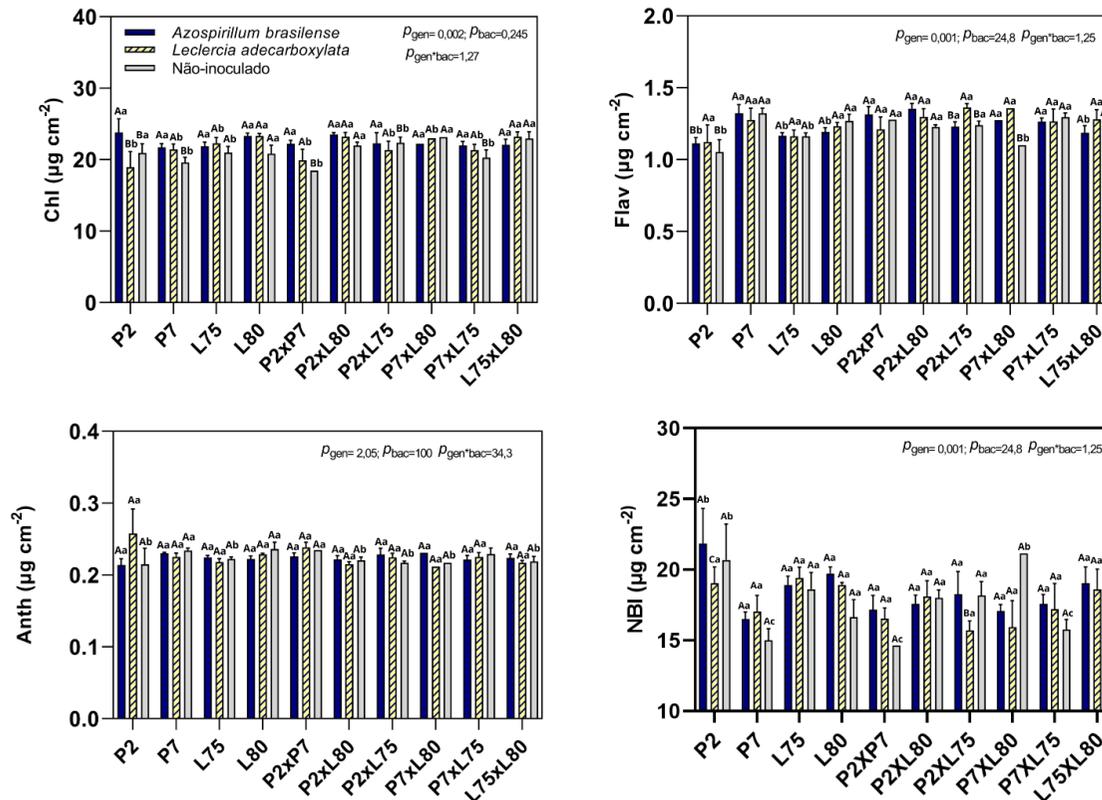


Figura 11. Estimativas de médias e desvios-padrão de índices de pigmentos foliares avaliados em linhagens e híbridos de milho-pipoca cultivados sob inoculação bacteriana com *Azospirillum brasilense*, com *Leclercia adecarboxylata* e sem inoculação. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre as inoculações para com a condição não inoculada pelo teste Tukey, enquanto letras minúsculas representam diferenças entre os genótipos pelo teste Scott-Knott. Os valores de p indicam a significância (F) para os efeitos de genótipos (p_{gen}), bactérias (p_{bac}) e sua interação ($p_{gen*bac}$). Chl = teor relativo de clorofila ($\mu\text{mol cm}^{-2}$), Flav = teor de flavonoides ($\mu\text{mol cm}^{-2}$), Anth = conteúdo foliar de antocianinas ($\mu\text{mol cm}^{-2}$), e NBI = índice de balanço de nitrogênio ($\mu\text{mol cm}^{-2}$).

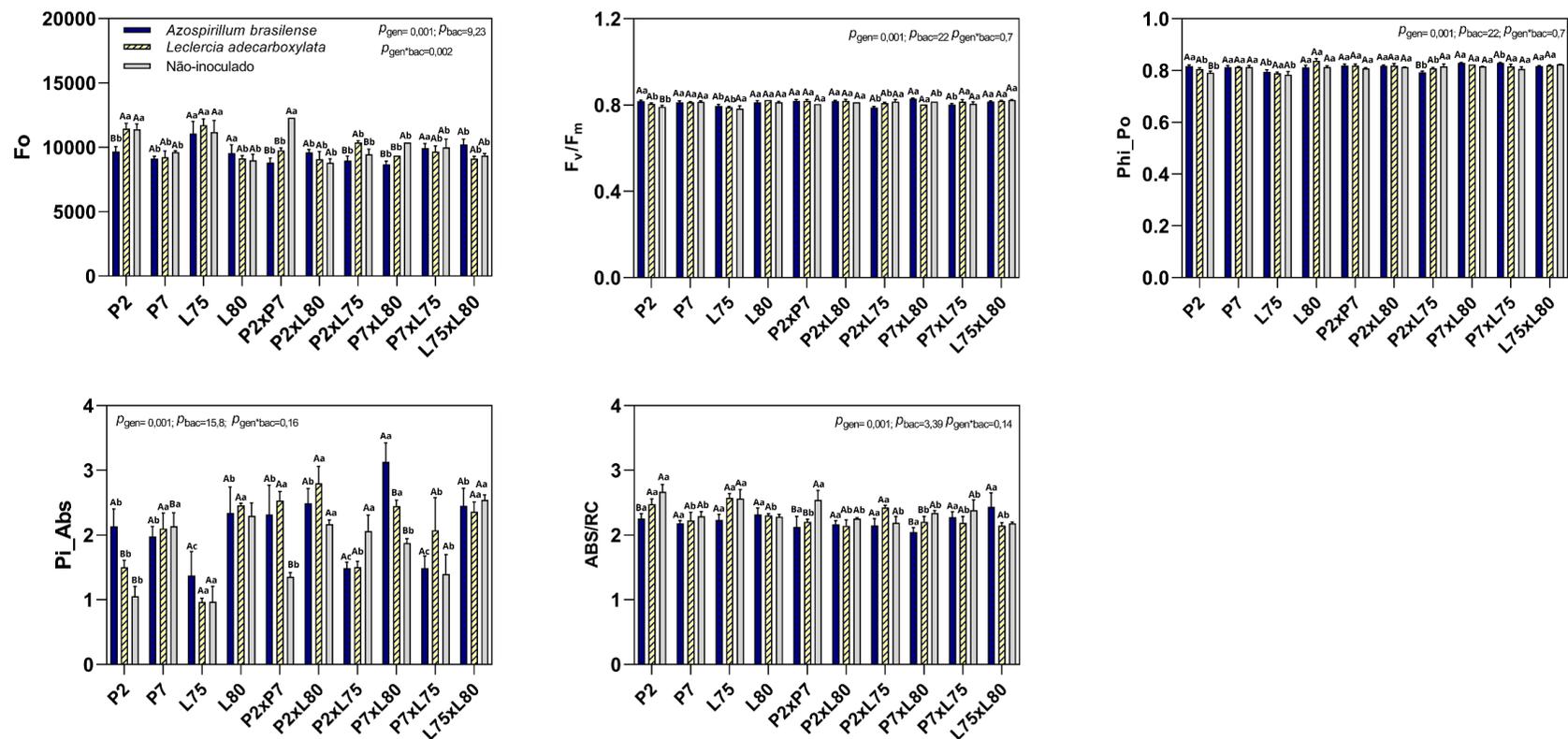


Figura 12. Estimativas de médias e desvios-padrão de índices fisiológicos de trocas gasosas avaliadas em linhagens e híbridos de milho-pipoca cultivados sob inoculação bacteriana com *Azospirillum brasilense*, com *Leclercia adecarboxylata* e sem inoculação. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre as inoculações para com a condição não inoculada pelo teste Tukey, enquanto letras minúsculas representam diferenças entre os genótipos pelo teste Scott-Knott. Os valores de p indicam a significância (F) para os efeitos de genótipos (p_{gen}), bactérias (p_{bac}) e sua interação ($p_{gen*bac}$).

F₀ = fluorescência mínima, F_v/F_m = eficiência quântica máxima do PSII, Phi_Po = rendimento quântico máximo da fotoquímica primária, Pi_Abs = índice de desempenho baseado na absorção, e ABS/RC = energia de absorção média por centro de reação.

Na contextualização do controle genético dos índices fisiológicos e de pigmentos foliares, a análise dialélica conjunta revelou que o efeito da CGC foi significativo para Chl e NBI. Já o efeito de CEC foi significativo apenas para C_i . Em se tratando da interação CGC para com as condições com inoculação bacteriana, foram observadas interações significativas para Chl, Flav e NBI. Por outro lado, a interação entre CEC e as inoculações bacterianas foram significativas para A , g_s , C_i , E , Chl e NBI (Tabela Suplementar 3).

Considerando-se a inoculação com *A. brasilense*, o efeito de CGC foi significativo para A , Chl, Flav e NBI, enquanto em CEC foi significativo para g_s , C_i , E , Flav e NBI. Na condição inoculada com *L. adecarboxylata*, detectou-se efeito de CGC significativo nas estimativas de quadrados médios de Chl e efeitos de CEC significativo para A e g_s . Já na condição não inoculada, a CGC foi significativa para C_i , Chl, Flav, Anth e NBI, ao passo que o efeito de CEC foi significativo para todas as características (Tabela Suplementar 3).

Para os índices de fluorescência da clorofila, a análise dialélica conjunta não detectou efeito significativo de CGC, com exceção de F_o . Já para CEC, foi observada significância para a maioria desses índices, exceto em ABS/RC. Os efeitos das interações CGC \times A e CEC \times A, todavia, foram significativos para todas as variáveis analisadas de fluorescência da clorofila (Tabela Suplementar 4). Na condição inoculada com *A. brasilense* a variável F_o apresentou diferença altamente significativa para CGC; por sua vez, apenas ABS/RC não proporcionou efeito significativo de CEC. Na condição inoculada com *L. adecarboxylata* foram observados efeitos significativos de CGC e CEC para todos os índices. E, na condição não inoculada, todos os índices apresentaram efeitos de CGC e CEC com significância estatística (Tabela Suplementar 4).

Na condição inoculada com *A. brasilense*, dentre as estimativas fisiológicas de trocas gasosas e de pigmentos foliares, as que exibiram a influência mais expressiva dos efeitos genéticos de dominância (CEC) foram Flav, NBI e C_i , tendo o componente quadrático ψ s apresentado contribuições de 41%, 36% e 35%, respectivamente, no controle dessas variáveis, seguido por E e g_s , nesta ordem, com percentuais de 27% e 25%. Por outro lado, na condição inoculada com *L. adecarboxylata* os estimadores que demonstraram o maior impacto dos efeitos genéticos de dominância foram g_s e A (24% e 23%, respectivamente). Na condição não inoculada os maiores efeitos de CEC recaíram para A , C_i , E , g_s , nesta ordem

hierárquica, com valores de 76%, 71%, 70% e 64%, respectivamente, seguidos por NBI e Flav, com respectivos percentuais de 47% e 46% (Figura 13).

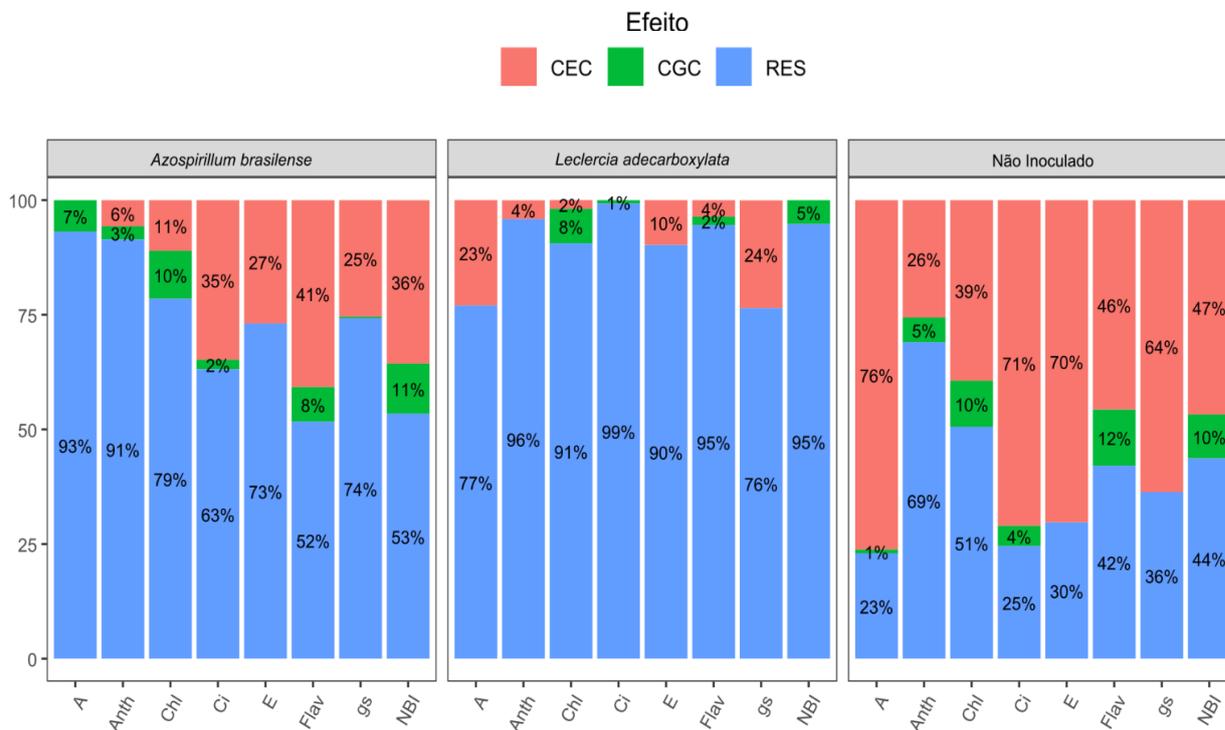


Figura 13. Importância percentual dos componentes quadráticos relacionados à capacidade geral de combinação (CGC), capacidade específica de combinação (CEC) e efeito residual (RES) de índices fisiológicos de trocas gasosas e de pigmentos foliares em linhagens e híbridos de milho-pipoca cultivados sob inoculação bacteriana com *A. brasilense*, com *L. adecarboxylata* e sem inoculação. A = taxa de fotossíntese líquida, Anth = conteúdo foliar de antocianinas, Chl = teor relativo de clorofila, C_i = concentração interna de CO₂, E = taxa de transpiração, Flav = teor de flavonoides, g_s = condutância estomática, e NBI = índice de balanço de nitrogênio.

Ressaltem-se os efeitos residuais haverem sido mais proeminentes para todos os índices fisiológicos de trocas gasosas e de pigmentos foliares quando na condição de inoculação bacteriana, ao passo que na condição não inoculada apenas Anth e Chl expressaram efeitos majoritários residuais em relação a φ_g e φ_s (Figura 13).

Referindo-se à condição inoculada com *A. brasilense*, dentre os índices de fluorescência da clorofila avaliados, os efeitos não-aditivos (CEC) foram mais proeminentes em Fv/Fm, Phi_{po} e Pi_{Abs}, nesta ordem, com valores de 63%, 63%

e 62%, seguidos por F_o e F_v/F_m , cujas influências de CEC foram de 22% e 7%, respectivamente. Na condição inoculada com *L. adecarboxylata*, as maiores influências dos efeitos não-aditivos recaíram para com Pi_Abs , F_o e ABS/RC (67%, 54% e 48%, respectivamente). Outros estimadores, como F_v/F_m e Phi_po , também apresentaram influência significativa de CEC, com o mesmo valor de 45%. Na condição não inoculada, as variáveis com maior impacto dos efeitos não-aditivos foram Pi_Abs e F_o , com magnitudes de 65% e 55%, respectivamente. Inobstante, ABS/RC , F_m/F_o e Phi_Po também mostraram influências relevantes de CEC, expressas pelos valores de 49% para a primeira variável e 48% para as duas últimas (Figura 14).

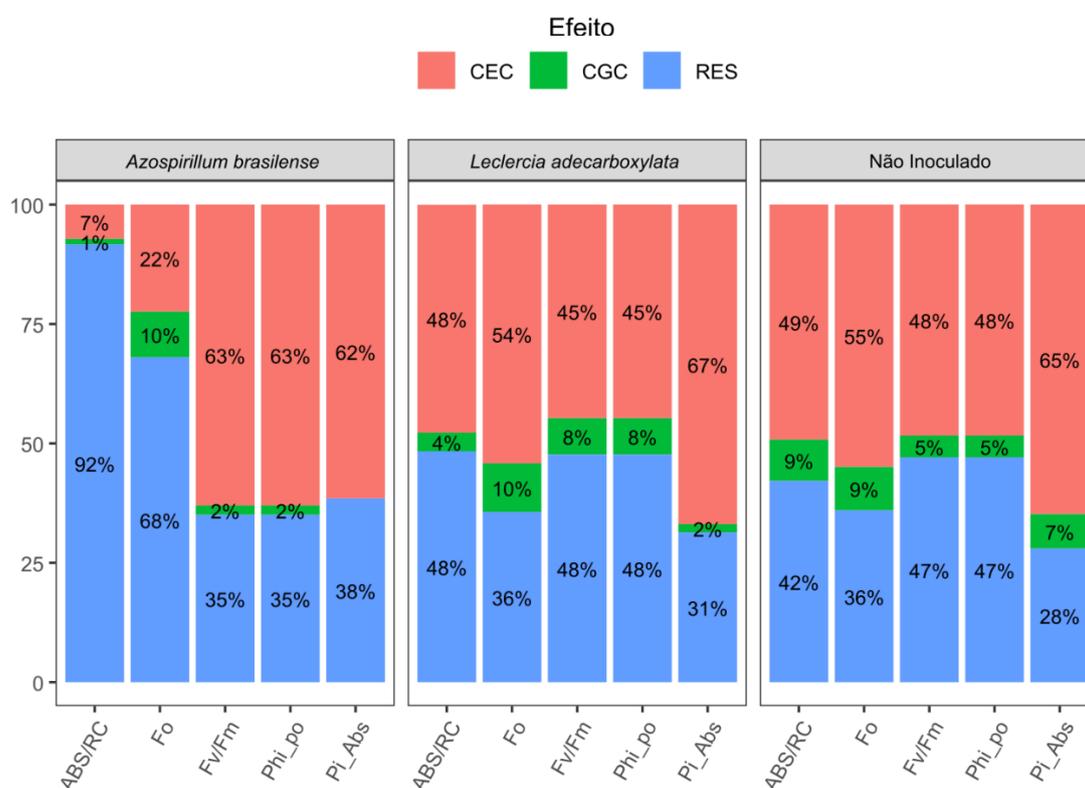


Figura 14. Importância percentual dos componentes quadráticos relacionados à capacidade geral de combinação (CGC), capacidade específica de combinação (CEC) e efeito residual (RES) de índices de fluorescência da clorofila estimados em linhagens e híbridos de milho-pipoca cultivados sob inoculação bacteriana com *A. brasilense*, com *L. adecarboxylata* e sem inoculação.

ABS/RC = energia de absorção média por centro de reação, F_o = fluorescência mínima, F_v/F_m = eficiência quântica máxima do PSII, Phi_Po = rendimento quântico máximo da fotoquímica primária, e Pi_Abs = índice de desempenho baseado na absorção.

5.4 Quantificação de bactérias associadas às raízes das plantas de milho-pipoca em diferentes condições de inoculação

Visando desvendar o *quantum* de interação entre as bactérias e as plantas, a mensuração da colonização das raízes em cada genótipo pelos diferentes tratamentos bacterianos revelou resultados altaneiros. Sob essa égide, o controle, não inoculado, conteve o maior média percentual de colonização, de 72,20% (Tabela 7), mas isso se deveu à presença de bactérias diazotróficas nativas no solo. Por seu turno, a inoculação com *L. adecarboxylata* se mostrou mais eficiente em termos de colonização, com 70,40% destes microrganismos, em média, colonizando as raízes das plantas inoculadas por essa espécie (Tabela 7, Figura 15). Apesar de demonstrar resultados promissores, a inoculação com *A. brasilense* foi a que deteve a menor magnitude de colonização, expressa pelo valor de 46,30% (Tabela 7, Figura 16).

Tabela 7. Estimativas percentuais médias da quantificação de bactérias associadas às raízes de plantas de milho-pipoca cultivadas sob inoculação com *Azospirillum brasilense*, com *Leclercia adecarboxylata* e sem inoculação.

Genótipos	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Diazotróficas nativas (controle)	Média de colonização por genótipo
P2	100,0	83,3	83,3	88,9
P7	33,3	100,0	33,3	55,6
L75	50,0	16,7	100,0	55,6
L80	16,7	66,7	100,0	61,1
P2xP7	16,7	66,7	66,7	50,0
P2xL80	50,0	50,0	50,0	50,0
P2xL75	50,0	83,3	50,0	61,1
P7xL75	66,7	66,7	83,3	72,2
L75xL80	33,3	100,0	83,3	72,2
Média de inoculação por bactéria	46,3	70,4	72,2	

Considerando-se apenas as linhagens, P2 se destacou, apresentando a maior média de colonização, com valores de 100% para *A. brasilense* e de 83,3% para *L. adecarboxylata* (Tabela 7). L80 também apresentou elevada colonização, notadamente maior em *L. adecarboxylata*, com média de 100% e de 66,7% para *A. brasilense*. Situação similar foi observada em P7, com 100% de colonização por *L. adecarboxylata*. No entanto, a colonização com *A. brasilense* foi menor, com estimativa de 33,3%. L75 foi a linhagem genitora que apresentou menores interações com os tratamentos, com 50% de colonização por *A. brasilense* e 16,7% por *L. adecarboxylata* (Tabela 7).

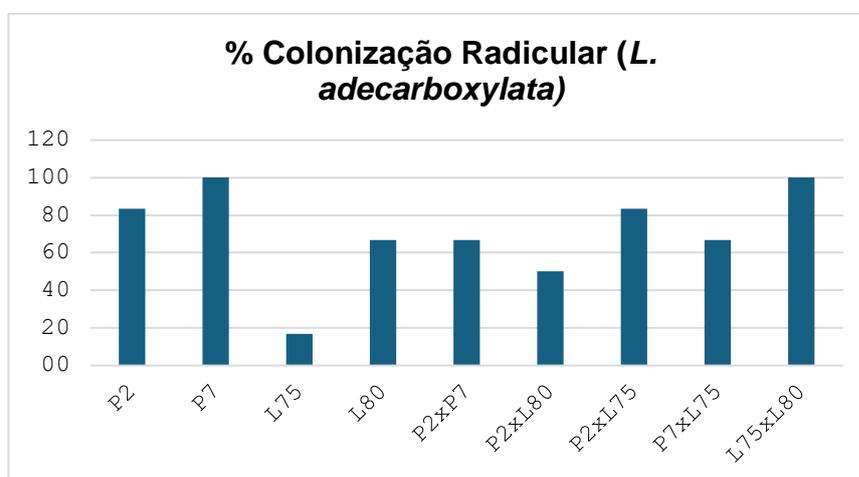


Figura 15. Estimativas percentuais de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de raiz fresca de bactérias associadas às raízes de plantas de milho-pipoca cultivadas com *Leclercia adecarboxylata*.

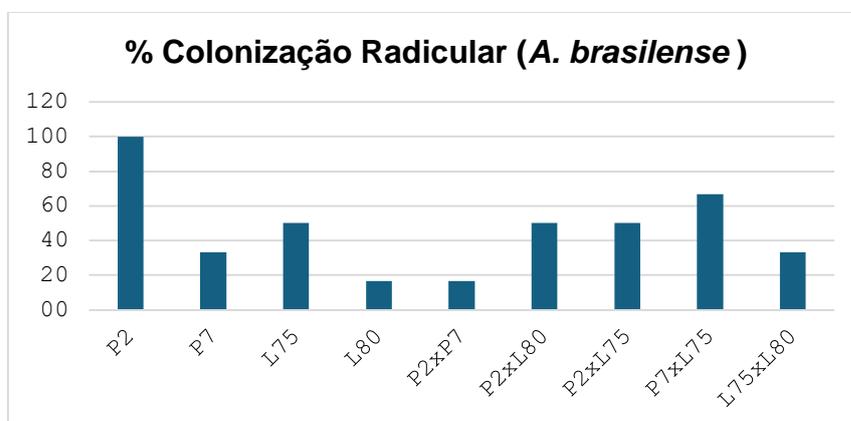


Figura 16. Estimativas percentuais de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de raiz fresca de bactérias associadas às raízes de plantas de milho-pipoca cultivadas com *Azospirillum brasilense*.

Em particular aos híbridos, em P2×L80 a colonização foi similar para os tratamentos, com médias de 50% para *A. brasilense* e *L. adecarboxylata*. Em P2×L75 a colonização por *A. brasilense* também foi de 50%, enquanto a colonização por *L. adecarboxylata* foi significativamente maior, com média de 83,3%. Na combinação híbrida P2×P7 também houve maior colonização por *L. adecarboxylata*, expressa pelo valor médio de 66,7%, ao passo que em *A. brasilense* a colonização foi inferior, com valor de 16,7%. L75×80 foi o F₁ que apresentou a mais elevada interação com *L. adecarboxylata*, cuja média foi de 100%. *A. brasilense* também apresentou média considerável de colonização para esse híbrido, com valor de 83,3%. Para P7×L75 a colonização exibiu valores iguais de colonização para ambas as espécies bacterianas, com magnitude de 66,7% (Tabela 7).

6. DISCUSSÃO

6.1. Prospecção de cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato como alternativa para o suprimento de P

As bactérias rizosféricas estão envolvidas na ciclagem geoquímica dos nutrientes, tornando-os disponíveis tanto para as plantas quanto para a comunidade microbiana do solo (Elhaissofi et al., 2022). Assim, a busca por microrganismos que possam aumentar a disponibilidade de nutrientes no solo e, por consequência, melhorar a eficiência na utilização desses nutrientes pelas plantas, especialmente no caso do fósforo, emerge como uma alternativa viável para o desenvolvimento de uma agricultura moderna, sustentável e que promova a segurança alimentar. Todavia, sabe-se que apenas 20% das bactérias presentes no solo demonstram eficiência na solubilização de fosfatos (Solanki et al., 2018). Nesse contexto, este trabalho buscou avaliar cepas de diferentes espécies quanto à capacidade de solubilizar fosfato de cálcio e o fosfato natural de rocha (termofosfato) visando a promover a eficiência no uso do P em genótipos de milho-pipoca durante o estágio de desenvolvimento vegetativo (V4).

Nos testes de solubilização de fósforo em meio sólido (Figura 4, Tabela 3), o isolado *A. brasilense* se destacou por sua habilidade em solubilizar fosfato de cálcio em meio líquido, apresentando índice de solubilização de 3,8, resultado superior à média dos demais isolados bacterianos, indicando seu potencial para testes futuros como inoculante. *A. brasilense* é a espécie promotora de crescimento vegetal mais estudada do gênero *Azospirillum* (Mendonça et al., 2020). Devido à

capacidade de colonizar tanto a parte interna quanto externa da raiz, além de outros órgãos vegetais, essa bactéria tem se destacado por sua eficiente promoção de crescimento, especialmente em condições de estresses abióticos (Silveira et al., 2019; Souza et al., 2019; Zaheer et al., 2019; Narayanasamy et al., 2020). A resposta positiva das plantas inoculadas com *A. brasilense* ocorre porque, além da aquisição eficiente de nutrientes, essa espécie sintetiza e libera metabólitos reguladores de crescimento em plantas, sendo o fitormônio auxina na forma de ácido indolacético (AIA) o mais importante (Cassán et al., 2020). Apesar dos mecanismos de promoção de crescimento por *A. brasilense* estarem bem estabelecidos na literatura, aqueles envolvidos na mitigação do estresse por solubilização de fosfatos e alteração nas membranas da planta ainda carecem de maiores evidências, destacando a relevância desse estudo.

Ademais, observou-se que algumas cepas não formaram halos em testes realizados em meio sólido, mas demonstraram expressiva capacidade de solubilização de fosfato quando submetidas a ensaios em meio líquido. A exemplo disso, destaca-se *L. adecarboxylata* que, mesmo apresentando mediana capacidade de solubilização de P em testes em meio sólido (Figura 4 e Tabela 3), se evidenciou como uma cepa promissora na solubilização de fosfatos em testes em meio líquido com termofosfato (Figura 5), sobretudo para uma resposta rápida de solubilização inicial do P, destacando-se também como uma candidata promissora para participação em testes de inoculação em plantas.

Contudo, cumpre destacar que existem poucos estudos disponíveis sobre a eficácia de *L. adecarboxylata* como promotora de crescimento em plantas. Algumas investigações anteriores já tiveram sucesso em identificar a colonização de *L. adecarboxylata* em raízes de algumas culturas, como milho (Snak et al., 2021), soja (Kang et al., 2019) e mamão (Conceição, 2014). Nessa perspectiva, Conceição (2014) avaliou a cepa de *L. adecarboxylata* NS87, isolada da rizosfera de *Carica papaya*, que apresentou capacidade de solubilizar fosfato quando testada em meio sólido NBRIP e em meio líquido NBRIP, corroborando parcialmente com os resultados desse trabalho, que não verificou alta solubilização de P por *L. adecarboxylata* em meio sólido. Além disso, no estudo de Conceição (2014), a estirpe apresentou eficiência em produzir fitormônios e sideróforos que regulam o crescimento, controlando processos como divisão celular, alongamento, diferenciação e senescência, e quelam moléculas de fósforo que facilitam sua

absorção pelas plantas em solos pobres em P, promovendo a melhoria no metabolismo e vigor vegetal.

Mais recentemente, Snak et al. (2021) analisando o genoma da cepa isolada de milho *L. adecarboxylata*, identificaram genes associados à promoção de crescimento vegetal, incluindo a produção de AIA. Desse modo, até onde se tem conhecimento, o presente estudo se destaca como um dos pioneiros na caracterização da interação desse microrganismo com plantas visando ao aumento na solubilização de P no solo.

Não se pode deixar de destacar que o baixo desempenho de *L. adecarboxylata* em teste em meio sólido e seu destaque no teste de solubilização em meio líquido ressaltam a necessidade da realização do teste de cepas promissoras em distintos meios. Isso porque a seleção de cepas que solubilizam fosfatos é realizada predominantemente por meio de triagens em meios sólidos que contêm fontes insolúveis de fosfato, como fosfato de cálcio, fosfato de alumínio e fosfato de ferro. Nesses meios, a eficiência do isolado é avaliada pela formação de halos ao redor das colônias. No entanto, diversos estudos apontam que essa metodologia, considerada qualitativa, pode resultar na exclusão de cepas com potencial significativo (Salcedo et al., 2014; Sousa et al., 2016), que foi o caso da *L. adecarboxylata* nesse estudo, realçando a necessidade de testagem em meio líquido.

6.2. Impacto das bactérias solubilizadoras de fosfato na promoção do crescimento e na eficiência do uso do fósforo em milho-pipoca

Os híbridos se beneficiaram mais da interação com os microrganismos do que as linhagens, indicando que a combinação genética nos híbridos potencializa a eficiência na utilização de fósforo disponibilizado pelas bactérias. Entre as características avaliadas, a altura da planta aos 20 dias, a massa seca foliar e a área foliar apresentaram os maiores incrementos decorrente da inoculação.

A superioridade de *A. brasilense*, responsável por aumentos médios de 23% na altura e de até 121% na área foliar dos híbridos, pode ser atribuída à síntese de fitohormônios e à melhoria na absorção de nutrientes, com impactos positivos no aumento da área de superfície para captura da luz solar, favorecendo, assim, a fotossíntese e, conseqüentemente, o crescimento das plantas (Figura 7). *L. adecarboxylata*, embora em intensidade mais modesta, também demonstrou

potencial na promoção do crescimento vegetal, especialmente em genótipos específicos, como no híbrido L75×L80, superando o efeito da interação com *A. brasilense*. Esses resultados reforçam a compreensão de que a interação entre plantas e microrganismos é um sinergismo complexo e altamente influenciado pelas características genéticas das plantas, que são capazes de recrutar diferentes cepas bacterianas (Bulgarelli et al., 2013; Yeoh et al., 2017; Walters et al., 2018; Piński et al., 2019). Essa dinâmica revela que os benefícios promovidos pelas bactérias não são uniformes, mas dependem da especificidade genética, afetando o crescimento, a tolerância a estresses e a eficiência no uso de recursos (Rodríguez et al., 2019; Oliveira et al., 2024; Souza et al., 2024).

Os benefícios proporcionados pelas bactérias solubilizadoras de fósforo também foram evidentes na eficiência de uso do fósforo (PUE), que se refere à capacidade das plantas de adquirir e usar fósforo do solo para produzir biomassa e grãos (Manske et al., 2000) e tem como componente secundário a eficiência de absorção (PUPE). Esta, por sua vez, representa a capacidade das plantas de absorver o fósforo do solo (Gu et al., 2016; Manske et al., 2000). Assim, melhorar PUE pode ser alcançada por meio da melhoria da eficiência de absorção de fósforo (PUPE) (Clemens et al., 2016). Nessa perspectiva, observa-se que a inoculação promoveu ganhos médios de 154% em PUPE com *A. brasilense* e de 130% com *L. adecarboxylata*, resultando em aumentos de 96% e 92%, respectivamente, na eficiência de uso (PUE). Esses achados demonstram que a interação com os microrganismos é capaz de otimizar a captação e o aproveitamento de fósforo pelo sistema radicular, contribuindo diretamente para o crescimento e o desenvolvimento do milho-pipoca, com impactos significativos em todo o metabolismo vegetal.

Ainda nessa seara, não é exorbitante destacar o efeito benéfico otimizador das bactérias aqui avaliadas, haja vista que em se aludindo aos resultados de Gerhardt et al. (2019), que destacaram P7×L80 como um dos híbridos superiores, também na pesquisa aqui desenvolvida, esse genótipo notadamente expressou aumentos representativos em PUPE e PUE decorrentes da inoculação bacteriana, sobretudo com *A. brasilense*, asseverando a potencialidade da interação bacteriana com milho-pipoca, mesmo em genótipo previamente caracterizado como eficiente no uso do P.

Todavia, dado o caráter exploratório deste estudo, é importante ressaltar que essas evidências ainda são pioneiras e em nível de casa de vegetação, destacando a relevância de implementação de futuras pesquisas com a cultura do milho-pipoca em campo, de modo que se investiguem para essa condição os mecanismos envolvidos e as interações específicas entre genótipos e microrganismos.

6.3. As mudanças fisiológicas subjacentes à promoção no desenvolvimento de milho-pipoca em ambiente com baixo P em resposta à inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato

A disponibilidade adequada de fósforo é crucial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, desempenhando cabal função na fotossíntese e na produção de biomassa vegetal (Carstensen et al., 2018; Dusenge et al., 2019; Kayoumu et al., 2023). O fosfato inorgânico (Pi) participa de processos cruciais, como o Ciclo de Calvin-Benson e a fotofosforilação. No Ciclo de Calvin-Benson, o Pi é gerado durante a fase de redução, quando o 1,3-bifosfoglicerato é convertido em gliceraldeído-3-fosfato (G3P), bem como na fase de regeneração, em que intermediários são convertidos para formar ribulose-1,5-bifosfato (RuBP). Na fotofosforilação, o Pi liberado no Ciclo de Calvin é reutilizado para a síntese de ATP pela ATP sintase nos tilacoides. Além disso, o Pi é elemento-chave na síntese de sacarose e na exportação de trioses-fosfato, que culminam na produção de carboidratos. Dessa forma, o Pi é fundamental para o fluxo contínuo de energia e carbono, conectando as reações fotoquímicas à assimilação de carbono e à produção de energia nas plantas (Dusenge et al., 2019; Suzuki et al., 2022).

Estudos explorando o efeito de bactérias promotoras do crescimento vegetal em características associadas à fotoquímica e trocas gasosas foliares das plantas ainda são escassos. Nesse sentido, no presente estudo buscou-se explorar como a inoculação com *A. brasilense* e *L. adecarboxylata* poderia impactar índices fisiológicos associados à fluorescência da clorofila, trocas gasosas foliares e conteúdo de pigmentos foliares, e como esses impactos poderiam afetar características do crescimento e desenvolvimento vegetal. Os resultados evidenciam que a promoção da fotossíntese e dos fatores associados está diretamente relacionada à capacidade das bactérias *A. brasilense* e *L. adecarboxylata* em solubilizarem fosfatos no solo, fornecendo fósforo inorgânico

(Pi) disponível para as plantas, otimizando processos críticos dependentes de fósforo, como a síntese de ATP e NADPH no Ciclo de Calvin-Benson, fundamentais para a fixação de carbono e a assimilação de CO₂.

A superioridade de *A. brasilense*, que promoveu incrementos significativos na taxa fotossintética líquida (70% em média), pode ser explicada por sua elevada eficiência na disponibilização de Pi, essencial para a fotofosforilação e a regeneração de ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), etapas-chave na manutenção da fotossíntese. O aumento expressivo na condutância estomática (103% nas linhagens e 94% nos híbridos) e na transpiração (95% e 65%, respectivamente) indica que o fósforo disponibilizado pelas bactérias favoreceu o funcionamento dos estômatos, otimizando a absorção de CO₂ e a regulação térmica, processos fundamentais para a maximização da eficiência fotossintética.

No caso de *L. adecarboxylata*, embora os incrementos tenham sido menores (50% na fotossíntese das linhagens e 26% nos híbridos), seus efeitos ainda destacam a importância do fósforo na fotossíntese. Os aumentos na condutância estomática (51% nas linhagens e 15% nos híbridos) e na transpiração (58% e 28%, respectivamente) também corroboram a capacidade dessa bactéria de solubilizar fosfatos e fornecer Pi, mesmo que em menor magnitude em comparação à *A. brasilense*.

Ademais, a menor concentração intercelular de CO₂ observada nas plantas inoculadas com *L. adecarboxylata* (reduções de 5% nas linhagens e de 8% nos híbridos) indica uma maior eficiência no uso de CO₂ pela via fotossintética, possivelmente associada à maior disponibilidade de fósforo e ao fortalecimento do Ciclo de Calvin. Por outro lado, os incrementos moderados na concentração intercelular de CO₂ nas plantas tratadas com *A. brasilense* (13% nas linhagens e 9% nos híbridos) indicam maior captura de CO₂, possibilitada pelo aumento na condutância estomática e pela melhoria nas condições metabólicas.

Além disso, os resultados para o índice de capacidade absorptiva (Pi_Abs) confirmaram a melhoria da eficiência fotossintética nas plantas inoculadas com as bactérias solubilizadoras de fosfato. A inoculação com *A. brasilense* resultou em incrementos médios de 21% nas linhagens e de 15% nos híbridos, reforçando a maior eficiência na conversão de energia luminosa em energia química, um processo fortemente dependente da disponibilidade de Pi. O aumento em Pi_Abs reflete a melhoria na eficiência fotoquímica, diretamente associada ao aumento de

Pi e à otimização do Ciclo de Calvin-Benson. A inoculação com *L. adecarboxylata* também proporcionou incrementos, porém menores em Pi_Abs (9% nas linhagens e 15% nos híbridos), mas ainda assim contribuiu para o aumento da eficiência metabólica das plantas, corroborando a importância da solubilização de fosfato na promoção da fotossíntese.

Apesar de não haver mudanças significativas no conteúdo de pigmentos foliares, a combinação de melhorias na fotossíntese líquida, na condutância estomática e na fluorescência indica uma regulação eficiente do aparato fotossintético e do uso dos recursos disponíveis. Isso implica que as inoculações promovem ajustes biológicos que resultam em plantas mais adaptadas a maximizar a captação e uso dos nutrientes, favorecendo o crescimento e o potencial produtivo. Essas alterações ratificam o potencial das bactérias como agentes biofertilizantes para melhorar o desempenho agrícola de genótipos para cultivos mais sustentáveis.

6.4. Implicações para o melhoramento de plantas em face à inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato

Por décadas, o melhoramento de plantas focou em estratégias voltadas principalmente para a seleção de genótipos mais produtivos, priorizando características como rendimento, vigor e resistência a pragas e doenças, sem considerar de forma direta a interação das plantas com sua microbiota associada. Essa abordagem, embora tenha gerado avanços notáveis na produtividade agrícola, resultou em cultivares que, muitas vezes, dependem fortemente de insumos externos, como fertilizantes e defensivos químicos, devido à perda ou subutilização de interações benéficas com microrganismos do solo.

Hoje, reconhece-se que a ausência desses microrganismos, fundamentais para processos como ciclagem de nutrientes, indução de resistência e tolerância a estresses abióticos, compromete a resiliência das plantas em ambientes desafiadores. Incorporar a microbiota como parte das estratégias de melhoramento genético oferece uma oportunidade única para desenvolver cultivares que não apenas sejam mais produtivas, mas também mais sustentáveis e adaptáveis, ao potencializar sinergias entre plantas e microrganismos benéficos, promovendo sistemas agrícolas mais equilibrados e eficientes. Compreender como essa interação planta-microrganismo influencia no controle genético de características

importantes, como aquelas associadas ao desenvolvimento das plantas, permite delimitar estratégias mais eficientes e direcionadas para programas de melhoramento genético vegetal com enfoque na sustentabilidade agrícola.

Nesse aspecto, o presente estudo, ao investigar a dinâmica do controle genético das características relacionadas à promoção do crescimento de plantas, mediante a inoculação com dois isolados bacterianos selecionados (*A. brasilense* e *L. adecarboxylata*), fundamenta-se na potencialidade da análise dialélica em fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento de milho-pipoca em associação com microrganismos para aumento na eficiência do uso do P.

O uso do dialelo de Griffing, por exemplo, permite a identificação de como essas interações influenciam o controle genético de características. O componente quadrático (ϕg) associado à capacidade geral de combinação (CGC) está relacionado aos efeitos aditivos, traduzindo a contribuição média dos genitores para a progênie e a frequência de alelos favoráveis em sua composição genética. Por outro lado, o componente quadrático (ϕs) associado à capacidade específica de combinação (CEC) expressa os efeitos gênicos não-aditivos, como dominância e epistasia, sendo estimado pelo desvio em relação ao comportamento esperado com base na CGC. Essa abordagem possibilita compreender como fatores genéticos e interações com microrganismos, como bactérias solubilizadoras de fosfato, podem influenciar características associadas ao crescimento vegetal. Dessa forma, é possível determinar estratégias mais precisas para o melhoramento genético, considerando tanto a contribuição direta dos genitores quanto as interações específicas entre genótipos quando inoculados com microrganismos.

A interação significativa entre a capacidade específica de combinação (CEC) e a condição de inoculação, observada nesse estudo para as características de crescimento (altura de planta aos 20 dias, área foliar, diâmetro de colmo e massa seca das folhas) (Tabela Suplementar 2) e de índices fisiológicos (taxa fotossintética líquida, condutância estomática, concentração interna de CO₂, transpiração e conteúdo de clorofila) (Tabela Suplementar 3) revela como os efeitos gênicos não-aditivos são influenciados pela presença ou ausência de microrganismos. Isso indica que a resposta das combinações híbridas varia entre as condições de inoculação, evidenciando que algumas combinações genotípicas

apresentam melhor desempenho em ambientes inoculados devido à interação planta-microrganismo.

Embora a importância de ϕ_s tenha prevalecido para a maioria das características, algumas apresentam interações significativas com CGC (como massa seca da folha, concentração intercelular de CO_2 , conteúdo de clorofila e de flavonoides, bem como todas aquelas relacionadas à fluorescência da clorofila), indicando a influência da ação gênica aditiva, mesmo que em menor grau, além de demonstrar que a expressão dos alelos favoráveis pode ser potencializada ou atenuada pela interação planta-microrganismo. A epistasia também pode desempenhar um papel importante nesse contexto, uma vez que interações entre genes não alélicos podem modular a expressão dessas características, tornando a seleção genética ainda mais complexa. A interação entre diferentes locos pode influenciar a resposta das plantas às condições de inoculação, reforçando a necessidade de considerar tanto os efeitos aditivos quanto os não-aditivos no delineamento de estratégias de melhoramento.

De maneira geral, os resultados obtidos, quer sejam para características morfológicas ou índices fisiológicos, favorecem a argumentação de que a seleção de genótipos superiores deve ser específica para cada condição de inoculação, em vez de basear-se na média geral. Isso pode dificultar a seleção de genótipos promissores para ambas as condições, inoculadas e não-inoculadas, pois os alelos que controlam a expressão das características em uma condição de estudo podem ser diferentes ou apenas parcialmente diferentes daqueles que atuam na outra condição (Hao et al., 2010; Lu et al., 2011). Assim, as características sob condições de não-inoculação podem incluir genes que foram expressos ou silenciados em ambientes com suprimento ideal de fósforo (Hao et al., 2010; Lu et al., 2011; Rahman et al., 2011). Portanto, é essencial observar os resultados dos genitores (\hat{g}_i) e dos cruzamentos (\hat{s}_{ij}) em cada ambiente, promovendo a seleção de genótipos adequados para cada condição.

A significância de \hat{g}_i e \hat{s}_{ij} para a maioria das características indica que tanto os efeitos aditivos quanto os não-aditivos são relevantes para este estudo. Por conseguinte, a magnitude dos componentes quadráticos (ϕ_g e ϕ_s) pode revelar se a concentração de alelos favoráveis nos genitores ou a complementação alélica entre eles é o caminho mais adequado para a obtenção de genótipos superiores, guiando estratégias para o desenvolvimento de programa de melhoramento. Nesse

trabalho observou-se maior influência dos efeitos não-aditivos no controle das características morfológicas em ambas as condições de disponibilidade de inoculação (Figura 9), suportando a conclusão de que a exploração da heterose é a estratégia recomendada para a obtenção de genótipos superiores, tal qual como preconizado nos clássicos ensinamentos de Hallauer et al. (2010) e Cruz et al. (2014).

Os resultados inéditos obtidos nesse estudo ressaltam que pesquisas sobre microrganismos solubilizadores de fosfato podem ser integradas às práticas de melhoramento, permitindo que os melhoristas selecionem genótipos que demonstrem não apenas boas características agronômicas, mas que também maximizem as interações com a microbiota do solo. Além disso, as práticas de seleção podem ser direcionadas para promover a diversidade microbiana associada às raízes, criando um ecossistema que favoreça a saúde e o desenvolvimento das plantas.

Por fim, a identificação de linhagens e híbridos que respondem de maneira diferenciada às inoculações também abre caminho para pesquisas mais aprofundadas. Estudos voltados para a compreensão dos mecanismos genéticos e fisiológicos subjacentes à interação planta-microrganismo podem auxiliar no desenvolvimento de tecnologias mais direcionadas e eficientes para a implementação de uma agricultura sustentável. Estes achados têm implicações práticas importantes. Primeiro, eles reforçam a necessidade de selecionar genótipos específicos para maximizar os benefícios da inoculação com microrganismos. Segundo, apontam para a possibilidade de explorar híbridos, como L75×L80, em programas de melhoramento voltados para a otimização do uso de microrganismos específicos, como *L. adecarboxylata*. Essa abordagem pode representar uma estratégia viável para aumentar a produtividade agrícola de forma sustentável, reduzindo a dependência de insumos químicos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo evidenciam a complexidade das interações entre plantas e microrganismos, indicando que os genótipos de milho-pipoca apresentam comportamentos distintos no sinergismo com as bactérias solubilizadoras de fosfato. Isso reforça a importância de considerar não apenas o desempenho agrônomo *per se*, mas também a especificidade de interação entre genótipo e microrganismo ao selecionar plantas para o melhoramento genético, especialmente em condições de baixa disponibilidade de fósforo.

O estudo demonstrou o significativo potencial das bactérias solubilizadoras de fosfato, *A. brasilense* e *L. adecarboxylata*, na promoção do crescimento vegetal e no aprimoramento de índices fisiológicos, como taxa fotossintética líquida, condutância estomática e transpiração. Ambas as bactérias contribuíram para um melhor desempenho das plantas, evidenciando o benefício dessas interações simbióticas.

De maneira geral, os híbridos apresentaram maior eficiência no uso de fósforo, com crescimento mais vigoroso em comparação às linhagens, demonstrando serem mais promissores para o desenvolvimento de plantas resilientes a estresses ambientais. Apesar disso, o comportamento das bactérias variou entre os genótipos. *A. brasilense* mostrou-se mais eficiente em promover ganhos na maioria dos híbridos e linhagens avaliadas, resultando em maior crescimento e desempenho fisiológico. Entretanto, o híbrido L75×L80 destacou-se por apresentar o melhor sinergismo com *L. adecarboxylata*, superando os efeitos

de *A. brasilense* nesse genótipo específico, evidenciando a influência genótipo-específica nas interações planta-microrganismo.

Além disso, a inoculação com essas bactérias melhorou a eficiência no uso e absorção de fósforo pelas plantas, otimizando a captação e aproveitamento desse nutriente em solos com baixa disponibilidade. Esses resultados indicam que a combinação de estratégias de melhoramento genético com a utilização de bactérias solubilizadoras de fosfato tende a ser uma opção eficiente para aumentar a produtividade do milho-pipoca, reduzir a dependência de fertilizantes químicos e promover práticas agrícolas mais sustentáveis. Assim, o estudo ressalta o potencial dessas bactérias como biofertilizantes promissores para sistemas agrícolas modernos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, C. S. (2014). Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para a biossolubilização de rochas fosfáticas. *Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)* – Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG.
- Alewell, C., Ringeval, B., Ballabio, C., Robinson, D., Panagos, P., & Borrelli, P. (2020). Global phosphorus scarcity will be aggravated by soil erosion. *Nature Communications*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18326-7>
- 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, 971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Amadou, I., Faucon, M., & Houben, D. (2022). Role of soil minerals in organic phosphorus availability and plant phosphorus uptake. *Geoderma*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1310515/v1>
- Anschutz, P., & Deborde, J. (2016). Spectrophotometric determination of phosphate in matrices from sequential leaching of sediments. *Limnology and Oceanography: Methods*, 14(4), 245-256. <https://doi.org/10.1002/lom3.10086>
- Araujo, F. F. (2008). Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras, e desenvolvimento de milho, soja e algodão. *Ciência e*

Agrotecnologia, 32, 456-462. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000200016>

Aslam, Z., Yahya, M., Hussain, H., Tabbasum, S., Jalaluddin, S., Khaliq, S., & Yasmin, S. (2024). Development of bio-organic phosphate fertilizer enriched with rock phosphate for sustainable wheat production. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1361574>

Baldotto, M. A., Giro, V. B., Baldotto, L. E. B., Canellas, L. P., & Velloso, A. C. X. (2011). Initial performance of pineapple and utilization of rock phosphate applied in combination with organic compounds to leaf axils. *Soil Science and Plant Nutrition, Revista Ceres*, 58(3), June. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2011000300013>

Barroso, C. B. (2006). Produção de pellets livres e imobilizados e mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos por *Aspergillus niger*. *Tese (Doutorado)* – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 96 p.

Barrow, N. J. (2017). The effects of pH on phosphate uptake from the soil. *Plant and Soil*, 410, 401-410. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3008-9>

Bashan, Y., & De-Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in Agronomy*, 108, 77-136. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)

Batista, F. D. C., Fernandes, T. A., Abreu, C. S., Oliveira, M. C., Ribeiro, V. P., Gomes, E. A., Oliveira, C. (2018). Potencial de microrganismos rizosféricos e endofíticos de milho em solubilizar o fosfato de ferro e produzir sideróforos. *Embrapa Milho e Sorgo – Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*.

Behera, B. C., Singdevsachan, S. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2014). Diversity, mechanism, and biotechnology of phosphate-solubilising microorganisms in mangrove – A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 97-110. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008>

Bispo, R., Barboza Bispo, R., Teixeira do Amaral, A., Pinto, V. B., de Oliveira Santos, T., Jário de Lima, V., Rohem Simão, B., & Alvarez, S. (2024). Unraveling the mechanisms of efficient phosphorus utilization in popcorn (*Zea mays* L. var.

- everta): Insights from proteomic and metabolite analysis. *Journal of Proteome Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c00001>
- Blanco, L., Béjar, V., Sampedro, I., & Llamas, I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65514-7>
- Blume, H.-P., Brümmer, G. W., Fleige, H., Horn, R., Kandeler, E., Kögel-Knabner, I. (2016). Scheffer/Schachtschabel soil science. *Springer Berlin Heidelberg*, 1-6. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30942-7>
- Bodhankar, S., Grover, M., Hemanth, S., Reddy, G., Rasul, S., Yadav, S. K., & Srinivasarao, C. (2017). Maize seed endophytic bacteria: Dominance of antagonistic, lytic enzyme-producing *Bacillus* spp. *3 Biotech*, *7*(4), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0947-8>
- Brasil, E. C., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., Pitta, G. V. E., & Carvalho, J. G. D. (2007). Matéria seca e acúmulo de nutrientes em genótipos de milho contrastantes quanto à aquisição de fósforo. *Ciência e Agrotecnologia*, *31*(3), 704–712. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000300027>
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
- Busby, P. E., Soman, C., Wagner, M. R., Friesen, M. L., Kremer, J., Bennett, D., Dangel, J. L. (2017). Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLOS Biology*, *15*(3), e2001793. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001793>
- Caporossi, D. S., Ruiz, L. V. S., Senra, M. F., & Jardini, D. C. (2024). Desenvolvimento e produtividade da cultura do milho em função de doses de fósforo associado a microrganismos solubilizadores de fosfatos. *Connection Line - Revista Eletrônica do Univag*, (31).

- Carstensen, A., Herdean, A., Schmidt, S. B., Sharma, A., Spetea, C., Pribil, M., & Husted, S. (2018). The impacts of phosphorus deficiency on the photosynthetic electron transport chain. *Plant Physiology*, 177(1), 271–284. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01624>
- Chancellor International AgriBusiness. (2021). Portfólio: Popcorn. Recuperado de <https://agribusiness.chancellor.com.br/popcorn/>
- Chen, X., Yang, C., Palta, J., Li, Y., & Fan, X. (2022). An *Enterobacter cloacae* NG-33 strain capable of phosphate solubilization and maize growth promotion. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1047313>
- Conceição, J. M. D. (2014). Diversidade bacteriana e funcional na rizosfera de plantas de *carica papaya L.* sob sistema de cultivo orgânico e convencional. Tese de Doutorado, Vila Velha.
- Colombo, G. A., Vaz-De-Melo, A., De Souza, A. S., & Silva, J. (2018). Capacidade combinatória de híbridos de milho para eficiência e resposta ao uso do fósforo. *Revista Agrogeoambiental*, 10(2), 1–12. <https://doi.org/10.18406/2316-1817v10n220181084>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Condrón, L. M., Turner, B. L., & Cade-Menun, B. J. (2005). Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. In J. T. Sims & A. N. Sharpley (Eds.), *Phosphorus: Agriculture and the Environment* (pp. 87–121). American Society of Agronomy. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr46.c4>
- Cordell, D., & White, S. (2010). The story of phosphorus: sustainability implications of global phosphate scarcity for a net food-producing nation. *Science of the Total Environment*, 408(22), 4646–4659. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.043>
- Cordell, D., & White, S. (2014). Life's bottleneck: sustaining the world's phosphorus for a food secure future. *Annual Review of Environment and Resources*, 39, 161–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-010213-113300>

- Cruz, C. D., Carneiro, P. C. S., & Regazzi, A. J. (2014). *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético* (Vol. 2). UFV.
- da Conceição Silva, T. R., do Amaral Júnior, A. T., de Almeida Filho, J. E., Freitas, M. S. M., Guimarães, A. G., & Kamphorst, S. H. (2019). Contrasting phosphorus environments as indicators for popcorn breeding lines. *Functional Plant Breeding Journal*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.35418/2526-4117/v1n1a1>
- De Godoy, J. F., & Tavares, B. A. (2021). A evolução do ciclo do fósforo. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 14(4), 1–15. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2021v14n4e8250>
- De Oliveira, L. C. A., Carneiro, M. de A., Litter, F. A. ., Carvalho, M. A. C. de ., Yamashita, O. M. ., & Caione, G. (2021). Frações de fósforo em função do uso de fertilizantes fosfatados em distintas classes de solo. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 14(4), 1–15. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2021v14n4e8921>
- Deng, C., Zhang, N., Liang, X., Huang, T., & Li, B. (2022). *Bacillus aryabhattai* LAD impacts rhizosphere bacterial community structure and promotes maize plant growth. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12032>
- Dias, A. C. (2016). Transformações do nitrogênio no solo. In E. J. Cardoso & F. D. Andreote (Eds.), *Microbiologia do solo* (pp. 99–109). Embrapa.
- DoVale, J. C., & Fritsche-Neto, R. (2013). Genetic control of traits associated with phosphorus use efficiency in maize by REML/BLUP. *Revista Ciência Agronômica*, 44(3), 554–563. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000300015>
- Doydora, S., Gatiboni, L., Grieger, K., Hesterberg, D., Jones, J., McLamore, E., Peters, R., Sozzani, R., Van Den Broeck, L., & Duckworth, O. (2020). Accessing legacy phosphorus in soils. *Soil Systems*. <https://doi.org/10.3390/soilsystems4040074>
- Elhaissofi, W., Ghoulam, C., Barakat, A., Zeroual, Y., & Bargaz, A. (2022). Phosphate bacterial solubilization: A key rhizosphere driving force enabling

higher P use efficiency and crop productivity. *Journal of Advanced Research*, 38, 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.010>

Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., ... & Khan, F. A. (2015). Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: Consequences for changing environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7), 4907–4921. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3754-2>

FAO, IFAD, & WFP. (2015). The State of Insecurity in the World [Relatório eletrônico]. Recuperado de <http://www.fao.org/3/i4646e/i4646e.pdf>

FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2020). The State of Food Security and Nutrition in the World (SOFI) [Relatório eletrônico]. Recuperado de <http://www.fao.org/publications/sofi/en/>

FAO. (2022). Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Índice de precios de los alimentos de la FAO [Internet]. Recuperado de <http://www.fao.org/worldfoodsituation/foodpricesindex/es/>

Faria Junior, C. A., Freitas, P. S. L., Dallacort, R., Mito, L. S., & Barbieri, J. D. (2020). Agricultural zoning of popcorn corn for the state of Mato Grosso, Brazil. *Applied Research & Agrotechnology*, 13, e6449. <https://doi.org/10.5935/PAeT.V13.N4.02>

Favela, A., Bohn, O. M., & Kent, A. D. (2021). Maize germplasm chronosequence shows crop breeding history impacts recruitment of the rhizosphere microbiome. *The ISME Journal*, 15, 2454–2464. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00965-y>

Fidelis, R. R., Miranda, G. V., Pelúzio, J. M., & Galvão, J. C. C. (2010). Classificação de populações de milho quanto à eficiência e resposta ao uso de fósforo. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 32(2), 241–246. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i2.1158>

Filippelli, G. M. (2002). The global phosphorus cycle. In F. H. De Gruyter Mouton (Ed.), *Phosphates: Geochemical, geobiological, and materials importance* (Vol. 48, pp. 425–443). <https://doi.org/10.2138/rmg.2002.48.10>

- Fitriatin, B., & Joy, B. (2024). Phosphatase activity of phosphate-solubilizing microbes affected by organic P substrate and acidity. *International Journal of Frontiers in Life Science Research*. <https://doi.org/10.53294/ijflsr.2024.6.2.0034>
- Fritsche-Neto, R., Miranda, G. V., Delima, R. O., Souza, L. V. D., & Silva, J. D. (2010). Herança de caracteres associados à eficiência de utilização do fósforo em milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(5), 465–471. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000500008>
- Galinat, W. C. (1979). Maize. In *Ciba-Geigy Agrochemicals* (p. 105). Basle, Switzerland: Ciba-Geigy Agrochemicals.
- Gerhardt, I. F. S., Amaral Júnior, A. T., Guimarães, L. J. M., Schwantes, I. A., Santos, A., Kamphorst, S. H., & Myers, G. O. (2017). Intraspecific variability of popcorn S7 lines for phosphorus efficiency in the soil. *Genetics and Molecular Research*, 16(3), 1–13. <https://doi.org/10.4238/gmr16039836>
- Gerhardt, I. F., Amaral Junior, A. T., Ferreira Pena, G., Moreira Guimarães, L. J., De Lima, V. J., Vivas, M., & Kamphorst, S. H. (2019). Genetic effects on the efficiency and responsiveness to phosphorus use in popcorn as estimated by diallel analysis. *PLOS ONE*, 14(5), e0216980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216980>
- Gerke, J. (2015). Phytate (inositol hexakisphosphate) in soil and phosphate acquisition from inositol phosphates by higher plants: A review. *Plants*, 4(2), 253–266. <https://doi.org/10.3390/plants4020253>
- Gomes, E. A., Silva, U. C., Marriel, I. E., Oliveira, C. A., & Lana, U. G. P. (2014). Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 13(1), 69–81. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v13n1p69-81>
- Goodman, M. M., & Smith, J. S. C. (1987). Botânica. In Paterniani, E., & Viegas, G. P. (Eds.), *Melhoramento e produção de milho* (pp. 41–78). Campinas: Fundação Cargill.
- Guo, C., Guo, L., Li, X., Gu, J., Zhao, M., Duan, W., & Xiao, K. (2014). TaPT2, a high-affinity phosphate transporter gene in wheat (*Triticum aestivum* L.), is crucial

in plant Pi uptake under phosphorus deprivation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(6), 1373–1384. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1522-0>

Inácio, A. C. F., dos Santos Hara, F. A., Vendruscolo, J., Neto, P. D. Q. C., & de Souza, L. C. C. (2020). Caracterização morfofisiológica de bactérias solubilizadoras de fosfatos provenientes da rizosfera de plantas alimentícias não convencionais. *Brazilian Journal of Development*, 6(5), 24547–24565. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-043>

Jarvie, H. P., Withers, J. A., & Neal, C. (2002). Review of robust measurement of phosphorus in river water: Sampling, storage, fractionation, and sensitivity. *Hydrology and Earth System Sciences*, 6(1), 113–131. <https://doi.org/10.5194/hess-6-113-2002>

Jiang, H., Zhang, J., Han, Z., Yang, J., Ge, C., & Wu, Q. (2017). Revealing new insights into different phosphorus-starving responses between two maize (*Zea mays*) inbred lines by transcriptomic and proteomic studies. *Scientific Reports*, 7(1), 44294. <https://doi.org/10.1038/srep44294>.

Kaur, G., & Reddy, M. S. (2015). Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate, and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere*, 25(3), 428–437. DOI:10.1016/S1002-0160(15)30010-2

Kleinert, A., Thuynsma, R., Magadlela, A., Benedito, V. A., & Valentine, A. J. (2017). Metabolism and transport of carbon in legume nodules under phosphorus deficiency. In J. Kumar, H. P. Lam-Son, & P. Choudhary (Eds.), *Legume Nitrogen Fixation in Soils with Low Phosphorus Availability* (pp. 77–95). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55729-8_6

Kowalenko, C. G. (2008). Extraction times and analysis methods influence soil test measurements of phosphorus and sulphur. *Canadian Journal of Soil Science*, 88(5), 733–747. <https://doi.org/10.4141/CJSS08022>

Kozerski, L. P., & Ferreira, M. M. (2023). Atributos químicos de diferentes ambientes edáficos no vale do Jamari-Ro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*.

Lambers, H., & Plaxton, W. C. (2018). Phosphorus: Back to the roots. *Annual Plant Reviews online*, 3–22.

- Lan, Ping., Li, Wenfeng., & Schmidt, Wolfgang. (2018). 'Omics' approaches towards understanding plant phosphorus acquisition and use. *Annual Plant Reviews online*, 65–97.
- Larish, L. B., & Brewbaker, J. L. (1999). Diallel analyses of temperate and tropical popcorns. *Maydica*, 44(4), 279–284.
- Liang, J. L., Liu, J., Jia, P., Yang, T. T., Zeng, Q. W., Zhang, S. C., et al. (2020). Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. *ISME Journal*, 14, 1600–1613. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0623-9>
- Lidbury, I., Scanlan, D., Murphy, A., Christie-Oleza, J., Aguilo-Ferretjans, M., Hitchcock, A., & Daniell, T. (2022). A widely distributed phosphate-insensitive phosphatase provides a route for rapid organophosphate remineralization in the biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2118122119>
- Liebisch, F., Keller, F., Huguenin-Elie, O., et al. (2014). Seasonal dynamics and turnover of microbial phosphorus in a permanent grassland. *Biology and Fertility of Soils*, 50, 465–475. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0909-3>
- Liu, F., Xu, Y., Han, G., Wang, W., Li, X., & Cheng, B. (2018). Identification and functional characterization of a maize phosphate transporter induced by mycorrhiza formation. *Plant and Cell Physiology*, 59(8), 1683–1694. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy112>
- Liu, F., Xu, Y., Jiang, H., Jiang, C., Du, Y., Gong, C., & Cheng, B. (2016). Systematic identification, evolution and expression analysis of the *Zea mays* PHT1 gene family reveals several new members involved in root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 930. <https://doi.org/10.3390/ijms17060930>
- Liu, J., Yang, L., Luan, M., Wang, Y., Zhang, C., Zhang, B., & Luan, S. (2015). A vacuolar phosphate transporter essential for phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), E6571–E6578. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516093112>

- Liu, X. L., Wang, L., Wang, X. W., Yan, Y., Yang, X. L., Xie, M. Y., & Xu, G. H. (2020). Mutation of the chloroplast-localized phosphate transporter OsPHT2;1 reduces flavonoid accumulation and UV tolerance in rice. *The Plant Journal*, *102*(1), 53–67. <https://doi.org/10.1111/tpj.14600>
- Lopez-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. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035717>
- Luo, D., Shi, J., Li, M., Chen, J., Wang, T., Zhang, Q., Yang, L., Zhu, N., & Wang, Y. (2024). Consortium of phosphate-solubilizing bacteria promotes maize growth and alters rhizosphere soil microbial community composition. *Agronomy*. <https://doi.org/10.3390/agronomy14071535>
- Lynch, J. P. (2007). Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany*, *55*(5), 493–512. <https://doi.org/10.1071/BT06118>
- MacDonald, G. K., Bennett, E. M., Potter, P. A., & Ramankutty, N. (2011). Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(7), 3086–3091. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010808108>
- Machado, C. T. D. T., Guerra, J. G., Almeida, D. L. D., & Machado, A. T. (1999). Variabilidade entre genótipos de milho para eficiência no uso de fósforo. *Bragantia*, *58*(1), 109–124. <https://doi.org/10.1590/S0006-87051999000100017>
- Mangelsdorf, P. C., & Smith Jr, C. E. (1949). A discovery of remains of primitive maize in New Mexico. *Journal of Heredity*, *40*(2), 39–43. <https://doi.org/10.1093/jhered/40.2.39>
- Martins, L. D., Rodrigues, W. N., Christro, L. F., Colodetti, T. V., Brinate, S. B., Teixeira, J. F. A., & Laviola, B. G. (2015). Simultaneous selection of physic nut genotypes (*Jatropha curcas* L.) for efficient absorption and utilization of N and P. *Australian Journal of Crop Science*, *9*(3), 248–257.
- Meirelles, W. F., Parentoni, S. N., Guimarães, L. J. M., Guimarães, P. E. D. O., Pacheco, C. A. P., Oliveira, A. C. D., & Scapim, C. A. (2016). Diallel analysis of

maize lines as to their phosphorus responsiveness and use efficiency. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(3), 224–232. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000300002>

Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Abióticos (2a ed.). (2023). <https://www.editoraufv.com.br/produto/melhoramento-de-plantas-para-estresses-abioticos-2-edicao-revista-e-ampliada/1109324/>

Mendes, I. C., Sousa, D. M. G., Dantas, O. D., Lopes, A. A. C., Junior, F. B. R., Oliveira, M. I., & Chaer, G. M. (2021). Soil quality and grain yield: A win–win combination in clayey tropical oxisols. *Geoderma*, 388, 114880. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114880>

Mitter, E. K., Tosi, M., Obregón, D., Dunfield, K. E., & Germida, J. J. (2021). Rethinking crop nutrition in times of modern microbiology: Innovative biofertilizer technologies. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 29. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.683561>

Mlodzińska, E., & Zboińska, M. (2016). Phosphate uptake and allocation: A closer look at *Arabidopsis thaliana* L. and *Oryza sativa* L. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1198. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01198>

Moll, R. H., Kamprath, E. J., & Jackson, W. A. (1982). Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal*, 74, 562-564.

Mpanga, I. K., Nkebiwe, P. M., Kuhlmann, M., Cozzolino, V., Piccolo, A., Geistlinger, J., & Neumann, G. (2019). The form of N supply determines plant growth promotion by P-solubilizing microorganisms in maize. *Microorganisms*, 7(2), 38. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020038>

Nagul, E. A., McKelvie, I. D., Worsfold, P., & Kolev, S. D. (2015). The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Analytica Chimica Acta*, 890, 60–82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.030>

- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, *170*(1), 26. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13063.x>
- Okon, Y., & Labandera-Gonzalez, C. A. (1994). Aplicações agrônômicas de *Azospirillum*: uma avaliação de 20 anos de inoculação de campo em todo o mundo. *Soil Biology & Biochemistry*, *26*, 1591-1601. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90114-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90114-3)
- Ouyang, X., Hong, X., Zhao, X., Zhang, W., He, X., Ma, W., & Tong, Y. (2016). Knock out of the Phosphate 2 gene TaPHO2-A1 improves phosphorus uptake and grain yield under low phosphorus conditions in common wheat. *Scientific Reports*, *6*, 29850. <https://doi.org/10.1038/srep29850>
- Pang, F., Li, Q., Solanki, M., Wang, Z., Xing, Y., & Dong, D. (2024). Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1383813>
- Penn, C. J., & Camberato, J. J. (2019). A critical review on soil chemical processes that control how soil pH affects phosphorus availability to plants. *Agriculture*, *9*(6), 120. <https://doi.org/10.3390/agriculture9060120>
- Pereira, A. V. (2024). Solubilizadores de fosfatos associados a fontes de fósforo na cultura do milho.
- 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*, 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3055>
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., & Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1312*(1), 105-112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12410>
- Reis, M. N. O. (2021). Eficiência do sistema hidropônico como metodologia para a seleção de cepas solubilizadoras de CaHPO₄, utilizando *Glycine max* como modelo.

- Reis, R. S., De Moura Vale, E., Heringer, A. S., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2016). Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. *Journal of Proteomics*, 130, 170-179. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.029>
- Ribeiro, C., De Sousa Tinoco, S., De Souza, V., Negri, B., Gault, C., Pastina, M., Magalhães, J., Guimarães, L., De Barros, E., Buckler, E., & Guimarães, C. (2023). Genome-wide association study for root morphology and phosphorus acquisition efficiency in diverse maize panels. *International Journal of Molecular Sciences*, 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24076233>
- Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability: Update on microbial phosphorus. *Plant Physiology*, 156, 989–996. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175227>
- Rizvi, A., Zaidi, A., Khan, M. S., Saif, S., Ahmed, B., & Shahid, M. (2017). Growth improvement and management of vegetable diseases by plant growth-promoting rhizobacteria. In *Microbial strategies for vegetable production* (pp. 99-123). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-65030-7_6
- Rodríguez González, M. Á., Torres Béjar, M., Blanco, L., Bejar Luque, M. V., & Sampedro Quesada, M. I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6.
- 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\(99\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00044-6)
- Salcedo, L. D. P., Prieto, C., & Correa, M. F. (2014). Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the Eastern Cordillera of the Colombian Andes. *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), 734-742. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5940>
- Santos, T. O., Oliveira, F. T., Amaral Júnior, A. T., Almeida Filho, J. E., Bispo, R. B., Freitas, M. S. M., Amaral, J. F. T., Kamphorst, S. H., Lima, V. J., Viana, F. N., Pena, G. F., Santos, P. H. A. D., Bernado, W. P., Pereira, M. G., Oliveira, J. G.,

- Smith, R. B., & Trindade, R. S. (2022). Additive and non-additive effects on the control of key agronomic traits in popcorn lines under contrasting phosphorus conditions. *Plants*, 11, 3-22.
- Sawazaki, E. (2001). A cultura do milho-pipoca no Brasil. *O Agrônomo, Campinas*, 53(2), 11–18.
- Schroder, J. J., Cordell, D., Smit, A. L., & Rosemarin, A. (2010). Sustainable use of phosphorus: EU tender ENV. B1/ETU/2009/0025. *Plant Research International*. <https://edepot.wur.nl/163942>
- 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, 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., et al. (2011). Phosphorus dynamics: From soil to plant. *Plant Physiology*, 156, 997–1005. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>
- Silva Filho, G. N., & Vidor, C. (2000). Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24, 311–319.
- Silva, W. J., Vidal, B. C., Martins, M. E. Q., Vargas, H., Pereira, C., Zerbetto, M., & Miranda, L. C. (1993). What makes popcorn pop. *Nature*, 362(6419), 417. <https://doi.org/10.1038/362417a0>
- Silveira, C., Andreote, F., Ferraz-Almeida, R., Carvalho, J., Gorsuch, J., & Otto, R. (2023). Microbial solution of growth-promoting bacteria sprayed on monoammonium phosphate for soybean and maize production. *Agronomy*. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020581>
- Simão, B. R. (2022). Eficiência no uso do fósforo em milho-pipoca: Desvendando efeitos gênicos. Trabalho de Conclusão de Curso, Campos dos Goytacazes.
- Singh, P., Chauhan, P., Upadhyay, S., Singh, R., Dwivedi, P., Wang, J., Jain, D., & Jiang, M. (2022). Mechanistic insights and potential use of siderophore-producing

microbes in the rhizosphere for stress mitigation in crops grown on degraded lands. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.898979>

Smith, A. F. (2021). *Popped culture: A social history of popcorn in America*. University of South Carolina Press.

Smith, J. S. C., Duvick, D. N., Smith, O. S., Cooper, M., & Feng, L. (2004). Changes in pedigree backgrounds of pioneer brand maize hybrids widely grown from 1930 to 1999. *Crop Science*, 44, 1935–1946. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1935>

Solangi, F., Zhu, X., Khan, S., Rais, N., Majeed, A., Sabir, M., Iqbal, R., Ali, S., Hafeez, A., Ali, B., Ercişli, S., & Kayabasi, E. (2023). The global dilemma of soil legacy phosphorus and its improvement strategies under recent agroecosystem sustainability changes. *ACS Omega*, 8, 23271-23282. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00823>

Sousa, C. A., Junior, M. D. A. L., Fracetto, G. G. M., Freire, F. J., & Sobral, J. K. (2016). Evaluation methods used for phosphate-solubilizing bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 15(34), 1796-1805. <https://doi.org/10.5897/AJBR2016.1503>

Souto, L. A. (2020). Microrganismos solubilizadores de fosfato: Usos e potencialidades na agricultura. (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Srivastava, S., Upadhyay, M. K., Srivastava, A. K., Abdelrahman, M., Suprasanna, P., & Tran, L. S. P. (2018). Cellular and subcellular phosphate transport machinery in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1914. <https://doi.org/10.3390/ijms19071914>

Su, M., Meng, L., Zhao, L., Tang, Y., Qiu, J., Tian, D., & Li, Z. (2021). Phosphorus deficiency in red-colored soils: Insights from mineral-microbe interactions. *Geoderma*, 404, 115311. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2021.115311>

Tahir, M., Mirza, M. S., Zaheer, A., Dimitrov, M. R., Smidt, H., & Hameed, S. (2013). Isolation and identification of phosphate solubilizer *Azospirillum*, *Bacillus*, and *Enterobacter* strains by 16S rRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 7, 1284–1292.

- Timofeeva, A., Galyamova, M., & Sedykh, S. (2022). Prospects for the use of phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture. *Plants*, 11. <https://doi.org/10.3390/plants11162119>
- Varma, P. K., Uppala, S., Pavuluri, K., Chandra, K. J., Chapala, M. M., & Kumar, K. V. K. (2017). Endophytes: role and functions in crop health. In *Plant Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (pp. 291-310). Springer, Singapore. [DOI não disponível]
- Vassilev, N., Vassileva, M., Fenice, M., & Federici, F. (2001). Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Bioresource Technology*, 79, 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00186-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00186-6)
- Vengavasi, K., Pandey, R., Abraham, G., & Yadav, R. K. (2017). Comparative analysis of soybean root proteome reveals molecular basis of differential carboxylate efflux under low phosphorus stress. *Genes*, 8(12), 341. <https://doi.org/10.3390/genes8120341>
- Versaw, W. K., & Garcia, L. R. (2017). Intracellular transport and compartmentation of phosphate in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.06.005>
- Vidotti, M., Matias, F., Alves, F., Pérez-Rodríguez, P., Beltran, G., Burgueño, J., Crossa, J., & Fritsche-Neto, R. (2019). Responsividade do milho ao *Azospirillum brasilense*: Insights sobre controle genético, heterose e predição genômica. *PLOS ONE*, 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223850>
- Walters, W. A., Jin, Z., Youngblut, N., Wallace, J. G., Sutter, J., Zhang, W., et al. (2018). Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(29), 7368–7373. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801313115>
- Wang, Q., Ye, J., Wu, Y., Luo, S., Chen, B., Ma, L., et al. (2019). Promotion of the root development and Zn uptake of *Sedum alfredii* was achieved by an endophytic bacterium *Sasm05*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.080>

- Weihrauch, C., & Opp, C. (2018). Ecologically relevant phosphorus reservoirs in soils and their dynamics: The story so far. *Geoderma*. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2018.02.047>
- Wu, F., Li, J., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Wang, S., Shi, X., Li, L., & Liang, J. (2019). Effects of phosphate-solubilizing bacteria on growth, photosynthesis, and nutrient uptake of *Camellia oleifera* Abel. *Forests*. <https://doi.org/10.3390/F10040348>
- Yahya, M., Ul Islam, E., Rasul, M., Farooq, I., Mahreen, N., Tawab, A., ... & Yasmin, S. (2021). Differential Root Exudation and Architecture for Improved Growth of Wheat Mediated by Phosphate Solubilizing Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.726049>
- Yang, S. Y., Huang, T. K., Kuo, H. F., & Chiou, T. J. (2017). Role of vacuoles in phosphorus storage and remobilization. *Journal of Experimental Botany*, 68(12), 3045-3055. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx144>
- Yassitepe, J. D. C., Dante, R. A., Gerhardt, I. R., Fernandes, F., de Souza, R. S. C., da Silva, V. C. H., ... & Paulo Arruda. (2019). Centro de pesquisa em genômica aplicada a mudanças climáticas. *Microbiology*, 10, 1-18. [DOI não disponível]
- Yeoh, Y. K., Dennis, P. G., Paungfoo-Lonhienne, C., Weber, L., Brackin, R., Ragan, M. A., et al. (2017). Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence. *Nature Communications*, 8, 215. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00324-0>
- Yu, L. Y., Huang, H. B., Wang, X. H., Li, S., Feng, N. X., Zhao, H. M., et al. (2019). Novel phosphate-solubilizing bacteria isolated from sewage sludge and the mechanism of phosphate solubilization. *Science of the Total Environment*, 658, 474–484. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.212>
- Zeffa, D., Júnior, L., De Assis, R., Delfini, J., Marcos, A., Koltun, A., Baba, V., Constantino, L., Uhdre, R., Nogueira, A., Moda-Cirino, V., Scapim, C., & Gonçalves, L. (2024). Multilocus genome-wide association study for phosphorus use efficiency in tropical maize germplasm. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1366173>

- Zhang, K., Liu, H., Song, J., Wu, W., Li, K., Zhang, J. (2016). Physiological and comparative proteome analyses reveal low-phosphate tolerance and enhanced photosynthesis in a maize mutant owing to reinforced inorganic phosphate recycling. *BMC Plant Biology*, 16(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0759-2>
- Zhang, K., Liu, H., Tao, P., & Chen, H. (2014). Comparative proteomic analyses provide new insights into low phosphorus stress responses in maize leaves. *PLOS ONE*, 9(5), e98215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098215>
- Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *The Science of the Total Environment*, 612, 522-537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>
- Ziegler, K. E. (2000). Popcorn. In *Specialty Corns* (pp. 211-246). CRC Press.

APÊNDICES

Tabela Suplementar 1. Resultados da análise química granulométrica do substrato utilizado para avaliar quatro linhagens e seis híbridos de milho-pipoca sob estresse de fósforo em condições de inoculação bacteriana e sem inoculação.

Amostra	pH	S-SO ₄	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	Na	C	MO	CTC	SB	V	m	IsNa	Fe	Cu	Zn	Mn	B
	H ₂ O	mg/dm ³								g/dm ³		mmolc/dm ³		%	%	%		mg/dm ³			
1	6,9	7	7	0,4	1,2	0,8	0	1,7	0,6	0,6	1,03	4,7	3	64	0	13	108,02	0,22	1,98	23,24	0,04
2	6,9	10	8	0,4	1,2	0,8	0	1,7	0,6	0,6	1,03	4	2,6	65	0	15	119,33	0,19	2,05	23,6	0,41

Extratores: P, Na, K, Fe, Zn, Mn, Cu - extrator Mehlich 1; Ca, Mg, Al - extrator KCl (1 mol/L); H + Al - extrator acetato de cálcio (0,5 mol/L e pH 7,0); B- extrator com água quente; S- extrator fosfato monocálcico
 Abreviações: SB - Soma de Bases Trocáveis; CTC - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0; V - Índice de Saturação por Bases; m - Índice de Saturação por Alumínio; ISNa - Índice de Saturação por Sódio; OM - Matéria Orgânica (C Org × 1,724, Walkley-Black).

Tabela Suplementar 2. Resumo da análise dialélica individual por ambiente e conjunta de características morfológicas e da eficiência no uso e absorção do fósforo para quatro genitores e seis combinações híbridas de milho-pipoca cultivados com inoculações bacterianas com *A. brasilense*, com *L. adecarboxylata* e sem inoculação.

		Quadrados Médios											
		FV	AP	AF	DC	MSF	PUE	PUpE					
Análise Conjunta	CGC	6,80	**	44,20	ns	0,37	ns	0,02	ns	1360,17	ns	0,01	ns
	CEC	2,17	ns	160,59	**	2,80	*	0,05	**	2814,50	ns	0,05	*
	CGCxA	1,84	ns	126,45	*	1,24	ns	0,04	**	7650,73	**	0,01	**
	CECxA	2,67	*	138,74	**	1,19	*	0,05	**	4190,03	**	0,01	**
<i>Azospirillum brasilense</i>	CGC	7,43	**	268,38	*	0,68	ns	0,05	*	5256,58	**	0,03	*
	CEC	5,09	**	402,84	**	2,80	*	0,16	**	10989,55	**	0,04	**
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	CGC	11,08	**	105,48	*	1,05	ns	0,05	*	4575,25	*	0,01	*
	CEC	5,07	**	174,86	**	1,17	ns	0,05	**	2561,04	*	0,02	**
Não inoculado	CGC	5,58	**	11,64	ns	1,88	*	0,03	**	9550,14	**	0,00	ns
	CEC	1,69	**	181,57	**	1,88	*	0,02	**	3272,96	**	0,02	**

ns = não-significativo, ** e * = significativos em 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

AP = altura da planta aos 20 dias, AF = área foliar, DC = diâmetro do colmo, MSF = massa seca foliar, PUE = eficiência no uso do fósforo, e PUpE = eficiência de absorção de fósforo.

Tabela Suplementar 3. Resumo da análise dialélica individual por ambiente e conjunta de índices fisiológicos de trocas gasosas e de pigmentos foliares para quatro genitores e seis combinações híbridas de milho-pipoca cultivados com inoculações bacterianas com *A. brasilense*, com *L. adecarboxylata* e sem inoculação.

		Quadrados Médios															
		FV	A	g_s		C _i	E		Chl	Flav		Anth		NBI			
Análise Conjunta	CGC	7,69	ns	0,00	ns	858,25	ns	0,03	ns	4,81	*	0,01	ns	0,00	ns	9,60	*
	CEC	13,98	ns	0,00	ns	1333,87	**	0,40	ns	1,90	ns	0,01	ns	0,00	ns	4,75	ns
	CGCxA	3,51	ns	0,00	ns	599,05	ns	0,12	ns	4,69	*	0,02	**	0,00	ns	8,43	**
	CECxA	26,41	**	0,04	**	1827,45	**	0,77	**	3,52	*	0,01	ns	0,00	ns	8,40	**
<i>Azospirillum brasilense</i>	CGC	18,47	*	0,00	ns	787,88	ns	0,26	ns	6,60	**	0,03	**	0,00	ns	19,22	**
	CEC	3,37	ns	0,05	*	1400,84	**	0,66	*	2,46	ns	0,03	**	0,00	ns	11,89	**
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	CGC	2,38	ns	0,00	ns	479,23	ns	0,05	ns	5,62	*	0,01	ns	0,00	ns	6,52	ns
	CEC	21,46	*	0,01	*	363,78	ns	0,21	ns	2,03	ns	0,01	ns	0,00	ns	2,37	ns
Não inoculado	CGC	9,24	ns	0,00	ns	2505,74	**	0,02	ns	11,59	**	0,03	**	0,03	*	19,94	**
	CEC	69,92	**	0,06	**	5891,88	**	1,88	**	8,24	**	0,02	**	0,02	*	16,80	**

ns = não-significativo, ** e * = significativos em 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

A = taxa de fotossíntese líquida, g_s = condutância estomática, C_i = concentração interna de CO₂, E = taxa de transpiração, Chl = teor relativo de clorofila, Flav = teor de flavonoides, Anth = conteúdo foliar de antocianinas, e NBI = índice de balanço de nitrogênio.

Tabela Suplementar 4. Resumo da análise dialéctica individual por ambiente e conjunta de índices fisiológicos de fluorescência da clorofila para quatro genitores e seis combinações híbridas de milho-pipoca cultivados com inoculações bacterianas com *A. brasilense*, com *L. adecarboxylata* e sem inoculação

		Quadrados Médios									
		FV	Fo	Fv/Fm	Phi_Po	Pi_Abs	ABS/RC				
Análise Conjunta	CGC	1966107,20	*	0,00	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>
	CEC	2224226,71	**	0,04	**	0,09	**	0,27	**	0,01	<i>ns</i>
	CGCxA	3278600,04	**	0,02	*	0,02	*	0,42	*	0,09	**
	CECxA	1955690,94	**	0,02	*	0,02	*	0,53	**	0,07	**
<i>Azospirillum brasilense</i>	CGC	3110503,64	**	0,00	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>	0,00	<i>ns</i>
	CEC	1644081,95	*	0,07	**	0,16	**	0,39	**	0,00	<i>ns</i>
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	CGC	4061596,79	**	0,03	**	0,13	**	0,01	*	0,02	*
	CEC	3660996,38	**	0,03	**	0,76	**	0,40	**	0,02	**
Não inoculado	CGC	5283421,24	**	0,04	*	0,04	*	0,03	**	0,06	**
	CEC	5278983,67	**	0,07	**	0,07	**	0,30	**	0,04	**

^{ns} = não-significativo, ** e * = significativos em 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Pi_Abs = índice de desempenho baseado na absorção, F_o = fluorescência mínima, F_v/F_m = eficiência quântica máxima do PSII, Phi_Po = rendimento quântico máximo da fotoquímica primária, e ABS/RC = energia de absorção média por centro de reação.