



# **Fertilização de Alface (*Lactuca sativa* L.) em fase de viveiro com biofertilizantes: Avaliação da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias fixadoras de azoto nos parâmetros produtivos**

Carlos Manuel Valente Justino

## **Orientador**

Professora Doutora Maria do Carmo Simões Mendonça Horta Monteiro

## **Coorientador**

Dr. Abel da Costa Oliveira Veloso Macedo

Trabalho de Projeto apresentado à Escola Superior Agrária de Castelo Branco do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Agronómica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria do Carmo Simões Mendonça Horta Monteiro, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

**Janeiro de 2024**



## Composição do júri

Presidente do júri

Professor Doutor Paulo Alexandre Justo Fernandez

Professor Adjunto do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Vogais

Professora Doutora Maria do Carmo Simões Mendonça Horta Monteiro

Professora Adjunta do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Professor Doutor João Pedro Martins da Luz

Professor Coordenador do Instituto Politécnico de Castelo Branco



## Agradecimentos

É com imensa gratidão que expresso os meus sinceros agradecimentos pela ajuda dedicados ao longo do desenvolvimento deste trabalho. A jornada rumo à realização deste trabalho, foi em muito enriquecida e guiada pela vossa sabedoria e experiência.

Professora Carmo Horta, agradeço-lhe pela sua disponibilidade e valiosa partilha de conhecimento, tão vasto. A sua incansável dedicação foi uma inspiração, guiando-me com paciência e incentivando-me na realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Dr. Abel Macedo, expresso a minha profunda gratidão pelo apoio constante, paciência e pela orientação prática o qual desempenhou um papel crucial no desenvolvimento do meu projeto final. A sua experiência e ajuda foram fundamentais para a conclusão bem-sucedida desta importante etapa da minha jornada académica.

A ambos, estou verdadeiramente grato pela vossa generosidade, paciência e disponibilidade. O meu muito obrigado.



## Resumo

Atualmente, a utilização de produtos à base de microrganismos benéficos (biofertilizantes) na fertilização de culturas hortícolas, em especial das cultivadas em modo de produção biológico, tem apresentado um interesse crescente. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e bactérias fixadoras de azoto na produção de alface em viveiro em modo de produção biológico. Avaliou-se o efeito destes biofertilizantes no desenvolvimento da alface, na sua composição química e colonização por micorrizas das raízes. Avaliou-se também o efeito dos biofertilizantes na composição química do substrato. O delineamento experimental foi completamente casualizado com 8 modalidades: Testemunha sem inoculação (T e E); com inoculação de bactérias fixadoras de azoto (B e EB); com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (M e EM) e com inoculação de ambos os grupos de microrganismos (BM e EBM). Estas 4 modalidades foram efetuadas em substrato não esterilizado e esterilizado (com indicação da letra E na modalidade) de forma a avaliar unicamente o efeito dos biofertilizantes no desenvolvimento da alface eliminando o possível efeito do microbioma nativo. A inoculação isolada de fungos micorrízicos arbusculares ou bactérias fixadoras de azoto melhorou a precocidade e produção de biomassa alface na fase de viveiro. Este efeito foi mais evidente nas modalidades realizadas em substrato não esterilizado. Na absorção de nutrientes, a inoculação isolada de fungos micorrízicos arbusculares aumentou significativamente a absorção de N, P, K, Ca e Mg em substrato não esterilizado. Este estudo foi prolongado num ensaio em vasos, que decorreu durante 1 mês com as mesmas modalidades. Neste ensaio, no geral, observou-se que a inoculação com micorrizas esteve associada a uma maior absorção de Ca, enquanto que a inoculação com bactérias originou uma maior produção de biomassa. Concluiu-se que os biofertilizantes em estudo podem contribuir para sistemas de produção de alface mais sustentáveis e que o microbioma nativo do solo desempenha um papel essencial e insubstituível potenciando os efeitos benéficos dos biofertilizantes.

## Palavras-chave

Fungos micorrízicos arbusculares; Bactérias fixadoras de azoto; Alface; Agricultura biológica; Biofertilizantes



## Abstract

There is currently growing interest in the use of products based on beneficial microorganisms (biofertilizers) to fertilize horticultural crops, especially those grown organically. The aim of this study was to evaluate the effect of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacteria on lettuce production in organic nurseries. The effect of these biofertilizers on lettuce development, its chemical composition, and mycorrhizal colonization of the roots was assessed. The effect of the biofertilizers on the chemical composition of the substrate was also assessed. The experimental design was completely randomized with 8 treatments: control without inoculation (T and E); with inoculation of nitrogen-fixing bacteria (B and EB); with inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (M and EM) and with inoculation of both groups of microorganisms (BM and EBM). These 4 treatments were carried out on non-sterilized and sterilized substrate (with the letter E indicating the treatment) to assess only the effect of biofertilizers on lettuce development, eliminating the possible effect of the native microbiome. The isolated inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi or nitrogen-fixing bacteria improved the earliness and biomass production of lettuce in the nursery phase. This effect was more evident in the treatments used in non-sterilized substrates. In terms of nutrient absorption, the isolated inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi significantly increased the absorption of N, P, K, Ca, and Mg in non-sterilized substrate. This study was extended in a pot trial that ran for a month using the same treatments. In this trial, it was generally observed that inoculation with mycorrhizae was associated with greater Ca absorption, while inoculation with bacteria led to greater biomass production. It was concluded that the biofertilizers under study can contribute to more sustainable lettuce production systems and that the soil's native microbiome plays an essential and irreplaceable role in enhancing the beneficial effects of biofertilizers.

## Keywords

Arbuscular mycorrhizal fungi; Nitrogen-fixing bacteria; Organic farming; Biofertilizers.



# Índice geral

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
Índice geral.....	XI
Índice de figuras.....	XIII
Lista de tabelas.....	XVI
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	XVII
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Biofertilizantes.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Fungos micorrízicos.....</b>	<b>4</b>
3.1. Fungos micorrízicos arbusculares.....	5
3.2. Interações planta/micorrizas.....	8
<b>4. Bactérias fixadoras de azoto.....</b>	<b>13</b>
4.1. Bactérias do género <i>Azotobacter</i> .....	13
4.2. Bactérias do género <i>Azospirillum</i> .....	16
<b>5. Materiais e métodos.....</b>	<b>18</b>
5.1. Delineamento e preparação para a instalação do ensaio em viveiro.....	18
5.2. Instalação do ensaio em viveiro.....	25
5.3. Medições e pesagens.....	28
5.4. Observação e quantificação de micorrizas.....	31
5.5. Instalação do ensaio em vasos.....	32
5.6. Análise Estatística.....	33
<b>6. Resultados.....</b>	<b>34</b>
6.1. Ensaio em viveiro com alface.....	34
6.1.1. Crescimento, produção e absorção de nutrientes.....	34
6.1.2. Características físico-químicas do substrato.....	41
6.2. Ensaio em produção com alface.....	44
6.2.1. Produção e absorção de nutrientes.....	44
6.2.2. Características físico-químicas do substrato.....	47
6.3. Colonização das raízes por fungos micorrízicos arbusculares.....	49
<b>7. Discussão.....</b>	<b>51</b>
<b>8. Conclusões.....</b>	<b>55</b>
<b>9. Referências bibliográficas.....</b>	<b>56</b>



## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Comparação entre ectomicorrizas e endomicorrizas, adaptado de Bonfante e Genre (2010). .....	4
<b>Figura 2</b> - À esquerda hifas do tipo Arum e à direita hifas do tipo Paris, adaptado de Nair <i>et al.</i> (2022). .....	5
<b>Figura 3</b> - Ciclo de vida dos fungos micorrízicos arbusculares, adaptado de Bucking, Liepold e Ambilwade, (2012). .....	7
<b>Figura 4</b> – Morfologia de <i>Azotobacter chroococcum</i> com flagelos, adaptado de Bisset e Hale (1953). .....	15
<b>Figura 5</b> – Fotomicrografia de <i>Azospirillum brasiliense</i> , adaptado de Camilios-Neto <i>et al.</i> (2014). .....	17
<b>Figura 6</b> – Fotomicrografia de <i>Azospirillum lipoferum</i> , adaptado de Alexandre, Rohr e Bally (1999). .....	17
<b>Figura 7</b> - Alface Admir ( <i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>Admir</i> ), também conhecida como Alface Folha de Carvalho Roxa. ....	18
<b>Figura 8</b> - Fotografia do produto VitaSoil®, retirado do website da Symborg®. ....	19
<b>Figura 9</b> - Fotografia do produto MycoUp®, retirado do website da Symborg®. ....	19
<b>Figura 10</b> - Substrato devidamente acondicionado em saco próprio para esterilização... ..	22
<b>Figura 11</b> - Autoclave utilizado, AJC - Uniclave® 88. ....	22
<b>Figura 12</b> – Sementes das alfaces colocadas em placas de Petri, pronta a entrar na câmara de germinação. ....	24
<b>Figura 13</b> - Exemplo explicativo da nomenclatura e disposição das plantas nos tabuleiros. A cinzento as plantas de bordadura, a verde as plantas do ensaio, a amarelo as plantas selecionadas de forma aleatória para medições e a vermelho, plantas para observação de micorrizas. ....	25
<b>Figura 14</b> - Tabuleiros ao fim da sementeira, prontos a serem postos na câmara de germinação. ....	27
<b>Figura 15</b> – Alfaces separadas do ensaio em viveiro separadas. Partes aéreas prontas a entrar na a estufa e radiculares para separação e posterior análise do substrato. ....	29
<b>Figura 16</b> – Alfaces selecionadas para medição de matéria seca. A parte radicular antes do processo de lavagem de raízes. ....	29
<b>Figura 17</b> -Alfaces (parte aérea e radicular) dentro da estufa pronta para o processo de secagem. ....	29
<b>Figura 18</b> – Raízes em água acidulada. ....	31
<b>Figura 19</b> – Fotomicrografia de micorrizas (100X). ....	31
<b>Figura 20</b> - Alfaces do ensaio em vaso sob rede de ensombramento a 75%. ....	32
<b>Figura 21</b> - Evolução fenológica da alface desde o desenvolvimento dos cotilédones, 6 DAS até ao levantamento do ensaio, 29 DAS. A fase 1 corresponde ao completo desenvolvimento dos cotilédones, a fase 2 corresponde à primeira folha verdadeira, a 3 à segunda folha verdadeira, a 4 à terceira folha verdadeira, a 5 à quarta folha verdadeira e a fase 6 corresponde à quinta folha verdadeira. Os estados fenológicos, foram adaptados da ilustração da tese de Mestrado “Investigating optimum wavelength(s) for growth of <i>Lactuca sativa</i> , L. using tunable LED sources and developing thin-film filters for glass greenhouses” de Jacqueline Thomas. .	34
<b>Figura 22</b> - Número médio de dias após sementeira (DAS) por modalidade até ao aparecimento da 3ª e 4ª folha verdadeira. Letras diferentes por cima das colunas indicam	

diferenças estatisticamente significativas entre modalidades para a 3ª folha verdadeira (letras maiúsculas) e para a 4ª folha verdadeira (letras minúsculas) pelo Teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) e comparações por Método Dunn.....	35
<b>Figura 23</b> - Biomassa da parte aérea (g/planta) no final do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	35
<b>Figura 24</b> - Produção de matéria seca da parte aérea (g/planta) no final do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	36
<b>Figura 25</b> - Matéria seca da raiz (g/planta) após levantamento do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	36
<b>Figura 26</b> - Altura (cm) das alfaces do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	37
<b>Figura 27</b> - Comprimento radicular das raízes das alfaces (cm), do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	37
<b>Figura 28</b> - Média de absorção de N (mg/planta) em cada uma das modalidades do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	38
<b>Figura 29</b> - Valores médios por modalidade de absorção de P (mg/ planta) no ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	38
<b>Figura 30</b> - Valores médios por modalidade de absorção de K (mg/ planta) no ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	39
<b>Figura 31</b> - Valores médios por modalidade de absorção de Ca (mg/ planta) no ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	39
<b>Figura 32</b> - Valores médios por modalidade de absorção de Mg (mg/ planta) no ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	40
<b>Figura 33</b> - Valores da condutividade elétrica (CE dS/m) no substrato das diversas modalidades no final do ensaio. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	42
<b>Figura 34</b> - Valores médios de $P_2O_5$ no substrato das diversas modalidades no final do ensaio. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	42
<b>Figura 35</b> - Valores médios de K assimilável no substrato das diversas modalidades no final do ensaio. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	43
<b>Figura 36</b> - Aporte de cálcio (mg/kg) por planta nas diferentes modalidades. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	45
<b>Figura 37</b> - Observação de micorrizas (ampliação 100X). Presença de vesículas e arbúsculos no segmento radicular.....	50

<b>Figura 38</b> - Observação de micorrizas (ampliação 100X) Presença de hifas externas no segmento radicular.....	50
<b>Figura 39</b> - Observação de micorrizas (ampliação 100X) Presença exclusiva de vesículas no segmento radicular.....	50
<b>Figura 40</b> - Observação de micorrizas (ampliação 100X) Presença de hifas no interior do córtex radicular.....	50

## Lista de tabelas

**Tabela 1** - Valores de pH, matéria orgânica (MO, g/100g), P total, orgânico e inorgânico (mg/kg), Ca e Mg (g/100g) observados no substrato dos diversos tratamentos no final do ensaio de produção de alface em viveiro. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as modalidades pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....41

**Tabela 2** - Produção de matéria verde (MV, g/planta) e matéria seca (MS, g/planta) da parte aérea no final do ensaio de produção decorrido nos vasos. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as modalidades pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....44

**Tabela 3** - Valores médios de nutrientes absorvidos por plantas em cada uma das diferentes modalidades. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as modalidades pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....45

**Tabela 4** - Valores de pH, condutividade elétrica (CE, dS/m), matéria orgânica (MO g/100g), N total (g/Kg), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O (mg/100g) na matéria seca do substrato nas diversas modalidades no final do ensaio de produção de alface. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as modalidades pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....48

**Tabela 5** - Valores de P total, orgânico e inorgânico (mg/kg), Ca e Mg (g/100g) na matéria seca observados no substrato dos diversos tratamentos no final do ensaio de produção de alface. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as modalidades pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .....48

**Tabela 6** - Média de observações de hifas, vesículas ou arbúsculos em cada 5 observações nos ensaios em viveiro e em produção. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As letras dos grupos homogêneos em maiúsculas, para facilitar a distinção, referem-se ao ensaio em produção e as que se encontram em minúsculas referem-se ao ensaio em viveiro. ....49

## **Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos**

FM – Fungos micorrízicos

FMA – Fungos micorrízicos arbusculares

BFA – Bactérias fixadoras de azoto

AB – Agricultura biológica

DAS – Dias após sementeira

DNA - Ácido desoxirribonucleico

P<sub>i</sub> – Fósforo inorgânico

MS – Matéria seca

MV – Matéria verde

PVC - Policloreto de vinilo



## 1. Introdução

A agricultura, ao longo dos anos, tem vindo a enfrentar desafios cada vez mais complexos, impulsionados pelas crescentes exigências de produção e pela necessidade imperativa de adotar práticas sustentáveis. Não só em Portugal, mas mundialmente, a escalada dos custos dos fatores de produção tem pressionado os agricultores a procurar soluções mais eficientes e economicamente viáveis. Paralelamente, a consciência ambiental e a procura por alimentos mais saudáveis têm estimulado um aumento significativo da produção em agricultura biológica (AB). Neste contexto de transformação e busca por inovação, os microrganismos benéficos presentes no solo, nomeadamente os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e outros microrganismos rizosféricos benéficos, tais como as bactérias fixadoras de azoto (BFA) surgem como protagonistas de um cenário agrícola mais sustentável e resiliente. A alface, amplamente consumida e valorizada no mercado português, não fica à margem destas tendências. Na sua fase de viveiro, esta cultura enfrenta desafios consideráveis. Este é o período em que as plantas são mais vulneráveis a agentes patogénicos, deficiências nutricionais e outros stresses quer bióticos quer abióticos. A inoculação de FMA e BFA pode ajudar a garantir o correto desenvolvimento da cultura, fortalecendo as plantas desde a sua fase inicial e conseqüentemente, preparando-as para um desenvolvimento robusto e saudável em campo. Mais do que uma técnica isolada, a utilização destes microrganismos insere-se num conceito mais amplo de AB, que visa a produção de alimentos de elevada qualidade, respeitando o ambiente e reduzindo a dependência de fatores de produção de síntese química. A AB, além de ser uma resposta à crescente demanda por práticas mais limpas, apresenta-se também como uma estratégia para contrariar os elevados custos dos fatores de produção, ao fomentar a utilização de recursos naturais, por vezes autóctones em detrimento de soluções externas muitas vezes dispendiosas.

Este trabalho teve como objetivo central a avaliação agronómica da fertilização com BFA e FMA na produção da alface em viveiro. Para a concretização deste trabalho realizou-se um ensaio em viveiro com alface no qual se avaliaram parâmetros fenológicos, características físico-químicas do substrato e das plantas bem como a produção de biomassa da parte aérea, da parte radicular e ainda a absorção de nutrientes pela planta. Cumulativamente, avaliaram-se também os parâmetros relativos à colonização das raízes pelos fungos micorrízicos (FM). De forma a obter mais informação sobre a resposta da alface a esta fertilização biológica quando colocada em produção, o ensaio foi posteriormente prolongado durante mais um mês num ensaio em vasos, onde se avaliaram parâmetros relacionados com as características químicas do substrato, com o crescimento das plantas, com a absorção de nutrientes e com a colonização das raízes por FMA.

## 2. Biofertilizantes

Devido à elevada pressão existente nas explorações agrícolas, a agricultura intensiva e as variedades de elevado rendimento consomem uma grande quantidade de fertilizantes químicos (Singh *et al.*, 2021). Para além de caros, a sua utilização excessiva e a sua acumulação têm contribuído para a contaminação ambiental e excessiva utilização de recursos naturais prejudicando não só a saúde humana mas também diminuindo a fertilidade e a biodiversidade do solo e diminuindo as reservas naturais de alguns nutrientes vegetais (Singh *et al.*, 2021; Vera-García *et al.*, 2023). Os biofertilizantes são fertilizantes naturais, e são essencialmente produtos prontos a usar que contêm inóculos microbianos de bactérias, algas e fungos de importância agrícola num estado viável (Khan *et al.*, 2023; Fahad *et al.*, 2024). A sua utilização tem surgido como uma excelente alternativa para travar o impacto ambiental e os custos crescentes, em parte causados pelo aumento do preço dos fertilizantes de origem sintética (Lavudi *et al.*, 2023). São alternativas reconhecidas pela sua relação custo-benefício, dada a sua natureza amiga do ambiente e pela sua composição (Dasgupta *et al.*, 2021).

Os microrganismos contidos nos biofertilizantes iniciam a colonização na raiz ou em torno dela após o tratamento do solo, da semente ou da raiz e estimulam o crescimento das plantas da cultura-alvo. Os componentes segregados pelas raízes das plantas nomeadamente os exsudados radiculares, encorajam a colonização proficiente de microrganismos na rizosfera (Khan *et al.*, 2023). Alguns biofertilizantes que colonizam a rizosfera tornam os nutrientes facilmente acessíveis aos pelos radiculares, aumentando a sua capacidade de absorção (Dasgupta *et al.*, 2021). Os microrganismos presentes nos biofertilizantes têm sido reconhecidos por melhorar a tolerância biótica e abiótica das plantas e também por auxiliarem na biorremediação de pesticidas, aproveitando os processos biológicos já existentes no ambiente, para acelerar a degradação de substâncias contaminantes (Kour *et al.*, 2021).

Os biofertilizantes melhoram o crescimento e o rendimento das plantas através de vários mecanismos como a fixação do azoto atmosférico (N<sub>2</sub>), a solubilização e mobilização do fósforo (P), a decomposição da matéria orgânica (formação de húmus), a produção de fito-hormonas e a supressão de doenças (Ritika e Utpal, 2014). Os primeiros quatro mecanismos estão envolvidos no fornecimento de nutrientes às plantas, já as fito-hormonas têm um papel crucial ao desempenhar o desenvolvimento e diferenciação de diferentes tecidos vegetais e também no aumento da absorção e translocação de micronutrientes, especialmente ferro (Fe) (Singh *et al.*, 2021; Lavudi *et al.*, 2023).

Os microrganismos mais utilizados como biofertilizantes contêm bactérias (incluindo algumas fotossintéticas) e fungos (incluindo leveduras) pertencentes, por exemplo, aos géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Glomus*, *Gigaspora* e *Pezizella*, que são capazes de fixar N, solubilizar P, Zn, Fe, K e

produzir fito-hormonas e enzimas celulolíticas (Roshani *et al.*, 2020). O stresse hídrico limita frequentemente a produção vegetal. Contudo, os bio estimulantes, para além de aumentarem a absorção de nutrientes pelas plantas, também desempenham outras tarefas fisiológicas, como o aumento da absorção de água (Khan *et al.*, 2023), por isso estes podem ser considerados uma nova ferramenta para mitigar o stresse o hídrico (Rezaei-Chiyaneh *et al.*, 2023).

Os microrganismos promotores do crescimento das plantas exibem propriedades antagonistas contra múltiplos agentes patogénicos através da produção de antibióticos, da produção de enzimas hidrolíticas e sideróforos, induzindo o sistema de defesa das plantas e a competição por nutrientes na rizosfera (Singh *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2023; Fahad *et al.*, 2024).

As informações adquiridas na literatura auxiliam, assim, a compreensão das bases fisiológicas dos biofertilizantes para o apoio às atividades económicas relacionadas com a agricultura, diminuindo os problemas relacionados com a utilização de fertilizantes sintéticos (Fahad *et al.*, 2024). Como o efeito dos biofertilizantes é mais duradouro do que o dos fertilizantes químicos (devido à libertação lenta de nutrientes através da atividade microbiana contínua), tornam-se economicamente viáveis para os agricultores (El-Ramady *et al.*, 2018). Um reparo não menos importante que o demais escrito chama à atenção que o modo de ação pode ser diferente para cada biofertilizante, uma vez que a formulação e a função (atividade biológica) da estirpe microbiana incorporada mudam (Khan *et al.*, 2023).

Para concluir, os biofertilizantes não só restabelecem a fertilidade do solo, como melhoram a sua estrutura e funções, podendo aumentar o rendimento das culturas em 20%-35% ao mesmo tempo que podem reduzir a necessidade de aplicação de fertilizantes N, P e K até 60%. No entanto, o método para determinar o efeito dos biofertilizantes pode ser diferente para diferentes tipos de culturas ( Singh *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2023).

### 3. Fungos micorrízicos

Os fungos micorrízicos são um grupo de fungos que formam associações simbióticas com as raízes da grande maioria das plantas e são exclusivos dos *phyla* Glomeromycota, Basidiomycota e Ascomycota (Bueno e Silva, 2014; Smith e Read, 2010).

De acordo com o tipo de associação que é feita com a planta os FM são classificados em 3 grandes grupos: fungos endomicorrízicos, ectomicorrízicos e ectendomicorrízicos (Marschner, 2012).

Os fungos do primeiro grupo, que inclui os arbusculares, ericoides e orquidoides, penetram a parede celular de algumas células do córtex da raiz (Marschner, 2012). Destes 3 subgrupos, os FMA são os mais comuns e destacam-se pela formação de arbuscúlos dentro de algumas das células corticais (Reddy e Saravanan, 2013).

Os fungos ectomicorrízicos caracterizam-se por formarem um manto de hifas à superfície das raízes. Desse manto, algumas hifas penetram no interior do córtex. No entanto, ao contrário dos fungos endomicorrízicos, as hifas não penetram a parede celular mantendo-se em vez disso, no espaço intercelular (Figura 1). Essa rede hifal que se encontra no interior do córtex radicular chama-se rede de Hartig (Lowenfels, 2021).

O terceiro grupo combina algumas características dos dois grupos anteriores. Assim, os fungos ectoendomicorrízicos começam com a formação de uma rede Hartig e, à medida que a planta cresce, podem ocorrer penetrações intracelulares. A estrutura e desenvolvimento são similares aos ectomicorrízicos, mas com a distinção da penetração intracelular. O tipo de associação formado entre o fungo e a planta depende da planta hospedeira (Moore, 2021).

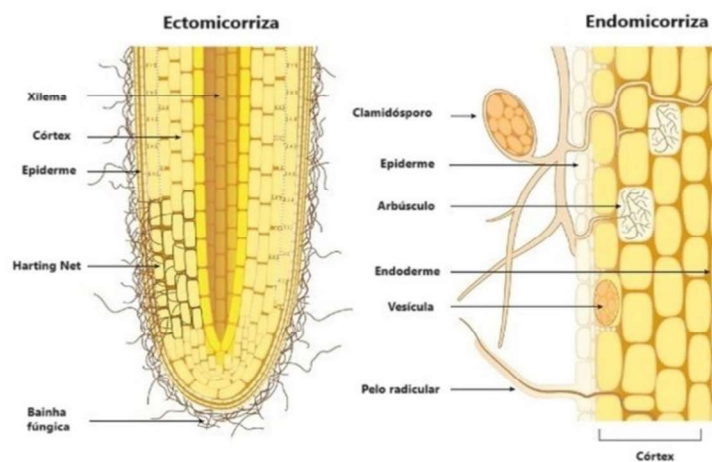


Figura 1 - Comparação entre ectomicorrizas e endomicorrizas, adaptado de Bonfante e Genre (2010).

### 3.1. Fungos micorrízicos arbusculares

Os registos fósseis evidenciam que, durante mais de 400 milhões de anos, as plantas têm mantido uma simbiose mutualista com FMA (Helber *et al.*, 2011). Os FMA têm uma relação mutualista com 80% das plantas terrestres e são considerados uma fonte de biofertilizante devido aos seus efeitos positivos no crescimento e na produtividade das plantas (Lee *et al.*, 2013). Atualmente, conhecemos mais sobre a importância das relações micorrízicas e compreendemos melhor o seu funcionamento: o fungo coloniza o sistema radicular de uma planta hospedeira, aumentando a capacidade de absorção de água e nutrientes das raízes, enquanto a planta fornece ao fungo o carbono (C) que obtém através da fotossíntese (Hai, Huynh e Le, 2022).

Os FMA estabelecem uma relação simbiótica obrigatória, materializada através da formação de associações entre as raízes das plantas e os fungos que integram o *phylum* Glomeromycota. Uma das características inconfundíveis destes fungos é a formação endógena de arbúsculos nas células do córtex radicular (Saggin Júnior e Silva, 2005). Os arbúsculos são estruturas finamente ramificadas que se formam no interior das células do córtex radicular. Foram nomeados por Gallaud em 1905 devido à sua semelhança com pequenas árvores (Smith e Read, 2008). O desenvolvimento dos arbúsculos é caracterizado por uma ramificação dicotómica repetida e reduções no diâmetro das hifas, iniciando-se a partir de uma hifa principal (5-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e culminando numa proliferação de hifas ramificadas finas (com diâmetro < 1  $\mu\text{m}$ ).

Gallaud identificou que as associações de FMA em distintas espécies exibiam duas morfologias singulares, às quais atribuiu as designações do tipo Arum e Paris (Figura 2) (Dickson, Smith e Smith, 2007). Nas associações do tipo Arum, geralmente, os arbúsculos desenvolvem-se através da ramificação repetida de uma hifa que penetra através da parede celular cortical (Bonfante e Perotto, 1995). Tal fenómeno deve-se ao facto das hifas se expandirem através dos espaços intercelulares existentes, conforme descrito por Brundrett (2004). No tipo Paris, a penetração da parede celular cortical por uma única hifa é seguida por um enrolamento extensivo desta hifa, a partir do qual ramos laterais são iniciados para formar espirais arbusculares (Cavagnaro *et al.*, 2001).

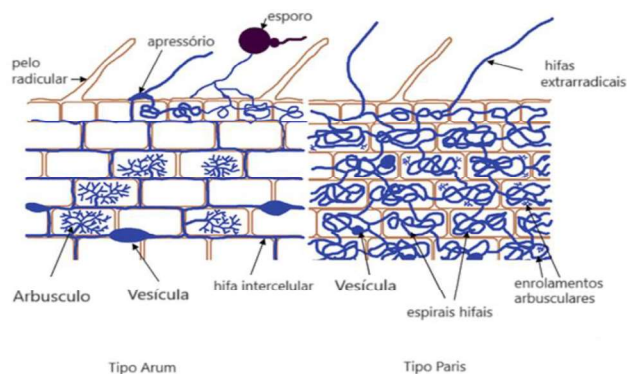


Figura 2 - À esquerda hifas do tipo Arum e à direita hifas do tipo Paris, adaptado de Nair *et al.* (2022).

Originalmente, o termo “micorriza vesículo-arbuscular” foi aplicado às associações simbióticas formadas por todos os fungos micorrízicos do *phylum* Glomeromycota porém, uma vez que parte dos fungos não tem a capacidade de formar vesículas nas raízes, “micorriza arbuscular” é agora o termo mais comumente utilizado (Varma, Prasad e Tuteja, 2017). As vesículas formam-se frequentemente como órgãos de reserva, acumulando produtos de armazenamento. Estes corpos globosos, cujo diâmetro varia entre 30 e 100 µm, podem localizar-se no interior ou entre as células e são ricos em lípidos, conforme descrito por Bonfante-Fasolo, Gianinazzi-Pearson e Martinengo (1984).

As associações micorrízicas são estabelecidas mediante a germinação de esporos ou podem originar-se de fragmentos radiculares pré-existentes. Em diversas situações observa-se uma rede de hifas pré-existente, decorrente da atividade radicular prévia (Azcón-Aguilar e Barea, 1997).

O processo de desenvolvimento dos FMA anterior à colonização radicular, designado como pré-simbiose, compreende 4 etapas fundamentais: a germinação dos esporos, a proliferação das hifas, a deteção do hospedeiro e a formação do hifopódio (Délano-Frier e Tejeda-Sartorius, 2008).

Os FMA são biotróficos obrigatórios e dependem do seu hospedeiro autotrófico para completar o seu ciclo de vida e produzir a seguinte geração de esporos. Os esporos são capazes de germinar sem a presença de um hospedeiro. No entanto, as hifas, que se originam da germinação dos esporos, exibem uma capacidade de crescimento limitada e morrem caso não estabeleçam contacto com uma raiz suscetível de colonização no espaço de aproximadamente 7 dias. As raízes das plantas são capazes de induzir o crescimento pré-simbiótico de esporos de FMA pela libertação de exsudados da raiz e estes respondem através de um aumento da ramificação hifal e da atividade metabólica (Bucking, Liepold e Ambilwade, 2012). Não se sabe ainda qual a substância exsudada pela planta que é reconhecida pelo FMA. Os flavonóides surgem como os principais compostos candidatos, todavia, não são estritamente necessários para o estabelecimento da micorriza (Azcón-Aguilar e Barea, 1997). O início das associações micorrízicas ocorre quando hifas presentes no solo detetam e reagem à proximidade de uma raiz, direcionando-se para esta e estabelecendo interação ao percorrer a sua superfície. Subsequentemente, determinadas hifas formam protuberâncias especializadas, designadas por hifopódios, intercaladas entre as células epidérmicas (Varma, Prasad e Tuteja, 2017).

O processo de penetração radicular dá-se quando hifas originárias dos hifopódios invadem as células epidérmicas ou corticais, penetrando assim a raiz. Estas hifas prosseguem, passando a hipoderme e iniciam a sua ramificação no córtex externo onde se propagam em ambas as direções a partir do ponto de entrada, constituindo uma colónia intrarradicular. A formação do arbúsculo sucede ao crescimento da hifa, expandindo-se a partir do ponto de entrada, rapidamente penetrando a parede celular

do hospedeiro e desenvolvendo-se no interior da célula (Brundrett, 2008). A formação dos arbúsculos tem início cerca de 2 dias após a penetração na raiz, conforme apontado por Brundrett *et al.* (1985). À medida que o fungo cresce, a membrana celular do hospedeiro invagina e envolve o fungo, criando um novo compartimento onde material de elevada complexidade molecular é depositado. Este espaço apoplástico impede o contacto direto entre o citoplasma da planta e do fungo e permite uma troca de nutrientes entre os simbioss. Os arbúsculos são considerados o principal local de troca entre o fungo e a planta hospedeira (Smith e Read, 2010).

Os arbúsculos têm uma vida curta, e começam a degenerar passados alguns dias, mas as hifas e vesículas podem permanecer nas raízes durante meses ou até anos (Brundrett, 2008; Hoffmann e Lucena, 2006). O desenvolvimento das vesículas tem início pouco depois da formação dos primeiros arbúsculos e continua mesmo quando os arbúsculos entram em senescência (Figura 3). Nas raízes mais antigas, estas vesículas podem desenvolver paredes espessas, assumindo potencialmente a função de órgãos de reserva, conforme indicado por Biermann e Linderman (1983). Algumas espécies fúngicas produzem vesículas cuja estrutura é semelhante aos esporos que produzem no solo, enquanto em outros casos, existem diferenças notáveis (Brundrett, 2008; Hoffmann e Lucena, 2006). Os esporos têm, assim, um duplo propósito: funcionar como estruturas de armazenamento ou originar estruturas especializadas de germinação.

Os esporos, que se formam tanto no solo como nas raízes, formam-se quando há uma remobilização de nutrientes a partir das raízes em que as associações estão a entrar em senescência e surgem como inchaços nas hifas. Estas estruturas são ricas em lípidos, citoplasma e possuem múltiplos núcleos que comumente desenvolvem paredes espessas, compostas por múltiplas camadas. Em certas ocasiões, estes podem agrupar-se, originando estruturas denominadas esporocarpos.

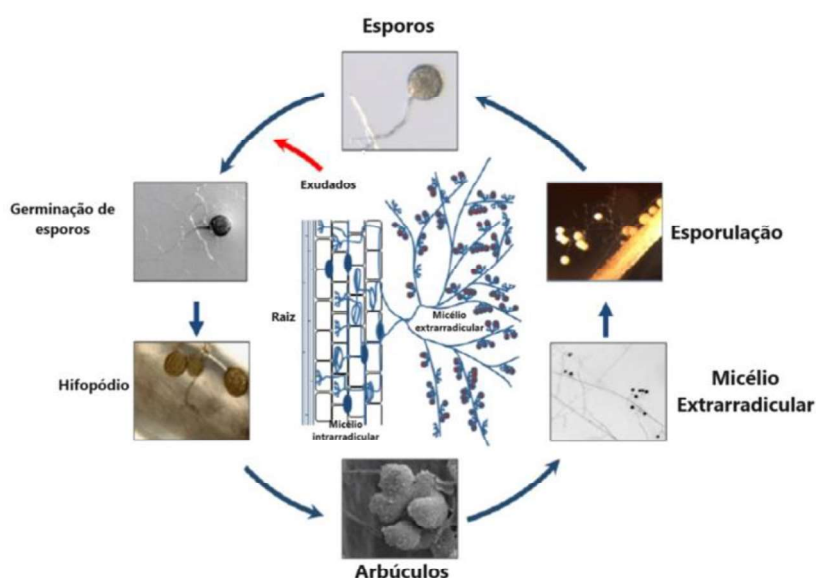


Figura 3 - Ciclo de vida dos fungos micorrízicos arbusculares, adaptado de Bucking, Liepold e Ambilwade, (2012).

### 3.2. Interações planta/micorrizas

A colonização de plantas por FM induz uma série de benefícios significativos para o hospedeiro (Smith e Read, 2010). Esta associação promove o crescimento das plantas através de mecanismos variados, que incluem a produção de aminoácidos, vitaminas, fito-hormonas, processos de solubilização e mineralização e na captação de nutrientes do solo - potenciada pela vasta superfície das hifas extrarradiculares, que ultrapassam a capacidade de absorção dos pelos radiculares das plantas - que são depois transformados bioquimicamente e direcionados para a planta hospedeira através dos arbúsculos (Patreze, Moreira e Tsai, 2012). Adicionalmente, os FM podem trocar ADN com outros microrganismos e alterar os benefícios que conferem (Lee *et al.*, 2013; Lowenfels, 2021).

As micorrizas aumentam a taxa de fotossíntese, e promovem a acumulação de metabolitos secundários, concedendo às plantas uma maior resistência a stresses bióticos e abióticos (Zhao *et al.*, 2022). As plantas, em resposta a alterações no ambiente – sejam elas originadas por stresse térmico, salinidade, seca, stresse osmótico ou variações na disponibilidade de nutrientes – adaptam o seu fenótipo. Esta adaptação fenotípica nas raízes é fortemente influenciada tanto pela colonização bacteriana e micorrízica como pela disponibilidade nutricional. A concentração dos nutrientes atua como um sinal determinante na arquitetura radicular, influenciando a divisão celular e os processos de diferenciação das raízes. Em particular, a presença de FMA induz modificações nas raízes, como a formação de ramos laterais e a densidade e comprimento dos pelos radiculares (Ebbisa, 2023). Este processo de simbiose permite uma absorção e translocação eficientes de nutrientes, mediado por transportadores específicos presentes na membrana perifúngica.

A existência de micorrizas pode ajudar as plantas hospedeiras a serem mais tolerantes às condições de seca. Os FMA criam estruturas de armazenamento de água nas raízes. A rede hifal e as vesículas dos FMA retêm a água, atuando como um reservatório de armazenamento.

Os FMA para além de absorverem os nutrientes já existentes no solo, conseguem ainda absorver uma variedade de nutrientes e metabolitos resultantes da digestão extracelular das hifas de microrganismos que morrem na micorrizosfera. As hifas destes fungos, produzem sideróforos e fitossideróforos (metabolitos fúngicos) que se ligam ao Fe e são extremamente eficientes na captação e transporte deste para a planta hospedeira (Abdel-Fattah e Shabana, 2002; Frey-Klett *et al.*, 2005). Estes compostos para além do Fe estão ainda associados ao aumento da absorção de elementos como Zn e Cu. Estes metabolitos, ao ligarem-se a vários iões metálicos, desempenham funções essenciais para a nutrição das plantas e conseqüentemente uma maior proteção contra stresses (Römheld, 1987; Cakmak *et al.*, 1996).

Os FMA têm a capacidade de se associarem a mais do que uma planta hospedeira simultaneamente, por outras palavras, as suas redes podem ser partilhadas entre plantas, mesmo sendo estas de espécies diferentes. Como resultado deste feito, as

micorrizas podem beneficiar florestas inteiras, uma vez que as árvores maiores literalmente alimentam e protegem as árvores mais pequenas através de uma rede micelial interligada. E quando uma planta morre, muitos dos seus nutrientes são devolvidos à rede e são mobilizados para outras plantas (Lee *et al.*, 2013).

Os agentes patogénicos também têm mais dificuldade em alimentar-se quando estão a competir por nutrientes com os FMA, limitando assim o acesso aos recursos vitais necessários aos agentes patogénicos (Kaewchai, Soyong e Hyde, 2009; Varma, Prasad e Tuteja, 2017). Além disso, à medida que as hifas dos fungos digerem e ingerem, podem produzir metabolitos, substâncias químicas que se decompõem e atuam como dissuasores da procura de alimentos por outros microrganismos, alguns podem mesmo produzir substâncias químicas defensivas e ofensivas específicas dos seus predadores (Lowenfels, 2021). Um dos mecanismos predominantes de bio controlo é a antibiose, onde compostos metabólicos inibem o crescimento de outros microrganismos. É importante destacar ainda o papel da atividade enzimática dos FM no controlo de agentes patogénicos, principalmente através de enzimas que degradam as paredes celulares deste agentes (Troian *et al.*, 2014). Em situações de infestação por estes agentes, a presença de micorrizas pode promover a produção de compostos antimicrobianos e enzimas como quitinases e glucanases, fundamentais para a lise dos agentes patogénicos (Singh *et al.*, 2014). Paralelamente, os genes relacionados com a defesa das plantas são críticos nas interações micorrízicas. Em fases iniciais de colonização, estes genes tendem a ser sobre regulados, porém, à medida que a simbiose se estabelece, são progressivamente sub regulados, o que sugere um equilíbrio entre a resposta de defesa da planta e as demandas nutricionais do fungo (García-Garrido e Ocampo, 2002; Harrison, 2005).

As hifas dos FMA, à medida que crescem e se entrelaçam no solo, unem as partículas ao mesmo tempo que produzem exsudados que ajudam à criação de agregados no solo criando espaços porosos, melhorando a sua porosidade e percolação de água. Demonstram ainda resistência a condições adversas, como à presença de metais pesados, seca, salinidade, e protegem as plantas contra agentes patogénicos (Azcón-Aguilar e Barea, 1997; Javaid, 2009; Reddy e Saravanan, 2013; Taylor e Alexander, 2005). Adicionalmente, os fungos produzem glomalina, um composto carregado de carbono que permanece no solo mesmo depois da morte dos fungos. As moléculas de glomalina são uma importante fonte de carbono no solo (Rillig e Steinberg, 2002).

Durante um extenso período, a transferência de N do solo para as plantas através das micorrizas arbusculares foi negligenciada, fundamentada na capacidade das raízes das plantas em absorver eficazmente azoto inorgânico devido à sua mobilidade no solo e na presunção de que o azoto orgânico não estaria disponível para os FMA (Cheng e Baumgartner, 2004). Embora exista uma quantidade significativa de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em solos não fertilizados, a sua notável mobilidade impede que sejam completamente absorvidos na rizosfera, no entanto, estas formas de azoto são absorvidas seletivamente por determinadas espécies vegetais, sendo que algumas destas podem depender das micorrizas (Varma, Prasad e Tuteja, 2017).

Os FMA desempenham ainda um papel crucial na mobilização de P a partir de substratos naturais. O P próximo das raízes é rapidamente absorvido, mas aceleradamente, cria-se uma zona de depleção na rizosfera, limitando o P acessível à planta. A necessidade de associação micorrízica varia com a fertilidade do solo e com a demanda nutricional da planta (Marschner, 2012; Wang *et al.*, 2022)

Em estudos realizados em estufas, solos com deficiências em fósforo e zinco foram sujeitos a diferentes níveis destes nutrientes, com e sem inoculação micorrízica. Observou-se que, em baixos níveis de fertilização fosfatada, a inoculação micorrízica potenciou significativamente o crescimento vegetativo e a absorção de P (Liang *et al.*, 2022). No entanto, com elevadas concentrações de fertilizante fosfatado, não se notaram diferenças significativas quanto à inoculação micorrízica no que concerne ao crescimento vegetativo e à absorção de nutrientes (Liang *et al.*, 2022; Sheikh-Assadi *et al.*, 2023).

A eficaz absorção de P e Zn através da inoculação micorrízica pode ser atribuída à ampla rede de hifas externas, que permite o acesso a nutrientes para além da rizosfera. Assim, o P que se encontra distante torna-se acessível para as plantas inoculadas (Zhang *et al.*, 2022). A afinidade micorrízica pelo P pode ser aumentada, e o transporte de P potenciado nas hifas, especialmente se a concentração limite para a absorção do mesmo for diminuída (Liang *et al.*, 2022).

Os fungos apresentam dois conjuntos de transportadores denominados captadores de K de alta afinidade e transportadores de K e estão diretamente envolvidos no transporte de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>. Presume-se que os exportadores de K nos FMA sejam expressos, localizados e regulados especificamente na zona de contacto e interação entre as hifas do fungo e as células radiculares da planta. A escassez de informação relativa ao mecanismo molecular exige investigações adicionais sobre a absorção e o destino do K. Mais investigações são necessárias para entender completamente estes processos moleculares. Em condições de campo, verificou-se que o milho doce inoculado com micorrizas apresenta uma maior concentração de K comparativamente ao não inoculado (Ortas, 2003).

Alguns dos metais pesados, como por exemplo, Cu, Co, Fe, Mn, Ni, Zn são micronutrientes essenciais para o crescimento das plantas, mas em excesso tornam-se tóxicos (Angulo-Bejarano, Puente-Rivera e Cruz-Ortega, 2021). Segundo Adeyemi *et al.* (2021), os FMA têm sido avaliados para a remediação de solos contaminados por metais pesados, uma vez que estes melhoram a translocação de metais pesados para as partes aéreas das plantas e também ajudam as plantas a evitar a toxicidade. A proteção conferida pelos fungos pode estar relacionada com a quelatação dos metais e o fortalecimento dos sistemas de defesa das plantas (Amna *et al.*, 2015; Zaefarian *et al.*, 2013).

O C desempenha um papel preponderante na associação entre plantas e FMA. O fluxo de carbono é predominantemente mediado da planta para o fungo, e, por isso, dependem destas para a obtenção de C (Behie e Bidochka, 2014). Embora tenha sido

reconhecido na década de 1960 que as plantas transferem C para os FMA, os detalhes dessa transferência ainda não se encontram totalmente definidos (Smith e Read, 2008). Foi comprovado que o fornecimento de C pela planta estimula a absorção de P pelos FMA (Hammer *et al.*, 2011; Kiers *et al.*, 2011), concluindo-se de que cerca de 20% do C obtido através da fotossíntese é direcionado para os FMA. O C da planta é primordial, não só para o crescimento fúngico, mas também para diversos processos, por exemplo, para desenvolvimento de novos focos de infecção (Bucking, Liepold e Ambilwade, 2012). É importante salientar que os FMA podem adotar um estilo de vida mutualista, ou mesmo parasitário, sob determinadas condições ambientais. Alguns estudos indicam que a degeneração em parasitismo ocorre em solos bem fertilizados nos quais a disponibilidade de fósforo inorgânico (Pi) é abundante (Bucher, 2007; Johnson, Graham e Smith, 1997). Pode ainda ocorrer que a simbiose seja interrompida ou inibida quando o estado nutricional da planta é adequado para o crescimento normal (Grant *et al.*, 2005), ou quando o mecanismo de absorção de fosfato específico da simbiose da planta é interrompido a tal ponto que impeça a aquisição de nutrientes (Javot *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2006). A relevância desta troca mútua é evidente quando se percebe que a relação simbiótica bem-sucedida e a formação de estruturas chamadas arbúsculos dependem da troca adequada de C e P, e isto reflete-se na quantidade de carbono recebido pelo fungo, que está diretamente relacionada com a eficiência de transferência de fosfato. A troca de C e P é essencial para a manutenção desta relação simbiótica, embora o papel inicial nessa troca mútua ainda não esteja claramente definido (Jakobsen e Hammer, 2015; Smith e Smith, 2012).

Um dos biofertilizantes utilizados neste trabalho continha o FMA *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum*. Este fungo foi isolado num solo salino-sódico em Espanha, tem demonstrado um grande potencial para uso como biofertilizante na agricultura intensiva, mesmo em condições de alta salinidade e adubação (Juarez e Fernandez, 2018).

Apresenta esporos pequenos, transparentes a amarelo-claro, ocorrendo isoladamente ou em pequenos grupos no solo. As hifas ligadas ao esporo são muito finas. Outras características marcantes são a produção abundante de micélio extramatricial e a alta concentração de glomalina facilmente extraível do solo (Juarez e Fernandez, 2018).

Estudos de efetividade da nova variedade foram conduzidos em alface cultivada em estufa de vidro. As plantas foram inoculadas com a nova variedade e outras duas espécies de FM, *Glomus mosseae* e *Glomus intraradices*. Foram testadas duas doses de adubação (50% e 100% da dose recomendada) e avaliados diversos parâmetros relacionados à atividade micorrízica, trocas gasosas, conteúdo de clorofila e nutrientes e produtividade (Juarez e Fernandez, 2018).

Os resultados mostraram que a nova variedade apresentou os maiores valores de colonização micorrízica interna, produção de micélio extramatricial e glomalina sob ambas as quantidades de adubo. As outras espécies tiveram redução acentuada na

atividade micorrízica sob a maior quantidade de fertilizantes (Juarez e Fernandez, 2018).

Em termos fisiológicos, a nova variedade também se destacou, conferindo às plantas maior conteúdo de clorofila, fotossíntese e eficiência no uso da água. A análise dos teores foliares de nutrientes corroborou os achados, com as plantas inoculadas com a nova variedade apresentando maior absorção de N, P, Ca, Fe e Mn sob alta fertilização (Juarez e Fernandez, 2018).

No que diz respeito à produtividade, a nova variedade proporcionou o maior acúmulo de biomassa de raízes e folhas em ambos os níveis de adubação, contudo com destaque para a quantidade mais alta (Juarez e Fernandez, 2018).

## 4. Bactérias fixadoras de azoto

Um dos biofertilizantes utilizados neste trabalho continha BFA dos géneros *Azotobacter* e *Azospirillum*.

### 4.1. Bactérias do género *Azotobacter*

Os ambientes hostis, com fatores de stresse, quer bióticos quer abióticos, frequentemente diminuem as taxas de crescimento vegetativo e as características de produção, e por isso resultam numa germinação deficiente e num decréscimo do rendimento. Dentro das rizobactérias que favorecem o crescimento vegetativo, as *Azotobacter* spp., são reconhecidas por potenciarem a saúde das plantas. Esta melhoria deve-se a vários mecanismos subjacentes (Sumbul *et al.*, 2020). Por serem capazes de fixar N<sub>2</sub> e convertê-lo em formas de azoto assimiláveis pelas plantas, são frequentemente utilizadas como fertilizantes em culturas de plantas não leguminosas (Haris *et al.*, 2023).

As bactérias do género *Azotobacter* pertencem à família Pseudomonadaceae, integrantes da classe Gammaproteobacteria do filo Pseudomonadota. São bactérias Gram-negativas, aeróbicas e diazotróficas que vivem de forma livre uma vez que no solo, não estabelecem relações parasíticas ou simbióticas com plantas. As bactérias do género *Azotobacter* são versáteis quanto ao tipo de solo, sendo encontrada em ambientes tanto alcalinos quanto ácidos. Adicionalmente, as bactérias deste género podem produzir antibióticos e compostos antifúngicos, os quais reduzem a mortalidade de plantas mais jovens ao suprimir o desenvolvimento de diversos fungos patogénicos na rizosfera (Haris *et al.*, 2023; Sethi e Adhikary, 2012).

Morfologicamente, as bactérias do género *Azotobacter* são bacilos que apresentam uma forma tipicamente oval ou esférica e demonstram uma notável polimorfia, com dimensões variáveis entre 2 a 10 µm de comprimento e 1 a 2 µm de largura (Sethi e Adhikary, 2012; Sumbul *et al.*, 2020).

Em resposta a condições ambientais adversas, estas bactérias desenvolvem quistos com paredes espessas, que representam células dormentes capazes de resistir a ambientes hostis.

Estas bactérias têm a capacidade de utilizar o N<sub>2</sub> como fonte de N para as suas necessidades metabólicas como a síntese de proteínas celulares. Quando estas proteínas são posteriormente mineralizadas no solo, contribuem para o fornecimento de N mineral às plantas (Nongthombam *et al.*, 2021)

Estes microrganismos conferem múltiplos benefícios ao crescimento e produtividade agrícola, através da biossíntese de compostos biologicamente ativos, da estimulação de microrganismos na rizosfera, da produção de agentes anti-patogénicos, da otimização da absorção de nutrientes ou ainda pelo incremento na fixação biológica

do azoto. Algumas espécies de *Azotobacter* demonstraram ainda a capacidade de produzir aminoácidos e alguns compostos que participam em processos que promovem o crescimento vegetativo (Sumbul *et al.*, 2020).

No vasto ecossistema do solo, caracterizado por uma intrincada rede de interações ecológicas, salienta-se o papel preponderante das bactérias diazotróficas. Estes microrganismos ostentam a capacidade singular de converter o  $N_2$ , abundante na atmosfera, em formas de azoto passíveis de serem assimiladas pelas plantas, processo este conhecido como fixação de azoto (Sethi e Adhikary, 2012).

A rizosfera, descrita como a parcela do solo intimamente ligada às raízes vegetais, é palco de interações biológicas, entre plantas e microrganismos. No que respeita à utilização dos compostos originados da fixação de  $N_2$ , cumpre salientar que as bactérias diazotróficas, em primeira instância, utilizam estes compostos nitrogenados para fomentar o seu crescimento. A esmagadora maioria do azoto fixado é consumida por estas bactérias ao longo do seu ciclo de vida, restando somente uma porção limitada que é libertada no solo, estando assim disponível para as plantas (Imam e Badawy, 1978).

Somente quando ocorre a morte destas bactérias é que os compostos nitrogenados existentes nas bactérias podem ser libertados no solo, no entanto, é essencial reconhecer que apenas uma parcela deste azoto é verdadeiramente incorporada pelas plantas (Paśmionka, Bulski e Boligłowa, 2021). Por exemplo, na rizosfera do arroz, perante um défice acentuado de azoto, as bactérias diazotróficas intensificam a fixação de  $N_2$  (Sethi e Adhikary, 2012).

As rizobactérias mostram-se essenciais, suprimindo parcialmente as necessidades de azoto das plantas (De Andrade *et al.*, 2023). Em relação à nitrogenase, esta enzima, responsável pela fixação de  $N_2$ , vê a sua atividade amplificada em plantas com défice de azoto, o que reflete um incremento na atividade fixadora das bactérias a ela associadas (Sethi e Adhikary, 2012).

Em algumas bactérias, uma elevada concentração ambiental de N pode reprimir o processo de fixação de  $N_2$ , considerando que esta é uma atividade metabolicamente dispendiosa (Halbleib e Ludden, 2000). Contudo, certas bactérias associadas às raízes conseguem manter a capacidade de fixar  $N_2$ , mesmo na presença de níveis elevados de  $N_2$  combinado, libertando amoníaco ( $NH_3$ ) – forma de azoto imediatamente assimilável pelas plantas (Bishop, Jarlenski e Hetherington, 1980).

As plantas que estabelecem parcerias simbióticas com certas estirpes bacterianas desfrutam amplamente deste relacionamento, adquirindo uma fonte suplementar de azoto, primordial quando as reservas no solo são escassas (Sethi e Adhikary, 2012; Tao, Kelly e Radutoiu, 2019).

O género bacteriano *Azotobacter* destaca-se ainda pela produção de hormonas de crescimento e pela libertação de sideróforos, moléculas especializadas na captação de ferro (Wani *et al.*, 2016). Estes sideróforos, facilitam o acesso ao Fe do solo, sendo

também críticos na redução de N por nitrogenases ricas em Fe (Kraepiel *et al.*, 2009). *Azotobacter*, enquanto bioinoculante, transforma N<sub>2</sub> em NH<sub>3</sub> utilizado pelas plantas, apresentando robustos mecanismos de proteção contra o O<sub>2</sub> e metabolização de H (Hakeem *et al.*, 2016). A interação destas bactérias com o ambiente edáfico é complexa, e a compreensão completa dos mecanismos associados à captação de ferro e outros processos requer futuras investigações para melhor compreensão (McRose *et al.*, 2018). Estudos revelaram que a *Azotobacter chroococcum* (Figura 4) tem influência direta na nutrição vegetal e na promoção da fertilidade do solo. Estas têm a capacidade de produzir hormonas vegetais, e estas têm a capacidade de influenciar, estimular ou inibir, diversos processos bioquímicos e fisiológicos nas plantas e microrganismos.

Algumas espécies de bactérias pertencentes ao género *Azotobacter* são capazes de sintetizar auxinas, citocininas e giberelinas. Estas hormonas vegetais são fundamentais para a regulação do crescimento acelerado de plantas, como o tomateiro, conforme apontado por Azcón-Aguilar e Barea (1997). O género *Azotobacter* possui algumas características únicas entre os biofertilizantes. Possuem mais do que um tipo de enzimas nitrogenase (Joerger, Bishop e Evans, 1988). Na verdade, possui três complexos de nitrogenase distintos e a expressão destas varia com o vanádio (V), molibdénio (Mo) e amónio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) no meio de cultura. A nitrogenase-I é expressa apenas quando o Mo está presente no meio, a nitrogenase-II é expressa apenas quando o V está presente, enquanto a nitrogenase-III é expressa quando tanto o Mo como o V estão ausentes (Cabello *et al.*, 2009; Sethi e Adhikary, 2012).



Figura 4 - Morfologia de *Azotobacter chroococcum* com flagelos, adaptado de Bisset e Hale (1953).

## 4.2. Bactérias do género *Azospirillum*

O género *Azospirillum* pertencente à família Rhodospirillaceae e compreende atualmente 22 espécies identificadas, sendo as mais reconhecidas *Azospirillum brasilense* (Figura 5) e *Azospirillum lipoferum* (Figura 6). Estas bactérias, de natureza Gram-negativa, apresentam-se morfológicamente sob a forma espiralada ou cocobacilar e desenvolvem o seu ciclo de vida de forma intrinsecamente ligada às plantas, colonizando preferencialmente a rizosfera e as raízes vegetais (Cassán *et al.*, 2020). Apresentam um metabolismo versátil de C e N, o que as torna bem adaptadas para se estabelecerem no ambiente competitivo da rizosfera (Okon e Itzigsohn, 1995).

O mecanismo preponderante e de maior interesse agronómico reside na capacidade destas bactérias produzir diversas fito-hormonas, como auxinas, giberelinas, citocininas, pela capacidade de solubilizar fosfatos (através da libertação de ácido glicónico e de produzir sideróforos) que quelatam o Fe (Krishna *et al.*, 2023; Thuler *et al.*, 2003). Adicionalmente, *Azospirillum* fixa N<sub>2</sub>, aumenta a absorção de água e nutrientes pelas raízes, confere tolerância a stresses abióticos, tais como seca, salinidade, metais pesados protegendo ainda as plantas contra agentes fitopatogénicos, através da produção de bactericidas (Castro-Sowinski, 2016; Cassán *et al.*, 2020).

O flagelo polar desempenha um papel na adsorção inicial reversível às raízes, enquanto os polissacarídeos extracelulares contribuem para a ancoragem irreversível posterior (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000). A colonização radicular por *Azospirillum* envolve uma rede complexa de genes e fatores ainda não completamente elucidados, coordenando os processos de motilidade, quimiotaxia, adesão e modificações fisiológicas mútuas entre a bactéria e a planta hospedeira (Van De Broek, Lambrecht e Vanderleyden, 1998). A associação *Azospirillum*-raiz depende da capacidade da bactéria sobreviver no solo e colonizar o sistema radicular do hospedeiro e nas primeiras fases desta interação a motilidade e quimiotaxia das bactérias desempenham um papel crucial ao dirigirem-se para as raízes e aproveitarem os exsudados radiculares (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000). A motilidade oferece à bactéria a vantagem de se deslocar para condições de nutrientes favoráveis (Barak, Nur e Okon, 1983). Este género de bactérias apresenta uma quimiotaxia positiva em relação a ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e compostos aromáticos, bem como em relação a exsudados radiculares (Heinrich e Hess, 1985; Reinhold, Hurek e Fendrik, 1985; Zhulin e Armitage, 1993). A migração da *Azospirillum* para plântulas cultivadas no solo, tendo sido demonstrado que é limitada pela humidade do solo o que indica que a mobilidade desta através de películas de água no solo, desempenha um papel importante no comportamento quimiotático em ambientes naturais. Outra característica desta é o movimento dirigido para concentrações ótimas de O<sub>2</sub>, designado por aerotaxia. Esta resposta comportamental pode ser vantajosa para orientar as bactérias para zonas ótimas para a fixação de N (Zhulin *et al.*, 1996).

Predominantemente, ocorre a colonização da superfície radicular, no entanto, algumas estirpes através de mecanismos específicos têm a capacidade de infetar o interior das plantas. A *Azospirillum brasilense* por exemplo, prefere os pontos de emergência das raízes laterais e a zona dos pelos radiculares para interagir com as raízes, colonizando o seu interior (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000).

Em condições desfavoráveis, como a dessecação e a limitação de nutrientes, a *Azospirillum* pode converter-se em formas alargadas semelhantes a quistos (Lamm e Neyra, 1981). Esta alteração morfológica é acompanhada pelo desenvolvimento de um revestimento exterior de polissacáridos e pela acumulação de grânulos abundantes de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, que pode servir como fonte de C e de energia em condições de stresse (Tal e Okon, 1985).

Em síntese, o género *Azospirillum* destaca-se pela capacidade de estabelecer interações mutualísticas com as plantas, melhorando o crescimento e a produtividade vegetal através de diversos mecanismos benéficos no crescimento, desenvolvimento e produtividade em condições de campo. Estas bactérias apresentam a capacidade de colonizar diversas espécies vegetais, resultando em melhorias significativas (Tyagi, Maman e Tyagi, 2023). Estudos recentes evidenciam um aumento médio de 10% na produção de grãos em cereais inoculados, sendo mais expressivo em cereais de inverno (14%) do que em cereais de verão (9,5%) ou leguminosas (6,6%). O incremento na produção é frequentemente atribuído à complexa interação entre os modos de ação bacterianos e as plantas, bem como às diversas condições de stresse abiótico mitigadas pelas bactérias (Castro-Sowinski, 2016).

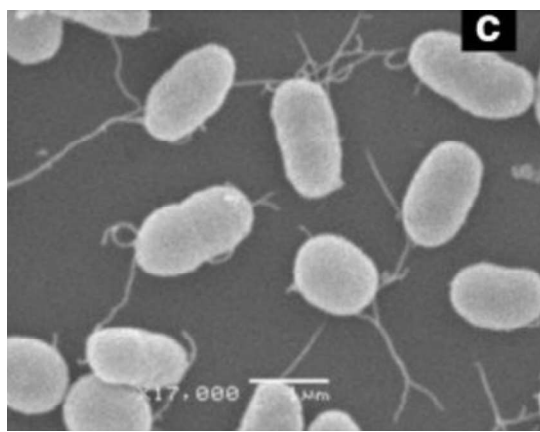


Figura 5 - Fotomicrografia de *Azospirillum brasilense*, adaptado de Camilios-Neto *et al.* (2014).

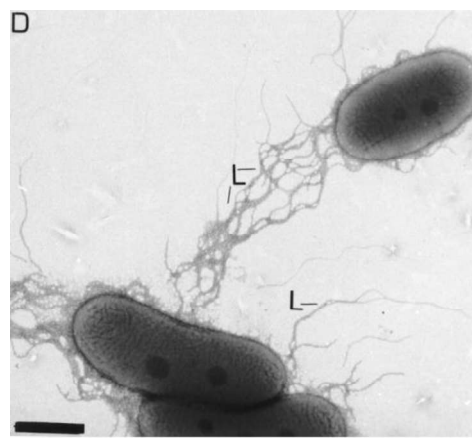


Figura 6 - Fotomicrografia de *Azospirillum lipoferum*, adaptado de Alexandre, Rohr e Bally (1999).

## 5. Materiais e métodos

### 5.1. Delineamento e preparação para a instalação do ensaio em viveiro

No âmbito do trabalho final, por uma questão de rigor e metodologia, para a concretização de resultados fiáveis e representativos, desenhou-se um plano detalhado que delineou as decisões metodológicas.

Face à importância crescente da AB e ao seu potencial para práticas sustentáveis, optou-se por realizar um ensaio em modo biológico. Posteriormente foi elegido um viveiro especializado na produção de hortícolas com certificação em modo biológico. A escolha da cultura a ser utilizada, recaiu sobre a alface (*Lactuca sativa* L. var. *Admir*) (Figura 7) devido ao seu curto ciclo de vida em viveiro, desde a germinação até ao momento propício para o transplante, que corresponde à quarta folha verdadeira.



**Figura 7** - Alface Admir (*Lactuca sativa* L. var. *Admir*), também conhecida como Alface Folha de Carvalho Roxa.

Este ensaio teve como finalidade avaliar se os biofertilizantes escolhidos induzem na alface a sua precocidade, o aumento do vigor vegetativo, o aumento de produção de MV e de MS, e dentro das análises laboratoriais verificar se são observadas diferenças no que respeita à absorção dos nutrientes N, P, K, Ca e Mg. Estabeleceu-se ainda que em ambos os ensaios iriam ser realizadas observações aos FMA, não de forma quantitativa, mas de forma qualitativa (a sua existência ou inexistência nas observações a realizar) em cada uma das modalidades. Relativamente à observação/quantificação de BFA, esta foi descartada, sendo o motivo principal a falta de equipamento laboratorial adequado para a sua identificação e quantificação. Nesta altura do delineamento, ficou decidida a instalação de dois ensaios: um ensaio em viveiro seguido de um ensaio em vasos durante um mês. No primeiro, o principal objetivo foi a avaliação dos parâmetros definidos e no segundo, a influência da aplicação dos biofertilizantes no ensaio anterior na produção, crescimento, absorção de nutrientes e desenvolvimento da colonização de FMA. Estabelecidos estes

pressupostos, este ensaio foi delineado de acordo com os parâmetros de estudo definidos.

Não só por imposição dos proprietários do viveiro, mas também por decisão própria, e por uma questão de cumprimento das normas e procedimentos da empresa, estabeleceu-se que todos os produtos a serem utilizados neste ensaio estariam homologados e autorizados segundo a legislação portuguesa para uso em AB. Para este ensaio, fez-se uso de um substrato comercializado pela empresa Siro®, formulado especificamente pelo viveiro e certificado para uso em AB.

No que respeita aos produtos biológicos específicos para o ensaio, foram selecionados dois: o VitaSoil® (Figura 8), da Symborg®, para inoculação de BFA, nomeadamente *Azotobacter* spp. e *Azospirillum* spp. e o MycoUp® também da Symborg® (Figura 9), destinado à inoculação de FMA contendo *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum*. Ambos os produtos estão em conformidade com os regulamentos e legislação estipulada para agricultura biológica.



**Figura 8** - Fotografia do produto VitaSoil®, retirado do website da Symborg®.



**Figura 9** - Fotografia do produto MycoUp®, retirado do website da Symborg®.

No âmbito do enquadramento deste trabalho, foi determinado instalar-se dois ensaios: inicialmente um em tabuleiros (ensaio em viveiro) e posteriormente um outro em vasos utilizando plantas provenientes do ensaio em tabuleiro (ensaio em produção). Adicionalmente, de forma a avaliar a influência do microbioma endógeno

do substrato ficou definido que para ambos os ensaios, iria ser utilizado substrato tanto esterilizado como não esterilizado. Cumulativamente, em ambos os ensaios pretendeu-se avaliar o comportamento dos produtos de forma isolada como combinada no crescimento das plantas. Assim em ambos os ensaios as modalidades testadas foram oito:

- **T**: Substrato não esterilizado e sem inoculação de BFA e FMA;
- **B**: Substrato não esterilizado com inoculação de BFA;
- **M**: Substrato não esterilizado com inoculação de FMA;
- **BM**: Substrato não esterilizado com inoculação de BFA e FMA;
- **E**: Substrato esterilizado e sem inoculação de BFA e FMA;
- **EB**: Substrato esterilizado com inoculação de BFA;
- **EM**: Substrato esterilizado com inoculação de FMA;
- **EBM**: Substrato esterilizado com inoculação de BFA e FMA;

Estimou-se que o ensaio em viveiro teria uma duração aproximada de 4 semanas, que corresponderia aproximadamente à quarta folha expandida. Ficou nesta altura também decidido que os biofertilizantes iriam ser aplicados no ensaio em viveiro e em 2 momentos distintos; o primeiro na data de instalação do ensaio e o segundo com 50% da dose inicial no início da terceira semana. Determinou-se que no ensaio em vasos não iria ser aplicado qualquer tipo de produto, sendo aqui o interesse verificar e avaliar o desempenho dos biofertilizantes inoculados no ensaio em viveiro e o seu efeito posterior no ensaio em vasos.

Neste ensaio foram utilizados tabuleiros de policloreto de vinilo (PVC), cada um de 240 alvéolos, organizados numa configuração de 20 X 12.

O delineamento experimental do ensaio, foi completamente casualizado, com 8 modalidades com 4 repetições por modalidade e 64 plantas (alfaces) por repetição.

Uma vez que o número de alvéolos por tabuleiro é bastante elevado, decidiu-se fazer 2 repetições por tabuleiro, assim, no total foram utilizados 16 tabuleiros para o ensaio em viveiro.

Relativamente às doses de aplicação as mesmas foram definidas da seguinte forma:

Para o MycoUp®, a dose aplicada foi de 4 kg/ha, o que correspondeu a 62,4 mg por tabuleiro.

Para o VitaSoil®, a dose aplicada foi de 30 L/ha, o que corresponde a 0,47 mL por tabuleiro.

Foram utilizadas 64 plantas por repetição uma vez que sendo necessário avaliar a absorção de nutrientes pela alface, teria que se assegurar um quantitativo de biomassa suficiente.

Em 11 destas 64 alfaces, iriam ser contabilizados o número de folhas. A escolha destas 11 plantas foi feita ainda nesta fase de forma completamente aleatória para cada repetição. As medições durante o ensaio, foram realizadas 2 vezes por semana. Durante as 4 semanas foram realizadas 7 medições (não existiram medições na data da instalação do ensaio).

O ensaio em viveiro decorreu na empresa BIOBROTAR – VIVEIROS DE PLANTAS BIOLÓGICAS E SERVIÇOS, LDA. Esta é uma empresa de produção de plantas hortícolas e aromáticas, de dimensão familiar. Em Portugal é das poucas empresas que optou pela produção de alface em modo de produção biológica. As estufas da empresa localizam-se em Póvoa de Cima, uma localidade do concelho de Mafra, distrito de Lisboa.

A região de Mafra é classificada segundo a classificação de Köppen-Geiger como Csb, que se traduz como um clima mediterrânico de verões amenos e caracterizado por invernos moderadamente frios e precipitação distribuída ao longo do ano (Kottek *et al.*, 2006). A compreensão das condições climáticas do local onde o ensaio foi instalado é essencial para perceber as influências ambientais no desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, na validade e interpretação dos resultados. Segundo o Instituto Português do Mar e da Atmosfera, Mafra, local onde o ensaio foi realizado, apresenta uma temperatura média anual de 15°C. As temperaturas máximas médias durante o verão chegam aos 22°C, enquanto as mínimas no inverno podem descer até os 8°C. A precipitação em Mafra, ainda que não influenciando a produção da alface, enquadra-se numa média anual entre 600 a 800 mm. O padrão de precipitação é sazonal, sendo os períodos de outono e inverno aqueles que registam uma maior frequência de chuvas. Pelo contrário, os meses de julho e agosto destacam-se como os mais secos do ano. A humidade relativa em Mafra apresenta uma média anual aproximada de 80%. A proximidade com o oceano Atlântico confere à região um clima húmido. Os ventos em Mafra têm predominância do quadrante norte. (IPMA, 2023).

A estufa selecionada para o ensaio foi escolhida tendo em conta as limitações existentes em Portugal, nomeadamente a escassez de estufas que trabalham sob regime de AB. Esta estufa em particular dispõe de um sistema de ventilação passiva, com aberturas automatizadas no telhado. Estas aberturas, bem como as existentes nas paredes, foram projetadas e estrategicamente posicionadas para promover a flutuabilidade térmica e o fluxo contínuo de ar, garantindo assim condições ideais para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

O regime de irrigação foi estabelecido tendo em conta as necessidades observadas das plantas. No interior da estufa, a rega foi assegurada por uma barra de irrigação suspensa e móvel, permitindo que as plantas em estudo fossem regadas em simultâneo com as de produção para venda. Na estufa, durante o ensaio foram realizadas duas regas diárias: uma ao início da manhã e outra ao fim da tarde. No entanto, com base na

observação visual do estado das plantas, houve dias em que, devido às elevadas temperaturas se fez uma terceira rega. De salientar que ao longo do ensaio, não foi realizada qualquer fertilização nas plantas.

A seleção do substrato, para este estudo, recaiu sobre o substrato já adotado pela empresa Biobrotar para a produção de alfaces em modo biológico. O critério para tal seleção foi claro: replicar fielmente o método de produção existente num viveiro biológico, permitindo uma abordagem experimental que espelhasse práticas reais da empresa. De notar que foi também empregada uma quantidade significativa de vermiculite (esterilizada e não esterilizada), que no fim da sementeira, foi aplicada por cima dos tabuleiros. A esterilização do substrato foi feita replicando o protocolo descrito por Shrestha (2021) para esterilização de substratos. Inicialmente, o substrato foi humedecido com água destilada que segundo Shrestha (2021), assegura que a temperatura é uniformemente distribuída durante o processo, aumentando a eficácia da esterilização. Depois de humedecido, o substrato foi acondicionado em sacos próprios para a esterilização em autoclave (Figura 10). Os sacos com o substrato foram esterilizados a 121 °C durante um período de 30 minutos em autoclave AJC - Uniclave® 88 (Figura 11).

Concluída a esterilização, os sacos foram imediatamente selados, mantendo a esterilidade do substrato. Este passo é essencial para minimizar qualquer risco de contaminação até ao momento da sua utilização no viveiro durante a instalação do ensaio. Assegurou-se que as condições de armazenamento fossem ideais, mantendo os sacos em um local fresco, seco e abrigado de luz direta até à sua utilização.

A vermiculite utilizada nas modalidades esterilizadas foi esterilizada a 121 °C. durante 20 minutos seguindo o protocolo descrito por Park (2021). O protocolo é semelhante ao do substrato, alterando apenas o tempo que a vermiculite deve ficar no autoclave.



Figura 10 - Substrato devidamente acondicionado em saco próprio para esterilização.



Figura 11 - Autoclave utilizado, AJC - Uniclave® 88.

No contexto do presente trabalho, assegurar a pureza e esterilidade dos materiais utilizados é fulcral para a validade e integridade dos resultados alcançados. Com o

objetivo de reduzir potenciais contaminações, realizou-se também a esterilização das sementes que seriam utilizadas nas modalidades esterilizadas. Deste modo, elegeu-se o protocolo de esterilização da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (ESACB) adaptado de Nanduri *et al.* (2006) para este propósito. A esterilização adequada das sementes permite eliminar fatores contaminantes, garantindo que a avaliação incide especificamente sobre o substrato e os produtos utilizados.

Na empresa onde viria a ser instalado o ensaio, as sementeiras dos tabuleiros são feitas com recurso a uma sementeira pneumática por sucção em vácuo, as sementes das alfaces, dada a sua pequena dimensão, são peletizadas por uma camada de argila. Esta argila, dada a sua natureza porosa, tem a capacidade de absorver água. Surgiu, assim, uma interrogação: o hipoclorito de sódio utilizado na esterilização de sementes das modalidades esterilizadas poderia ficar retido na argila e influenciar a taxa de germinação?

Com o intuito de esclarecer esta questão e minimizar eventuais implicações, procedeu-se à realização de um ensaio prévio para determinar a facultade germinativa das sementes em questão e assim clarificar a questão exposta anteriormente. Este ensaio prévio foi instalado a 1 de junho de 2023.

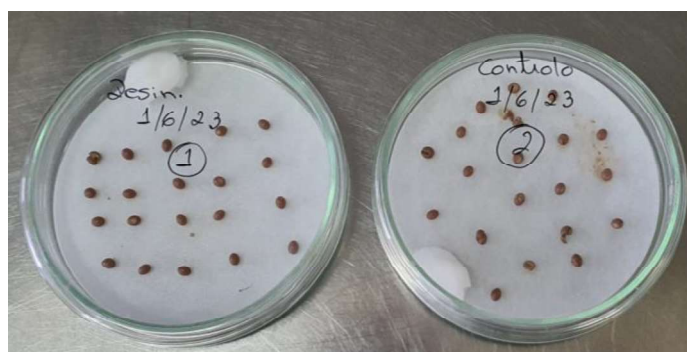
No âmbito deste ensaio prévio, utilizaram-se 8 placas de Petri. Em cada uma delas, foi colocado um papel de filtro, e em seguida, procedeu-se à sua esterilização por calor seco no esterilizador da Marca Cassel®, a uma temperatura de 130 °C, durante 60 minutos. Como dito anteriormente, para as sementes, foi utilizado o protocolo de esterilização de sementes da ESACB.

Seguindo o protocolo, preparou-se uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, utilizando uma lixívia comercial com uma concentração de 5%. Neste contexto, foram estabelecidos dois tratamentos distintos para a esterilização das sementes: o primeiro recorrendo à solução de hipoclorito de sódio a 1% e o segundo à água destilada. Para tal, as sementes foram divididas em dois lotes, cada um contendo 80 unidades. O lote destinado ao primeiro tratamento foi imerso na solução de hipoclorito de sódio e o do segundo tratamento em água destilada, respetivamente, segundo o protocolo durante um período de 10 minutos. Findo este período, as sementes submetidas à solução de hipoclorito de sódio foram lavadas com água destilada. Já para o lote submerso apenas em água destilada, procedeu-se somente à remoção do excesso de água.

Em condições estéreis, asseguradas por uma câmara de fluxo laminar, distribuíram-se 20 sementes por placa de Petri, totalizando assim 160 sementes para o ensaio. Das 8 placas, 4 foram destinadas às sementes tratadas com hipoclorito de sódio e as restantes 4 às sementes que estiveram apenas em contacto com água destilada. Finalizando o procedimento, cada placa foi humedecida com 5 mL de água destilada (Figura 12). Posteriormente, as placas foram transferidas para numa estufa ajustada a uma temperatura constante de 25 °C. A estufa utilizada foi o modelo Fitoclima 750E da Marca ARALAB®. Estava previsto que as sementes permanecessem na estufa por 10 dias, sendo hidratadas diariamente. Contudo, no 5º dia, todas as sementes já se encontravam germinadas, o que levou ao término do ensaio.

Por termos obtido uma taxa de germinação de 100% (no total de 160 sementes) foi decidido ignorar quaisquer tipos de tratamentos estatísticos e avançar com o ensaio.

Com base nos dados obtidos, verificou-se que o protocolo de esterilização de sementes adotado não influenciava a taxa de germinação. Este resultado é um indicativo de que a esterilização não comprometeu a viabilidade das sementes, o que permitiu eliminar quaisquer erros que pudessem ocorrer no futuro.



**Figura 12** - Sementes das alfaces colocadas em placas de Petri, pronta a entrar na câmara de germinação.

## 5.2. Instalação do ensaio em viveiro

O ensaio foi instalado no dia 13 de junho de 2023, seguindo todas as etapas da instalação do ensaio previamente definidas.

Os tabuleiros utilizados, antes de serem utilizados, foram submersos numa solução de hipoclorito de sódio comercial a 5% durante 10 minutos. Após a desinfecção, os tabuleiros foram lavados abundantemente com água para eliminar qualquer resíduo desinfetante.

Após a desinfecção dos tabuleiros, estes foram marcados com os respetivos códigos de identificação, visando garantir a rastreabilidade e o controle adequados em todas as etapas do ensaio. Este sistema consiste num código alfanumérico que compreende 8 dígitos, permitindo a identificação do tratamento, da repetição e da localização exata da planta dentro do tabuleiro conforme descrito na Figura 13. Os alvéolos foram preenchidos com substrato e substrato esterilizado dependendo da modalidade. Por uma questão de uniformização, e uma vez que o substrato esterilizado se encontrava humedecido da esterilização, decidiu-se também humedecer o substrato não esterilizado, para que a relação peso/volume não fosse muito díspar entre substratos.

		000-R1										000-R2									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	
G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20	
H	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	
I	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16	I17	I18	I19	I20	
J	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20	
K	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	K13	K14	K15	K16	K17	K18	K19	K20	
L	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	

Figura 13 - Exemplo explicativo da nomenclatura e disposição das plantas nos tabuleiros. A cinzento as plantas de bordadura, a verde as plantas do ensaio, a amarelo as plantas selecionadas de forma aleatória para medições e a vermelho, plantas para observação de micorrizas.

O substrato utilizado apresentava valores de pH de 5,6 (pouco ácido), de MO de cerca de 67%, a CE era de 0,84 dS/m (pouco salino), N total 8,43 g/kg, valores de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (1533 mg/kg) e K<sub>2</sub>O (4142 mg/kg) muito elevados, o Ca apresentava um valor de 2,9% e o Mg de 0,19%. Globalmente, o substrato apresenta-se com valores elevados de nutrientes.

Durante a instalação do ensaio as sementes destinadas aos tratamentos com substrato esterilizado seguiram o protocolo de desinfecção de sementes da ESACB, contudo, foi introduzida uma alteração no processo de lavagem: após a imersão, as sementes foram lavadas utilizando água da rede pública de abastecimento em vez de água destilada, conforme estabelecido no protocolo.

Manualmente com recurso a uma pinça desinfetada numa solução alcoólica a 75%. Uma única semente foi colocada em cada um dos alvéolos dos tabuleiros de germinação, assegurando uniformidade na distribuição.

Feito isto, seguiu-se a inoculação dos biofertilizantes selecionados: o MycoUp® e o VitaSoil®. O MycoUp, previamente pesado nas instalações da ESACB, foi incorporado na dose de 500 mg. Por sua vez, o VitaSoil® foi rigorosamente medido, utilizando micropipetas de alta precisão VWR® High Performance Single Channel de 1 mL e 10 mL, para garantir a máxima exatidão na extração do volume desejado (3,75 mL).

De seguida, cada um dos biofertilizantes foi diluído separadamente em água proveniente da rede pública de abastecimento. Para tal, recorreu-se a uma proveta graduada de 500 mL para medição precisa dos volumes de diluição. O MycoUp foi diluído em 4,3 L de água, enquanto o VitaSoil foi diluído em 4,8 L de água.

Posteriormente, foram retirados 5 mL de cada uma das suspensões de biofertilizantes previamente preparadas, utilizando novamente as micropipetas de alta precisão. Estas alíquotas de 5 mL foram então inoculadas nos alvéolos das modalidades correspondentes a cada biofertilizante.

Após a inoculação dos produtos, procedeu-se à aplicação de uma fina camada de vermiculita nos tabuleiros. Em função do tipo de modalidade, a vermiculita esterilizada foi aplicada nos tabuleiros das modalidades esterilizadas e a não esterilizada nos tabuleiros das modalidades com substrato não esterilizado.

Após a sementeira (Figura 14), os tabuleiros foram transportados numa câmara hermética do viveiro, dotadas com um sistema de circulação de ar e de controlo de temperatura e humidade. Durante um período de 48 h, os tabuleiros foram mantidos a uma temperatura estável de 15 °C e a uma humidade relativa de 80%. Segundo Castro e Domingues (2020), o propósito da germinação em câmara não é promover a emergência da planta, mas sim facultar às sementes as condições ideais para iniciar o seu ciclo germinativo, garantindo, assim, um desenvolvimento robusto aquando da sua transição para a estufa.



Figura 14 - Tabuleiros ao fim da sementeira, prontos a serem postos na câmara de germinação.

Concluídas as 48 h dos tabuleiros na câmara de germinação, os tabuleiros foram então colocados nas estufas. A temperatura e humidade dentro das estufas foram monitorizadas utilizando um medidor da marca INKBIRD® IBS-TH1 Plus que registou ambos os parâmetros com intervalos de 30 minutos durante todo o ensaio.

Apesar da monitorização contínua, o ensaio não contou com controlo ativo das condições ambientais no interior das estufas ao longo do seu desenvolvimento.

As medições do comprimento das folhas foram realizadas duas vezes por semana em 11 plantas previamente escolhidas de forma aleatória por repetição. Em cada planta foram contabilizados o número de folhas e o comprimento de cada uma delas. As medições foram realizadas com recurso a uma fita métrica flexível. As medições e contabilizações foram efetuadas sempre nas mesmas plantas de cada repetição.

Como descrito anteriormente, para garantir a eficácia da inoculação dos produtos nas modalidades, decidimos realizar a inoculação em dois momentos distintos durante o ensaio. O primeiro momento ocorreu na instalação do ensaio, seguindo a dose inicial previamente estabelecida. A segunda inoculação foi realizada no dia 30 de junho de 2023, 17 dias após a sementeira (DAS), e consistiu na reaplicação dos produtos numa dose reduzida a 50% da quantidade inicial. A decisão teve como objetivo assegurar que a inoculação dos produtos fosse mantida e que o processo de avaliação continuasse a refletir as condições desejadas.

É relevante observar que, em ambos os momentos de aplicação, mantivemos a mesma metodologia e procedimentos para a inoculação dos produtos. Essa abordagem uniforme foi adotada para minimizar qualquer fonte de variabilidade e garantir a consistência em todo o período do ensaio.

### 5.3. Medições e pesagens

Findos os 29 DAS, o ensaio em tabuleiros considerou-se concluído. A data de fim do ensaio ocorreu no dia 12/07/2023, e estas foram transportadas para as instalações da ESACB.

Importa salientar que, ao longo do período experimental, não se verificou qualquer incidência de pragas ou doenças nas plantas.

De cada tabuleiro ficou estipulado que 2 filas de plantas mais externas de plantas (longitudinalmente e transversalmente) seriam consideradas plantas de bordadura e por isso descartadas.

As 64 plantas de cada uma das 4 repetições das 8 modalidades experimentais foram enviadas para o laboratório de solos da ESACB, onde se procedeu à sua separação para diferentes fins analíticos. De cada repetição, foram aleatoriamente reservadas 8 plantas (que não as mesmas que as 11 selecionadas) para transplante no ensaio em vasos. As 56 plantas remanescentes, foram separadas a parte aérea da radicular.

Das 56 plantas, 11 tinham sido previamente selecionadas aleatoriamente. Nestas, realizaram-se diversas medições e pesagens: biomassa fresca da parte aérea; número de folhas; comprimento da última folha desenvolvida (considerou-se desenvolvida quando o comprimento era superior a 2 cm); altura das plantas; comprimento radicular (após lavagem). Destas 11 raízes, 2 delas foram conservadas numa solução alcoólica a 70% para posterior observação de micorrizas.

As partes aéreas das 11 plantas selecionadas e as restantes 45 foram colocadas em estufa a 65°C durante 48 horas para determinação da biomassa seca, sendo que as primeiras foram colocadas individualmente, enquanto que as restantes foram em lotes (Figura 15 e Figura 16) postas a secar em (plantas para análise laboratorial). Por sua vez, as raízes das 9 plantas selecionadas foram também secas individualmente. Relativamente às demais partes radiculares separadas, o substrato foi separado das raízes das plantas. O substrato foi analisado no laboratório de Solos da ESACB. A humidade foi determinada por método gravimétrico, o pH (H<sub>2</sub>O) por potenciometria (extrato saturado), a CE num condutímetro (extrato saturado), MO perda de peso por inceneração a 450 °C durante 16 h, o N total pelo método de Kjeldahl, o P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O assimiláveis pelo método de Egnér-Rhiem, o Ca e Mg foram extraídos por uma solução de acetato de amónio tamponizado a pH = 7,0 e doseados por espectrofotometria de absorção atómica, o P total após incineração durante 3 h a 550 °C e extraído com ácido sulfúrico 0,5 M, o P inorgânico foi extraído com ácido sulfúrico 0,5 M. O P total e o P inorgânico foram doseados por espectrofotometria de absorção molecular. O P orgânico foi calculado pela diferença entre o P total e o P inorgânico.



**Figura 15** - Alfaces separadas do ensaio em viveiro separadas. Partes aéreas prontas a entrar na estufa e radiculares para separação e posterior análise do substrato.



**Figura 16** - Alfaces selecionadas para medição de matéria seca. A parte radicular antes do processo de lavagem de raízes.

Todas as amostras, tanto as partes aéreas quanto as raízes das plantas, foram colocadas na estufa (Figura 17) por um período de 48 horas, mantendo uma temperatura constante de 65 °C. Essa etapa é crucial para reduzir o teor de humidade das amostras, possibilitando posteriormente a avaliação do peso seco da parte aérea e da parte radicular da alface.



**Figura 17** - Alfaces (parte aérea e radicular) dentro da estufa pronta para o processo de secagem.

Após as 48 horas de secagem na estufa a 65°C, procedeu-se à pesagem individual da biomassa seca, tanto da parte aérea como radicular, das 11 plantas previamente selecionadas (no caso das raízes foram somente 9). Para este efeito, recorreu-se a uma balança analítica e registou-se os valores obtidos.

De seguida, a parte aérea destas 11 amostras e as restantes foram trituradas, utilizando um moinho Ika® A10 Basic, até se obter um pó fino e homogéneo. Este material vegetal moído foi posteriormente enviado para o laboratório de Solos da ESACB, onde foram quantificados os parâmetros assinalados anteriormente. A humidade foi quantificada pelo método gravimétrico, o N total pelo método de Kjeldahl, os elementos minerais P, Ca, Mg e K foram extraídos com ácido clorídrico (20% v/v). O P foi doseado por espectrofotometria de absorção molecular e o Ca, Mg e K por espectrofotometria de absorção atómica.

#### 5.4. Observação e quantificação de micorrizas

O protocolo utilizado para processamento e montagem das lâminas para posterior observação e quantificação de estruturas de FMA nas raízes foi adaptado de Vierheiling *et al.* (1998) e Ngo *et al.* (2021). As raízes previamente armazenadas em etanol 70% foram primeiro lavadas cuidadosamente com água destilada para remoção de partículas de solo aderentes. Foram então cortados segmentos radiculares com cerca de 1 cm, os quais foram colocados numa solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 10% e fervidos numa placa de aquecimento (Bunsen® MC-8) durante 5 minutos. Seguidamente, foram novamente lavados com água destilada e imersos numa solução corante constituída por ácido acético a 5% e tinta preta da marca Pelikan® a 5%, posteriormente foram fervidas durante 5 minutos adicionais. Após nova lavagem das raízes coradas com água destilada, estas foram transferidas para água acidulada onde repousaram durante 20 minutos antes da montagem das lâminas (Figura 18). Em cada lâmina foram dispostos 10 segmentos radiculares corados por cada repetição das 8 modalidades. Posteriormente, foram visualizados ao microscópio ótico e realizadas 5 observações independentes em diferentes campos de cada segmento radicular, registando-se a presença/ausência de estruturas fúngicas. Para a observação destas, foi utilizado um microscópio ótico da marca Leica® DME numa ampliação de 100X (Figura 19).



Figura 18 - Raízes em água acidulada.

Figura 19 - Fotomicrografia de micorrizas (100X).

## 5.5. Instalação do ensaio em vasos

O ensaio em vasos foi instalado no dia 15/07/2023, 32 DAS das plantas. O substrato foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido, o que incluiu a esterilização de um novo lote de substrato, especialmente destinado a esta fase do ensaio para as modalidades de substrato esterilizado. Para o ensaio em vasos, utilizámos vasos cilíndricos regulares de polietileno de alta densidade, com uma capacidade de 5 L, (14 cm na base por 24 cm de altura). No total foram transplantadas 64 plantas, seguindo um desenho experimental de 2 plantas por repetição, distribuídas em 4 repetições, abrangendo um total de 8 modalidades distintas. Importa salientar novamente que, neste ensaio, as plantas não foram inoculadas com qualquer tipo de produto. Adicionalmente, para proporcionar as condições ideais de crescimento, todas as plantas foram posicionadas sob uma rede de ensombramento com uma taxa de sombra de 75% (Figura 20). Vale mencionar que, embora tenha havido um acompanhamento constante, não foram realizados registos específicos de temperatura e humidade durante o período do ensaio em vasos. A rega das plantas foi realizada diariamente, de acordo com a exigência da cultura, embora a quantidade exata de água aplicada não tenha sido quantificada de forma específica. Para garantir a rastreabilidade e identificação precisa de todos os vasos utilizados neste ensaio, cada um foi devidamente rotulado. De referir que todos os vasos passaram por um processo rigoroso de limpeza e desinfeção. Esse procedimento envolveu a utilização de uma máquina de limpeza de alta pressão a água e lixívia – de marca comercial com uma concentração máxima de 5%, assegurando que os vasos estavam completamente livres de qualquer contaminação anterior.



Figura 20 - Alfices do ensaio em vaso sob rede de ensombramento a 75%.

Este ensaio terminou no dia 16/08/2023, 32 dias após transplante. A metodologia seguida neste ensaio após o seu levantamento foi a mesma que a utilizada no ensaio em viveiro. As plantas foram cortadas, pesadas (parte aérea e radicular), lavaram-se as raízes, mediu-se o comprimento de ambas as partes e as raízes foram conservadas numa solução alcoólica a 70% para posterior montagem de lâminas e observações. Já a parte aérea à semelhança do que ocorreu no ensaio anterior, foi seca na estufa a fim de se determinar a MS. Findo o processo de secagem, foram novamente pesadas e trituradas para análises laboratoriais. O processo de montagem de lâminas para observação de raízes foi exatamente o mesmo que o descrito anteriormente. Após a montagem das lâminas, foram efetuadas as observações e os valores destas registados.

## 5.6. Análise Estatística

Os dados recolhidos foram analisados estatisticamente pelo *Software* IBM SPSS Statistics® Versão: 28.0.1.0 através da Análise de Variância univariada (One-way ANOVA). Os pressupostos de homogeneidade de variâncias e de normalidade dos resíduos foram testados respetivamente através dos testes de Levene e de Shapiro-Wilk. Quando esses pressupostos não se verificaram, utilizou-se o teste não paramétricos de Kruskal-Wallis para testar a existência de diferenças significativas entre modalidades. Utilizou-se o teste de Tukey no caso da ANOVA ou o de Dunn no caso dos testes de não paramétricos para identificar as diferenças significativas entre modalidades. Em ambos os casos considerou-se um nível de significância de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

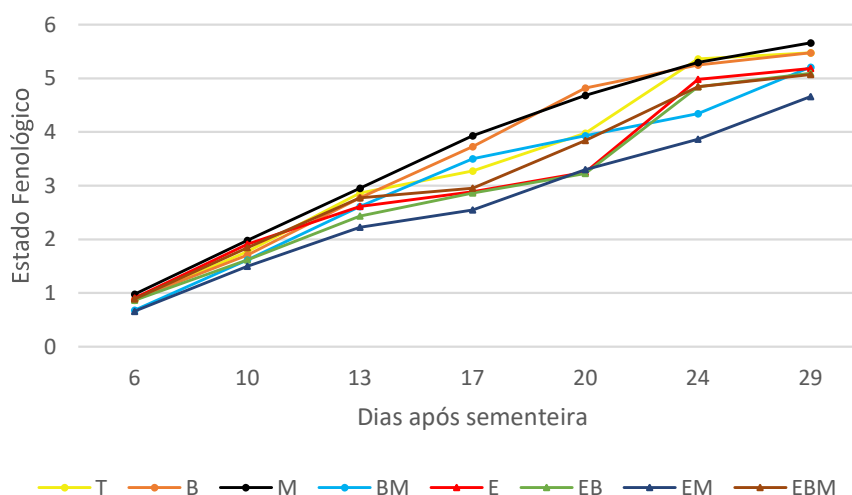
## 6. Resultados

### 6.1. Ensaio em viveiro com alface

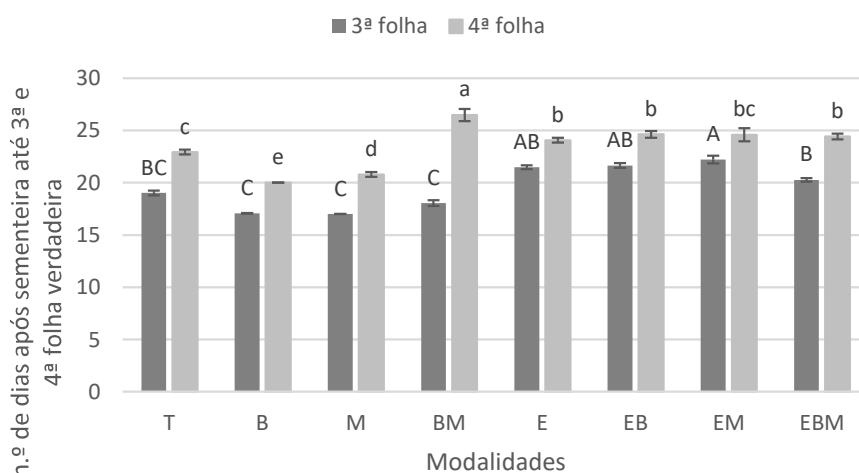
Apresentam-se de seguida os resultados obtidos nos diversos tratamentos no ensaio de produção da alface em viveiro.

#### 6.1.1. Crescimento, produção e absorção de nutrientes

A Figura 21 mostra a evolução fenológica da alface na fase de viveiro nas diversas modalidades. Os estados fenológicos da alface foram adaptados da escala BBCH (Meier, 2018). Neste ensaio, o estado 1 corresponde aos cotilédones completamente expandidos (código 10 da escala BBCH). Os estados 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem respetivamente à primeira, segunda, terceira, quarta e quinta folha verdadeira expandida maior que 2 cm (códigos 11 a 15 da classificação BBCH). Como se pode observar, nos estados fenológicos 4 e 5 (3ª e 4ª folhas expandidas) é visível alguma diferenciação entre modalidades. A Figura 22 mostra que no estado fenológico 4 as modalidades mais precoces são as modalidades B, M e BM, com valores entre 17 na modalidade M, 17,1 na modalidade B e 18 DAS na modalidade BM. As modalidades com menor precocidade foram E, EM, EB e E. EM (22,2 DAS), EB (21,7 DAS) e E (21,5 DAS). No estado fenológico 5, esta tendência mantém-se acentuando-se a precocidade das modalidades B e M relativamente à BM. A modalidade B apresentou um valor de 20,0 DAS significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) ao da modalidade M com 20,8 DAS, que por sua vez foi também significativamente inferior ao da modalidade BM com 26,5 DAS que foi a modalidade com menor precocidade de todo o ensaio.

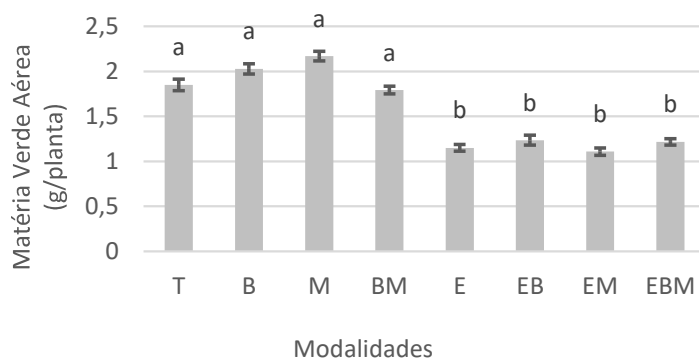


**Figura 21** - Evolução fenológica da alface desde o desenvolvimento dos cotilédones, 6 DAS até ao levantamento do ensaio, 29 DAS. A fase 1 corresponde ao completo desenvolvimento dos cotilédones, a fase 2 corresponde à primeira folha verdadeira, a 3 à segunda folha verdadeira, a 4 à terceira folha verdadeira, a 5 à quarta folha verdadeira e a fase 6 corresponde à quinta folha verdadeira. Os estados fenológicos, foram adaptados da ilustração da tese de Mestrado “Investigating optimum wavelength(s) for growth of *Lactuca sativa*, L. using tunable LED sources and developing thin-film filters for glass greenhouses” de Jacqueline Thomas.

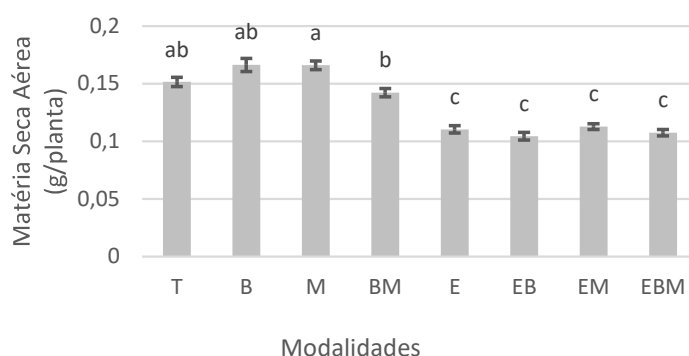


**Figura 22** - Número médio de dias após sementeira (DAS) por modalidade até ao aparecimento da 3ª e 4ª folha verdadeira. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas entre modalidades para a 3ª folha verdadeira (letras maiúsculas) e para a 4ª folha verdadeira (letras minúsculas) pelo Teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) e comparações por Método Dunn.

No que diz respeito à biomassa produzida pelas alfaces no ensaio em viveiro (Figura 23 e Figura 24) tanto de MV como de MS, ela foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) nas modalidades não esterilizadas, relativamente às esterilizadas. Apesar de não se terem observado diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as modalidades destes dois grupos, nas modalidades não esterilizadas a produção variou entre 1,79 na modalidade BM a 2,17 g MV/planta na M e relativamente à MS variaram entre 0,142 na modalidade BM e 0,166 g MS/planta nas modalidades B e M. No grupo das modalidades esterilizadas o peso verde variou entre 1,11 na modalidade EM e 11,23 g MS/planta na modalidade EB. O peso seco variou entre 0,104 na modalidade EB e 0,113 g MS/planta na EM.

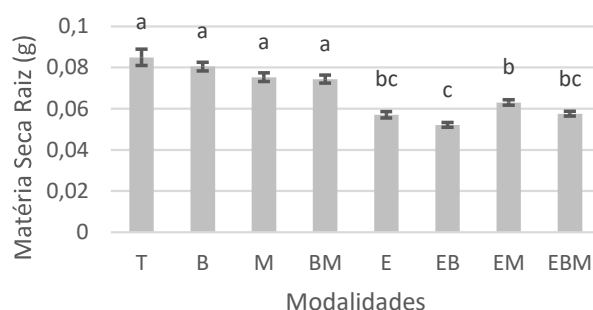


**Figura 23** - Biomassa da parte aérea (g/planta) no final do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



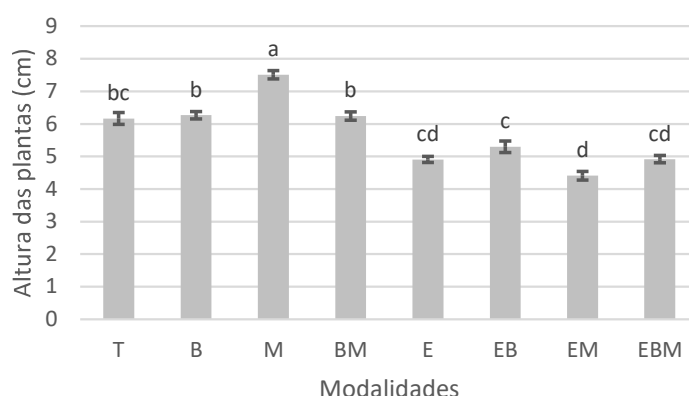
**Figura 24** - Produção de matéria seca da parte aérea (g/planta) no final do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Resultado semelhante ao da produção de biomassa da parte aérea da alface foi observado na produção de MS da raiz (Figura 25). Nas modalidades não esterilizadas a MS da raiz foi significativamente superior à das modalidades esterilizadas ( $p < 0,05$ ). Entre as modalidades apenas se verificaram diferenças significativas no grupo com esterilização ( $p < 0,05$ ), no qual a modalidade EM apresentou um valor superior (0,063 g MS/planta) ao da modalidade EB (0,052 g MS/planta). No grupo das modalidades não esterilizadas não houve variações significativas ( $p > 0,05$ ) registando-se valores entre 0,074 na modalidade BM e 0,085 g MS/planta na modalidade T.



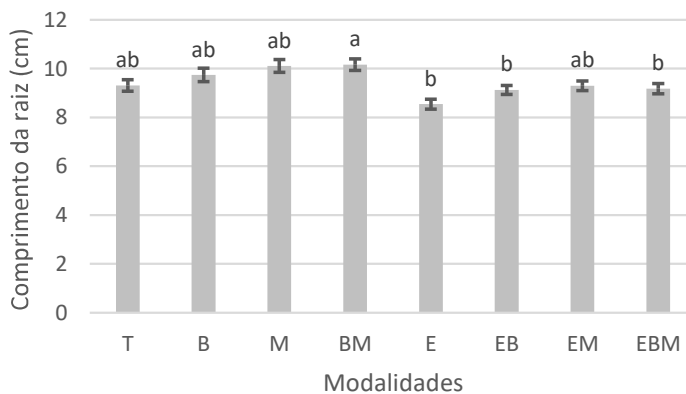
**Figura 25** - Matéria seca da raiz (g/planta) após levantamento do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A altura das plantas (Figura 26) do ensaio em viveiro apresentou diferenças significativas entre as modalidades ( $p < 0,05$ ). Uma vez mais, as modalidades com substrato não esterilizado apresentaram valores significativamente maiores do que as modalidades em substrato esterilizado. Dentro das modalidades do primeiro grupo a modalidade que apresentou um valor significativamente superior foi a M (7,51 cm) > B (6,27 cm) = BM (6,24 cm) = T (6,17 cm). Nas modalidades esterilizadas a inoculação com bactérias EB (5,30 cm) esteve associada a uma altura das plantas significativamente superior à modalidade com inoculação com micorrizas, EM (4,41 cm).



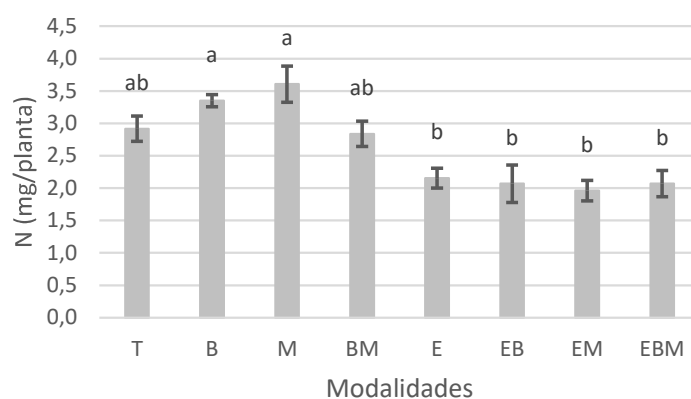
**Figura 26** - Altura (cm) das alfaces do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

No que diz respeito ao comprimento da raiz (Figura 27) a modalidade BM (10,16 cm) foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) às modalidades EBM (9,18 cm), EB (9,13 cm) e E (8,54 cm). Tal como se observou na MS das raízes a modalidade EM foi a que apresentou maior valor (9,30 cm) do comprimento da raiz entre as modalidades esterilizadas.



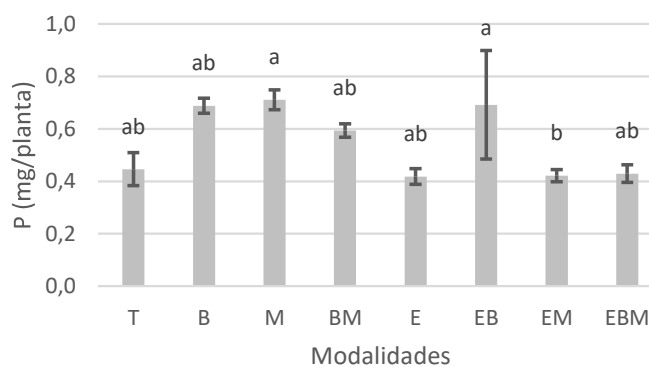
**Figura 27** - Comprimento radicular das raízes das alfaces (cm), do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Em relação à quantidade de nutrientes absorvida pelas plantas verificou-se que no caso do N (Figura 28) houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as modalidades. As modalidades não esterilizadas B e M apresentaram maior absorção de N (3,35 e 3,61 mg N/planta, respetivamente) do que as modalidades esterilizadas

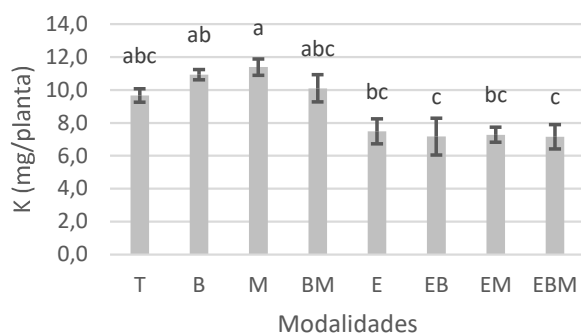


**Figura 28** - Média de absorção de N (mg/planta) em cada uma das modalidades do ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tanto na absorção de P como de K (Figura 29 e Figura 30), foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as modalidades. Os valores de P absorvido oscilaram entre 0,42 (nas modalidades E e EM) e 0,71 mg P/planta (na modalidade M). A absorção de K variou entre 7,15 (na modalidade EBM) e 11,39 mg K/planta (na modalidade M). O substrato apresentava níveis muito elevados tanto de P como de K assimiláveis o que terá contribuído para que o papel dos microrganismos na absorção de P e K não seja muito claro.

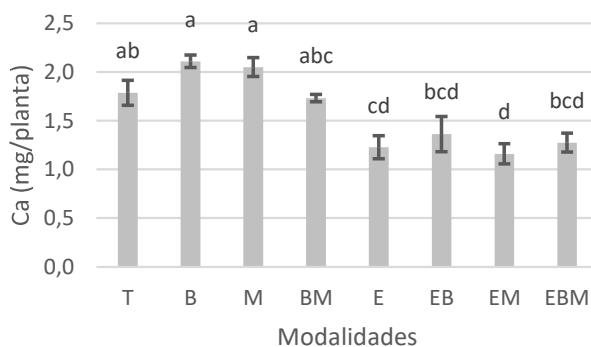


**Figura 29** - Valores médios por modalidade de absorção de P (mg/planta) no ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

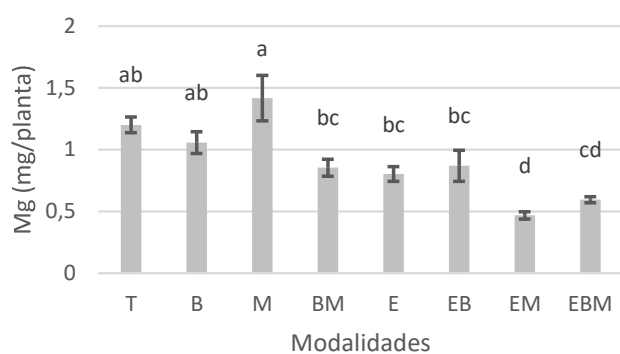


**Figura 30** - Valores médios por modalidade de absorção de K (mg/ planta) no ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na absorção de Ca e Mg (Figura 31 e Figura 32) entre as distintas modalidades, com os valores mais elevados a serem registados nas modalidades B (2,11 mg Ca/planta) e M (2,05 mg Ca/planta e 1,42 mg Mg/planta). O valor mais baixo ocorreu tanto para o Ca (1,16 mg/planta) como para o Mg (0,47 mg/planta) na modalidade EM.



**Figura 31** - Valores médios por modalidade de absorção de Ca (mg/ planta) no ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 32** - Valores médios por modalidade de absorção de Mg (mg/ planta) no ensaio em viveiro. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Resumidamente, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas, a inoculação de FMA e BFA isoladamente em substrato não esterilizado (M e B) promoveu um aumento na absorção de N, Ca e Mg pelas plantas. Contudo, tal efeito benéfico das micorrizas não foi observado quando aplicadas em substrato esterilizado.

### 6.1.2. Características físico-químicas do substrato

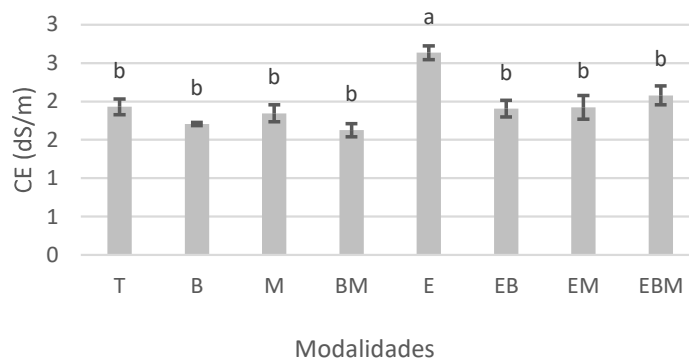
Como se pode observar pela Tabela 1, a composição físico-química do substrato no final do ensaio em viveiro não mostrou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as diversas modalidades no que diz respeito aos valores de pH, M.O., P total, P inorg., P org. e Mg. Os valores de pH das diversas modalidades variaram entre 6,30 na modalidade E e 6,54 na EM. A MO apresentou o valor mais baixo na EM (63,11%) e o mais elevado na modalidade E (68,19%). O P Total variou entre 1210 na modalidade B e 1709 mg/kg na modalidade T. O P inorgânico apresentou o menor valor na modalidade E (705 mg/kg) e o mais elevado ocorreu na modalidade BM (1082 mg/kg) enquanto o P orgânico variou entre 216 na modalidade BM e 666 mg/kg, na modalidade T. Os teores de Mg, variaram entre 2,06 na modalidade BM e 3,52 g/100g em T.

**Tabela 1** - Valores de pH, matéria orgânica (MO, g/100g), P total, orgânico e inorgânico (mg/kg), Ca e Mg (g/100g) observados no substrato dos diversos tratamentos no final do ensaio de produção de alface em viveiro. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as modalidades pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

MOD	pH (H <sub>2</sub> O)	MO (g/100 g)	P Total (mg/kg)	P inorg. (mg/kg)	P org. (mg/kg)	Ca (g/100 g)	Mg (g/100 g)
T	6,39 ± 0,04	66,47 ± 0,57	1709 ± 135	1043 ± 146	666 ± 232	3,87 ± 0,06 a	3,52 ± 0,27
B	6,39 ± 0,03	66,92 ± 1,34	1210 ± 49	868 ± 46	341 ± 71	3,36 ± 0,21 a	2,28 ± 0,37
M	6,31 ± 0,03	66,57 ± 0,85	1571 ± 156	1030 ± 66	542 ± 136	3,91 ± 0,14 a	3,23 ± 0,40
BM	6,51 ± 0,03	67,16 ± 1,00	1298 ± 195	1082 ± 146	216 ± 55	3,69 ± 0,14 a	2,06 ± 0,19
E	6,30 ± 0,01	68,19 ± 0,68	1248 ± 95	705 ± 73	542 ± 144	3,61 ± 0,07 a	3,13 ± 0,51
EB	6,52 ± 0,05	63,69 ± 2,11	1318 ± 194	859 ± 77	458 ± 208	3,27 ± 0,28 ab	3,26 ± 0,47
EM	6,54 ± 0,10	63,11 ± 1,46	1340 ± 112	756 ± 132	585 ± 134	2,54 ± 0,05 b	3,43 ± 0,26
EBM	6,49 ± 0,04	65,55 ± 0,68	1262 ± 117	814 ± 29	448 ± 133	3,49 ± 0,19 a	2,64 ± 0,04
Sig.	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$

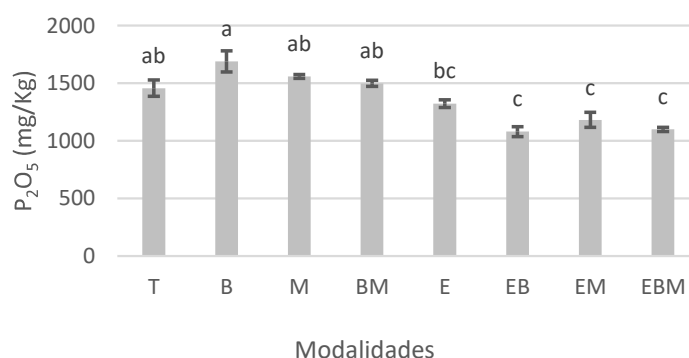
Relativamente à CE (Figura 33) do substrato, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre o substrato esterilizado E (2,64 dS/m) e as restantes modalidades (1,63 em BM e 2,08 dS/m em EBM). O substrato esterilizado E, sem a inoculação de qualquer tipo de microrganismos, apresentou um maior valor da condutividade elétrica, diferenciando-se dos restantes tratamentos, provavelmente pelas alterações do microbioma do solo no momento da esterilização. A diminuição de microrganismos benéficos no substrato devido à esterilização pode ter limitado a absorção ou metabolização de alguns iões, fazendo com que estes permanecessem em maior quantidade no substrato. Por exemplo, a ausência de FMA, importante para a absorção de P, pode ter resultado nos valores mais elevados de condutividade elétrica observados na modalidade E. Da mesma forma, a redução de microrganismos com

capacidade de metabolizar e incorporar potássio e outros nutrientes no seu metabolismo, pode ter levado à sua acumulação no substrato esterilizado.



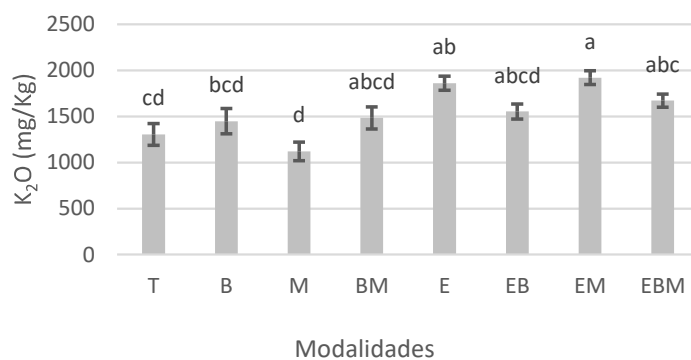
**Figura 33** - Valores da condutividade elétrica (CE dS/m) no substrato das diversas modalidades no final do ensaio. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Relativamente ao fósforo assimilável, como se pode observar pela Figura 34, as modalidades não esterilizadas apresentam valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ), 1457 na modalidade T e 1689 mg/kg na modalidade B. Nas modalidades esterilizadas os valores são significativamente menores e variam entre 1080 em EB e 1323 mg/kg na modalidade E. Os valores de P, assimilável de todas as modalidades apresentam um valor muito alto (Veloso *et al.*, 2022).



**Figura 34** - Valores médios de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> no substrato das diversas modalidades no final do ensaio. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

No potássio assimilável (Figura 35) foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as modalidades. A modalidade com inoculação com FM (EM) apresentou um teor significativamente mais elevado (1921 mg/kg) do que as modalidades B (1449 mg/kg), T (1306 mg/kg) e M (1122 mg/kg). As restantes modalidades apresentaram valores entre 1121 (M) e 1862 mg/kg (E). Em geral não foram encontradas diferenças significativas estas modalidades e as restantes.



**Figura 35** - Valores médios de K assimilável no substrato das diversas modalidades no final do ensaio. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O substrato no final do ensaio apresentava valores tanto de P como de K assimiláveis na classe de fertilidade muito alta ( $> 200$  mg/kg Veloso *et al.*, 2022) em todas as modalidades.

## 6.2. Ensaio em produção com alface

Os resultados relativos ao ensaio em vasos com a alface proveniente do ensaio em viveiro que decorreu durante um mês apresentam-se de seguida.

### 6.2.1. Produção e absorção de nutrientes

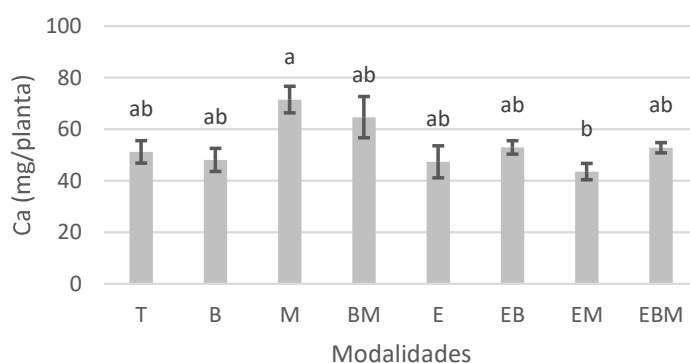
Para a MV aérea (Tabela 2), observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas na modalidade EM, com valor de 31,13 g, inferior às demais.

Para a MS aérea (Tabela 2), não foram verificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre modalidades. Apesar disso, os valores de MS aérea variaram entre 2,59 g na modalidade T e 2,93 g na modalidade BM.

**Tabela 2** - Produção de matéria verde (MV, g/planta) e matéria seca (MS, g/planta) da parte aérea no final do ensaio de produção decorrido nos vasos Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as modalidades pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

MOD	MV aérea (g/planta)	MS aérea (g/planta)
T	34,96 ±2,91 ab	2,59 ±0,18
B	33,56 ±3,08 ab	2,65 ±0,19
M	35,98 ±3,58 ab	2,68 ±0,21
BM	36,91 ±3,44 ab	2,93 ±0,19
E	35,3 ±3,49 ab	2,65 ±0,28
EB	40,19 ±3,93 a	2,91 ±0,21
EM	31,13 ±1,65 b	2,74 ±0,14
EBM	34,94 ±3,02 ab	2,71 ±0,21
Sig.	$p < 0,05$	$p > 0,05$

Relativamente à absorção de nutrientes no ensaio em produção, apenas foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre modalidades na absorção de Ca (Figura 36). Neste caso, a modalidade M (71,53 mg/planta) esteve associada a valores superiores relativamente à modalidade EM (43,59 mg/planta).



**Figura 36** - Aporte de cálcio (mg/kg) por planta nas diferentes modalidades. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Com exceção do Ca, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na absorção de N, P, K e Mg pela planta (Tabela 3). Apesar de não terem sido evidenciadas diferenças significativas entre modalidades nos valores aportados pelas plantas, tanto no N (108,63 mg/planta), P (18,33 mg/planta) e no Mg (13,2 mg/planta), as maiores médias foram registadas na modalidade M. Para os mesmos nutrientes, os valores mais baixos foram registados na modalidade EBM para o N (71,77 mg/planta) e para o Mg (9,39 mg/planta) e na modalidade B para o P (15,58 mg/planta). Por oposição foi na modalidade EBM que foram registados os valores mais altos de K (362,68 mg/planta), sendo neste o valor mais baixo encontrado na modalidade E (291,19 mg/planta)

**Tabela 3** - Valores médios de nutrientes absorvidos por plantas em cada uma das diferentes modalidades. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as modalidades pelo teste de

MOD	N (mg/planta)	P (mg/planta)	K (mg/planta)	Mg (mg/planta)
T	100,94 ±5,56	16,01 ±1,13	295,04 ±33,81	10,7 ±0,78
B	107,86 ±9,59	15,58 ±2,06	317,11 ±33,68	10,95 ±1,15
M	108,63 ±11,5	18,33 ±1,47	315,95 ±52,85	13,2 ±0,77
BM	99,53 ±7,11	17,69 ±2,05	357,73 ±23,67	12,32 ±1,69
E	87,14 ±11,54	16,03 ±1,62	291,19 ±32,98	9,59 ±1,16
EB	95,21 ±8,97	15,98 ±1,56	356,64 ±19,45	10,96 ±0,87
EM	78,66 ±7,22	16,41 ±0,38	321,61 ±9,73	9,74 ±0,86
EBM	71,77 ±7,78	15,73 ±1,83	362,68 ±32,78	9,39 ±0,67
Sig.	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Em síntese, a inoculação de micorrizas em substrato não esterilizado (M) resultou em maior absorção de Ca em comparação à modalidade EM. Para os outros nutrientes avaliados, não houve diferença significativa entre modalidades. Podemos assumir que no ensaio em vasos não houve correlação positiva entre absorção de nutrientes e produção de biomassa. Apesar da maior absorção de N, P e Mg ter ocorrido na modalidade M, a maior produção de MV ocorreu na modalidade EB. Portanto, os resultados sugerem que outros fatores, além da nutrição, foram determinantes para a produção de biomassa no ensaio de produção em vasos.

### 6.2.2. Características físico-químicas do substrato

Os resultados das análises (Tabela 4 e Tabela 5), demonstraram que não existiram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos teores de M.O., P assimilável ( $P_2O_5$ ), P orgânico, P total e Mg. Os valores de M.O. variaram entre 74,1% na modalidade T e 77,0% na modalidade BM. Em relação ao  $P_2O_5$ , a modalidade BM (1223 mg/kg) apresentou o valor mais baixo, enquanto que a modalidade EBM (1456 mg/kg) apresentou o mais alto. Relativamente ao P orgânico, variaram entre 96 e 335 mg/kg, na modalidade B e EB, respetivamente. O P total registou o valor mais baixo na modalidade EB (1039 mg/kg) e o mais elevado em EBM (1170 mg/kg). No Mg, foram registadas variações percentuais entre 0,19% (B, BM e EB) e 0,22% (E e EM) na M.S.

No pH, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a modalidade B (6,19) e EB (6,54). Os dados indicam que as BFA quando inoculadas em substrato esterilizado exerceram uma alteração no pH, tornando-o menos ácido, quando comparado com a o substrato não esterilizado inoculado com as mesmas.

Na C.E, foram evidenciadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), entre a modalidade BM (0,63 dS/m) e as modalidades EM (1,34 dS/m) e EBM (1,37 dS/m) que apresentaram valores mais baixos, sem que existisse diferenças estatísticas entre as duas últimas. Estes valores da CE não evidenciam problemas de salinidade no substrato (Veloso *et al.*, 2022).

No teor de N Total, ocorreram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as modalidades E (0,99 g/kg) e M (0,98 g/kg) que registaram os maiores valores, e a modalidade EM (0,81 g/kg) que apresentou o menor valor.

O teor mais elevado de  $K_2O$  foi de 3963 mg/kg em EM. Com diferenças significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ), as menores concentrações foram evidenciadas nas modalidades EBM (3451 mg/kg), BM (2803 mg/kg) e EB (2731 mg/kg), sem diferenças estatísticas entre estas.

O teor de P inorgânico ocorreu na modalidade M (1057 mg/kg) e foi a que apresentou valores mais elevados. Foram observadas diferenças significativas da anterior ( $p < 0,05$ ), para as modalidades BM (862 mg/kg), E (774 mg/kg), EM (726 mg/kg) e EB (703 mg/kg) e que registaram os valores mais baixos.

Relativamente ao Ca, destacaram-se as modalidades M (4,07 mg/kg), T (4,05 mg/kg) e E (3,99 mg/kg) que estatisticamente demonstraram as maiores médias ( $p < 0,05$ ) na percentagem de Ca no substrato. As modalidades EM (3,37 mg/kg), EB (3,22 mg/kg) e EBM (2,93 mg/kg), estatisticamente semelhantes, apesar de apresentar teores mais baixos que as anteriores, foram estatisticamente superiores à modalidade BM (2,49 mg/kg) que revelou ser a mais baixa de todas.

**Tabela 4** - Valores de pH, condutividade elétrica (CE, dS/m), matéria orgânica (MO g/100g), N total (g/Kg), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O (mg/100g) na matéria seca do substrato nas diversas modalidades no final do ensaio de produção de alface. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as modalidades pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

MOD	pH (H <sub>2</sub> O)	CE (dS/m)	MO (g/100g)	N total (g/kg)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	K <sub>2</sub> O (mg/kg)
T	6,31 ± 0,08 ab	1,09 ± 0,12 ab	74,1 ± 0,9	0,92 ± 0,02 ab	1293 ± 65	2860 ± 64 ab
B	6,19 ± 0,07 b	1,12 ± 0,07 ab	75,1 ± 1,4	0,94 ± 0,00 ab	1347 ± 35	3392 ± 226 ab
M	6,27 ± 0,06 ab	1,18 ± 0,15 ab	74,4 ± 0,4	0,98 ± 0,01 a	1392 ± 52	3295 ± 138 ab
BM	6,38 ± 0,04 ab	0,63 ± 0,06 b	77,0 ± 0,6	0,84 ± 0,01 ab	1223 ± 48	2803 ± 102 b
E	6,46 ± 0,04 ab	1,12 ± 0,07 ab	74,6 ± 0,2	0,99 ± 0,03 a	1386 ± 35	3492 ± 196 ab
EB	6,54 ± 0,05 a	0,86 ± 0,07 ab	76,8 ± 0,4	0,86 ± 0,02 ab	1271 ± 84	2731 ± 79 b
EM	6,31 ± 0,03 ab	1,34 ± 0,09 a	76,4 ± 0,4	0,81 ± 0,02 b	1396 ± 41	3963 ± 130 a
EBM	6,38 ± 0,03 ab	1,37 ± 0,03 a	76,1 ± 0,6	0,83 ± 0,01 ab	1456 ± 28	3451 ± 45 b
Sig.	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$

**Tabela 5** - Valores de P total, orgânico e inorgânico (mg/kg), Ca e Mg (g/100g) na matéria seca observados no substrato dos diversos tratamentos no final do ensaio de produção de alface. Letras diferentes em cada coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as modalidades pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

MOD	P inorg. (mg/kg)	P org. (mg/kg)	P Total (mg/kg)	Ca (% MS)	Mg (% MS)
T	966 ± 26 ab	174 ± 48	1140 ± 35	4,05 ± 0,08 a	0,20 ± 0,00
B	979 ± 48 ab	96 ± 40	1075 ± 38	3,87 ± 0,05 ab	0,19 ± 0,01
M	1057 ± 53 a	104 ± 17	1160 ± 44	4,07 ± 0,11 a	0,20 ± 0,00
BM	862 ± 34 bc	182 ± 55	1044 ± 22	2,49 ± 0,11 (d)	0,19 ± 0,00
E	774 ± 18 c	297 ± 30	1071 ± 32	3,99 ± 0,13 a	0,22 ± 0,01
EB	703 ± 30 c	335 ± 103	1039 ± 73	3,22 ± 0,18 c	0,19 ± 0,00
EM	726 ± 32 c	318 ± 16	1044 ± 46	3,37 ± 0,14 bc	0,22 ± 0,01
EBM	959 ± 31 ab	210 ± 48	1170 ± 56	2,93 ± 0,16 (cd)	0,21 ± 0,01
Sig.	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$

### 6.3. Colonização das raízes por fungos micorrízicos arbusculares

A Tabela 6, mostra que no substrato não esterilizado houve formação de micorrizas em todas as modalidades, observando-se um maior número de hifas nas modalidades M e BM, ainda que sem diferenças significativas entre elas. De igual modo em todas as modalidades esterilizadas se observou a colonização de FMA, mesmo em E e EB, o que indica que a esterilização do substrato não foi eficaz ou que houve contaminação posterior. Também nas modalidades esterilizadas, as modalidades EM e EBM foram as que apresentaram maior n.º de observações de hifas ( $p > 0,05$ ). As Figuras 37 a 40, mostram algumas observações realizadas na avaliação da colonização das raízes por micorrizas.

**Tabela 6** - Média de observações de hifas, vesículas ou arbuscúlos em cada 5 observações nos ensaios em viveiro e em produção. Letras diferentes por cima das colunas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As letras dos grupos homogêneos em maiúsculas, para facilitar a distinção, referem-se ao ensaio em produção e as que se encontram em minúsculas referem-se ao ensaio em viveiro.

MOD	Hifas Viveiro	Hifas Produção	Vesículas Viveiro	Vesículas Produção	Arbuscúlos Viveiro	Arbuscúlos Produção
T	2,8 ±0,3 bc	2,1 ±0,2 B	1,2 ±0,2 a	0,4 ±0,1 A	0,8 ±0,2 a	0,0 ±0,0 B
B	2,8 ±0,3 bc	3,2 ±0,2 AB	0,1 ±0,1 ab	0,3 ±0,1 AB	0,6 ±0,2 a	0,4 ±0,1 A
M	3,0 ±0,2 bc	3,9 ±0,2 A	0,2 ±0,1 ab	0,3 ±0,1 A	0,3 ±0,1 ab	0,1 ±0,1 AB
BM	3,3 ±0,3 ab	2,2 ±0,2 B	0,3 ±0,1 ab	0,1 ±0,0 AB	0,1 ±0,1 b	0,0 ±0,0 B
E	1,9 ±0,3 bc	2,3 ±0,2 B	1,3 ±0,3 a	0,3 ±0,1 AB	0,0 ±0,0 b	0,2 ±0,1 AB
EB	1,4 ±0,3 c	0,4 ±0,1 C	0,0 ±0,0 b	0,0 ±0,0 B	0,0 ±0,0 b	0,0 ±0,0 B
EM	3,5 ±0,3 ab	1,9 ±0,2 B	0,4 ±0,1 ab	0,1 ±0,0 AB	0,0 ±0,0 b	0,0 ±0,0 B
EBM	4,4 ±0,2 a	2,5 ±0,2 B	0,7 ±0,2 ab	0,1 ±0,1 AB	0,1 ±0,1 b	0,4 ±0,1 AB
Sig.	( $p < 0,05$ )	( $p < 0,05$ )	( $p < 0,05$ )	( $p < 0,05$ )	( $p < 0,05$ )	( $p < 0,05$ )

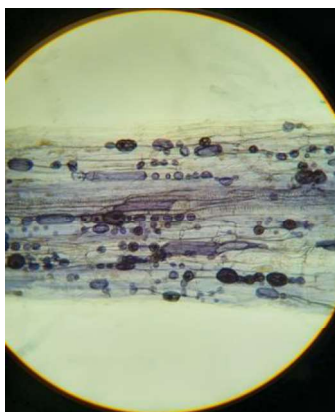
A observação dos resultados obtidos relativamente à observação de vesículas e arbuscúlos sugere que os FMA nativos terão uma cinética de colonização diferente que os FMA inoculados. Na verdade, as modalidades testemunha dos dois grupos (T e E), tendencialmente apresentam valores superiores de vesículas e arbuscúlos relativamente às restantes modalidades.

O desenvolvimento da colonização por FMA em produção foi semelhante ao observado em viveiro nas diferentes modalidades. A modalidade que apresentou um maior índice de colonização por hifas ao longo do tempo observado foi a M, que passou de um valor médio de 3,0 para 3,9. A modalidade que registou o maior valor médio de hifas foi a modalidade M (substrato não esterilizado + Micorrizas arbusculares) com 3,9 observações por segmento radicular, sendo significativamente superior às restantes modalidades. Por outro lado, a modalidade EB (substrato esterilizado + Bactérias fixadoras de azoto) apresentou o menor valor médio, com apenas 0,4 hifas por segmento, indicando uma diferença significativa em relação às modalidades T e M.

Apesar de não ser espectável a observação de hifas na modalidade EB, as mesmas foram observadas.

Já nas vesículas, as modalidades T (substrato não esterilizado) e M (substrato não esterilizado + Micorrizas arbusculares) destacaram-se com os valores mais altos, 0,4 e 0,3 observações em cada 5, respetivamente. A modalidade EB mostrou a menor presença de vesículas, com um valor significativamente inferior de apenas 0,1 por segmento radicular. Apesar de não ser espectável a observação de hifas na modalidade EB, as mesmas foram observadas. Nos arbúsculos, aqui, a modalidade B (substrato não esterilizado + Bactérias fixadoras de azoto) apresentou a maior contagem, com  $0,4 \pm 0,1$  arbúsculos por segmento, sendo significativamente superior às modalidades T, BM e EM que não apresentaram arbúsculos.

Apesar de não ser expectável a observação de hifas na modalidade EB, as mesmas foram observadas. As modalidades, T, BM e EM, apresentaram uma ausência total de arbúsculos.



**Figura 37** - Observação de micorrizas (ampliação 100X). Presença de vesículas e arbúsculos no segmento radicular.



**Figura 38** - Observação de micorrizas (ampliação 100X) Presença de hifas externas no segmento radicular.



**Figura 39** - Observação de micorrizas (ampliação 100X) Presença exclusiva de vesículas no segmento radicular.



**Figura 40** - Observação de micorrizas (ampliação 100X) Presença de hifas no interior do córtex radicular.

## 7. Discussão

Os resultados obtidos no ensaio viveiro, revelaram a influência significativa da esterilização do substrato e da inoculação com BFA e/ou FMA em diversos parâmetros agronômicos.

No ensaio em viveiro, é possível verificar que a esterilização influenciou de forma negativa a precocidade das plantas. As modalidades em substrato não esterilizado tiveram uma maior precocidade (em relação ao aparecimento da 4ª folha verdadeira), quando comparadas com as modalidades esterilizadas. Tal como descrito por Chaparro *et al.* (2012), o microbioma natural do solo mostrou ser um fator de extrema relevância no crescimento e desenvolvimento das plantas, não conseguindo ser substituído apenas pelos microrganismos adicionados ao substrato.

Segundo Kumar *et al.* (2019) e Sumbul *et al.* (2020) a presença de BFA promove o crescimento das plantas. Esse mesmo resultado ficou evidenciado no ensaio em viveiro. O crescimento das alfaces em viveiro evidenciou que a fertilização com BFA em substrato não esterilizado foi a modalidade que induziu maior precocidade da 4ª folha expandida, fase de colocação das plantas no mercado. No nosso ensaio também se constatou que a inoculação de FMA em substrato não esterilizado induziu a uma maior precocidade em relação às demais modalidades com exceção da modalidade B que apresentou maior precocidade à 4ª folha. Este resultado também foi encontrado por Lowenfels (2021), que constatou que a presença de micorrizas induz um aumento no crescimento das plantas.

Antes de se discutir os resultados obtidos relativamente à produção de biomassa radicular, biomassa verde e seca, e a absorção de nutrientes, deve-se entender que todos estes parâmetros se encontram interrelacionados, uma vez que um maior desenvolvimento radicular encontra-se tipicamente associado a uma maior absorção de nutrientes que, por sua vez, potenciam o crescimento da parte aérea. Por conseguinte, um maior desenvolvimento da parte aérea relaciona-se com uma maior produção de fotoassimilados, igualmente importantes para o crescimento e desenvolvimento radicular.

Tanto na produção de biomassa aérea (verde como seca) como na produção de biomassa seca de raízes das plantas do ensaio em viveiro, é possível verificar que a esterilização, prejudicou negativamente estes três parâmetros. Apesar de não existirem diferenças significativas entre modalidades realizadas em substrato não esterilizado, as modalidades inoculadas isoladamente com FMA e BFA, foram as que demonstraram maiores taxas de produção. Em contrapartida, ainda que sem diferenças significativas das anteriores, estes microrganismos quando inoculados em conjunto demonstraram originar menores produções, sugerindo antagonismo ou um maior dispêndio de energia por parte da planta quando estes microrganismos são aplicados em conjunto.

Para além de afetar a negativamente a precocidade, a esterilização teve também um efeito negativo nos parâmetros de crescimento da alface. Estes foram significativamente menores nas modalidades com substrato esterilizado. Observou-se que a inoculação de FMA e/ou BFA não conseguiu reverter esta limitação resultante da esterilização.

Relativamente à produção de MS da raiz, o resultado obtido sugere que num ambiente esterilizado a inoculação das micorrizas tende a aumentar a biomassa radicular. O efeito positivo das micorrizas sobre a biomassa radical foi também observado em ensaios realizados por Oliveira *et al.* (2021).

No substrato não esterilizado, foram as modalidades com inoculação de FMA (modalidade M) que apresentaram uma absorção significativamente superior de N, P, K, Ca e Mg, bem como nos teores foliares de N, P, Ca e Mg. Isto evidencia o efeito benéfico das FMA na nutrição da alface quando aplicadas em substrato nativo. Os FMA potencializam a absorção de nutrientes pelas raízes via hifas externas, aumentando a superfície de contato das raízes com o substrato bem como o volume de substrato explorado (Angulo-Bejarano, Puente-Rivera e Cruz-Ortega, 2021; Cheng e Baumgartner, 2004).

Já no substrato previamente esterilizado, a inoculação de FMA e/ou BFA (modalidades E, EB, EM e EBM) não resultou em aumento consistente na absorção de nutrientes ou parâmetros de crescimento em relação à testemunha esterilizada (E). Pelo contrário, inoculação de FMA em substrato esterilizado (modalidade EM) frequentemente apresentou os menores valores de absorção e teores foliares de nutrientes.

Uma vez mais o resultado sugere que a esterilização eliminou microrganismos essenciais para o estabelecimento e funcionamento eficiente da simbiose micorrízica, anulando o efeito benéfico das FMA quando introduzidas nesse ambiente.

Em ensaios realizados por Behl *et al.* (2003) com inoculação conjunta de BFA (*Azotobacter chroococcum*) e FMA (*Glomus fasciculatum*) em trigo (*Triticum spp.*) observou-se que estes microrganismos originaram maior absorção de nutrientes (em especial azoto e cálcio) e por consequência estiveram associados a um maior crescimento das plantas. Os dados obtidos no nosso ensaio demonstraram resultados opostos, observando-se que os tratamentos com maior absorção de nutrientes em substrato não esterilizado, foram aqueles que incluíam a inoculação de BFA e FMA isoladamente. Esta inoculação isolada resultou numa maior taxa de absorção de nutrientes, quando comparada com a testemunha (modalidade T), o que poderá justificar a precocidade observada nas modalidades B e M. De facto, o N é fundamental nas primeiras fases do desenvolvimento das plantas, uma vez que ele entra na constituição dos ácidos nucleicos e dos aminoácidos enquanto o cálcio é essencial para o desenvolvimento das paredes e membranas celulares (White, 2003). Deste modo, uma melhor nutrição das plantas, em particular nestes nutrientes, poderá estar relacionada com o aumento da precocidade observada.

Segundo Ortas (2003), os FMA também a tendem a aumentar a absorção de K pelas plantas. Os resultados deste ensaio mostram que a inoculação isolada de FMA em substrato esterilizado (modalidade EM) esteve associada a teores mais elevados de K no substrato quando comparada com a inoculação das mesmas em substrato não esterilizado (modalidade M), o que parece significar que nessas modalidades houve uma menor absorção de K o que é confirmado pelos valores da absorção. Uma das funções de K na planta é a de promover o carregamento do floema com os fotoassimilados necessários para o crescimento da planta. Assim, as modalidades com maior absorção de K também estiveram associadas a valores mais elevados de produção. Relativamente ao P ele é um macronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Wang, Chen e Wu, 2021), e desempenha papéis cruciais na estrutura e função de macromoléculas, na regulação da carga elétrica de membranas e na produção de energia metabólica nas células (Marschner e Marschner, 2012). Relativamente ao P assimilável, a esterilização esteve geralmente associada a uma menor disponibilidade deste nutriente. Este resultado ressalva e vai em linha com o descrito por Wu *et al.* (2019) salientando a importância dos microrganismos no fornecimento deste às plantas. Segundo este, o microbioma nativo desempenha um papel fulcral na disponibilização do P do solo.

Globalmente verificou-se que o aumento no crescimento das plantas nas modalidades não esterilizadas dever-se-á a uma absorção superior de N, P, K, Ca e Mg, apesar de em diversos casos tal não se ter traduzido em diferenças estatisticamente significativas.

Como já referido quando se inocularam simultaneamente BFA e FMA a absorção de nutrientes decresceu o que está relacionado com a produção de menor biomassa aérea e radicular, como observado nestas modalidades.

A análise dos fragmentos radiculares revelou a colonização dos FMA em todas as modalidades mesmo nas esterilizadas e sem inoculação. Este facto poderia indicar ineficácia da esterilização. No entanto os resultados obtidos no desenvolvimento da alface, indicam diferenças claras entre as modalidades onde o substrato não foi esterilizado e as restantes, por exemplo, na produção de biomassa, o que dá a entender que a esterilização terá inativado pelo menos uma parte significativa do microbioma do substrato. Outras razões possíveis para a presença de FMA poderão ser a existência no substrato de fungos/espores mais resistentes à inativação ou uma posterior contaminação.

Os elevados teores de nutrientes no substrato utilizado, em particular de N, P, K, Ca e Mg, poderão também relacionar-se com o facto de não se ter observado um efeito claro das inoculações com FMA e BFA. De facto, os FMA associam-se a uma maior absorção de nutrientes pelas plantas, especialmente de P. Como o substrato apresentava já teores bastante elevados de nutrientes, os benefícios da colonização com FMA para a planta foram em grande parte diminuídos. Em alguns casos, a colonização pode até ser prejudicial, uma vez que a planta fornece fotoassimilados ao

fungo sem um acréscimo significativo na absorção de nutrientes. Algo semelhante poderá ter ocorrido com as BFA, pois as análises ao substrato revelaram concentrações elevadas de nutrientes.

No que respeita ao ensaio em produção as diferenças observadas entre modalidades não são tão evidentes como as observadas em viveiro. Ainda assim, a inoculação com FMA em substrato esterilizado associou-se a uma menor produção de MV da parte aérea, especialmente em comparação com a inoculação de BFA no mesmo tipo de substrato. Similarmente, não se observaram diferenças assinaláveis entre modalidades na absorção de nutrientes. A absorção de Ca foi uma exceção a esta tendência, uma vez que a maior absorção deste nutriente ocorreu com a inoculação de FMA em substrato não esterilizado, quando comparada ao esterilizado.

As características físico-químicas do substrato no ensaio de produção não evidenciaram uma tendência clara entre parâmetros e modalidades. Foram encontrados alguns efeitos pontuais, como um aumento de pH associado à inoculação de BFA em substrato esterilizado, e valores mais elevados de pH nas modalidades inoculadas conjuntamente com FMA e BFA em substrato esterilizado, quando comparadas à inoculação conjunta destes dois grupos de microrganismos em substrato não esterilizado. Importa salientar que no ensaio em produção, na modalidade BM verifica-se uma menor CE, que de acordo com Méndez-Cifuentes *et al.* (2023) poderá resultar de uma reduzida disponibilidade de iões no solo devido à interação biológica ou à absorção de nutrientes por parte das plantas. Nesta situação, poderá ter ocorrido uma sinergia entre as micorrizas arbusculares e as bactérias fixadoras de azoto, no que respeita à absorção de nutrientes pelas plantas, quando inoculadas em substrato não esterilizado.

Em resumo, no ensaio em produção os resultados obtidos deverão ser reavaliados com um ensaio no solo uma vez que só assim se pode observar o comportamento das modalidades em condições reais.

## 8. Conclusões

Nos ensaios efetuados, observou-se em geral, um efeito benéfico quer da inoculação com BFA quer com FMA na precocidade, na biomassa e na absorção de nutrientes pela cultura da alface. Uma maior precocidade da alface é relevante na fase de viveiro pois permite, além de uma colocação no mercado mais rápida, uma maior produção por campanha. Dessa forma, seria interessante realizar em complemento um estudo associado ao impacto económico da utilização destes biofertilizantes na fase de viveiro.

Em alguns casos observou-se um efeito negativo da inoculação combinada de BFA e FMA, que poderá ter ocorrido devido à competição por fotoassimilados durante as fases iniciais do desenvolvimento das plantas. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados e prolongados para se compreender os mecanismos por de trás deste aparente antagonismo.

Os ensaios demonstraram também que o microbioma nativo é essencial e insubstituível para a expressão plena do efeito positivo observado pela aplicação destes biofertilizantes na cultura da alface.

O estabelecimento de ensaios em produção em solos com propriedades distintas será fundamental para melhor compreender o papel do microbioma nativo e os efeitos dos biofertilizantes em condições reais.

## 9. Referências bibliográficas

- ABDEL-FATTAH, G. M.; SHABANA, Y. M. - Efficacy of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* in protection of cowpea plants against root rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of Plant Diseases and Protection*.  
ISSN 03408159, 23649968. 109:2 (2002) p. 207–215.
- ADEYEMI, Nurudeen Olatunbosun *et al.* - Alleviation of heavy metal stress by arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Glycine max* (L.) grown in copper, lead and zinc contaminated soils. *Rhizosphere*.  
ISSN 24522198. 18:2021 (2021) p. 100-325.  
doi: 10.1016/j.rhisph.2021.100325.
- ALEXANDRE, Gladys; ROHR, René; BALLY, René - A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. *Applied and Environmental Microbiology Journal*.  
ISSN 0099-2240, 1098-5336. 65:10 (1999) p. 4701–4704.  
doi: 0.1128/AEM.65.10.4701-4704.1999.
- AMNA *et al.* - Differential effects of cadmium and chromium on growth, photosynthetic activity, and metal uptake of *Linum usitatissimum* in association with *Glomus intraradices*. *Environmental Monitoring and Assessment* .  
ISSN 1573-2959. 187:6 (2015) p. 311.  
doi: 10.1007/s10661-015-4557-8.
- ANGULO-BEJARANO, Paola I.; PUENTE-RIVERA, Jonathan; CRUZ-ORTEGA, Rocío - Metal and metalloid toxicity in plants: an overview on molecular aspects. *Plants*.  
ISSN 2223-7747. 10:4 (2021) p. 635.  
doi: 10.3390/plants10040635.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. - Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*.  
ISSN 0940-6360, 1432-1890. 6:6 (1997) p. 457–464.  
doi: 10.1007/s005720050147.
- BARAK, Rina; NUR, I.; OKON, Y. - Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Applied Bacteriology*.  
ISSN 0021-8847. 54:3 (1983) p. 399–403.  
doi: 10.1111/j.1365-2672.1983.tb02634.x.
- BEHIE, Scott W.; BIDOCHKA, Michael J. - Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. *Trends in Plant Science*.  
ISSN 13601385. 19:11 (2014) p. 734–740.  
doi: 10.1016/j.tplants.2014.06.007.
- BEHL, Rishi *et al.* - Effect of dual inoculation of var. mycorrhiza and *Azotobacter chroococcum* on above flag leaf characters in wheat. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 49:2003 p. 25–31.  
doi: 10.1080/03650340301497.

- BIERMANN, Brenda; LINDERMAN, R. G. - Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum . *New Phytologist*.  
ISSN 0028-646X, 1469-8137. 95:1 (1983) p. 97–105.  
doi: 10.1111/j.1469-8137.1983.tb03472.x.
- BISHOP, P. E.; JARLENSKI, D. M.; HETHERINGTON, D. R. - Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.  
ISSN 0027-8424, 1091-6490. 77:12 (1980) p. 7342–7346.  
doi:10.1073/pnas.77.12.7342.
- BISSET, K. A.; HALE, C. M. F. - The cytology and life-cycle of *Azotobacter chroococcum*.  
*Journal of General Microbiology*.  
ISSN 0022-1287. 8:3 (1953) p. 442–448.  
doi: 10.1099/00221287-8-3-442.
- BONFANTE, Paola; GENRE, Andrea - Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*.  
ISSN 2041-1723. 1:1 (2010) p. 48.  
doi: 10.1038/ncomms1046.
- BONFANTE, Paola; PEROTTO, Silvia - Tansley Review N<sup>o</sup>. 82. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist*.  
ISSN 0028-646X, 1469-8137. 130:1 (1995) p. 3–21.  
doi: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb01810.x.
- BONFANTE-FASOLO, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; MARTINENGO, L. - Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the ericaceae: iv. comparison of infection by *Pezizella ericae* in host and non-host plants. *New Phytologist*.  
ISSN 0028-646X, 1469-8137. 98:2 (1984) p. 329–333.  
doi: 10.1111/j.1469-8137.1984.tb02743.x.
- BRUNDRETT, M. C.; PICHÉ, Y.; PETERSON, R. L. - A developmental study of the early stages in vesicular–arbuscular mycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany*.  
ISSN 0008-4026. 63:2 (1985) p. 184–194.  
doi: 10.1139/b85-021.
- BRUNDRETT, Mark - Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*.  
ISSN 1464-7931, 1469-185X. 79:3 (2004) p. 473–495.  
doi: 10.1017/S1464793103006316.
- BRUNDRETT, Mark - Mycorrhizal associations: arbuscular mycorrhizas, atualizado em 2008. (Consultado a 1 de outubro de 2023). Disponível em:  
URL:<https://mycorrhizas.info/vam.html#stages>>.

- BUCHER, Marcel - Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *The New phytologist*. England. ISSN 0028-646X. 173:1 (2007) p. 11–26. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01935.x.
- BÜCKING, Heike; LIEPOLD, Elliot; AMBILWADE Prashant. The Role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and the Regulatory Mechanisms Underlying These Transport Processes. *Plant Science*, ed. Nabin Kumar Dhal e Sudam Charan Sahu. Rijeka: IntechOpen, (2012). (Consultado a 30 de setembro de 2023). Disponível em: <https://doi.org/10.5772/52570>.
- BUENO, D. J.; SILVA, J. O. - FUNGI | The Fungal Hypha. *Encyclopedia of Food Microbiology* : Elsevier, 2014. (Consultado a 26 novembro de 2023). Disponível em: URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300001324>>. ISBN 978-0-12-384733-1. p. 11–19.
- CABELLO, P. *et al.* - Nitrogen cycle. *Encyclopedia of Microbiology*: Elsevier, 2009 (Consultado a 3 outubro de 2023). Disponível em: URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123739445000559>>. ISBN 978-0-12-373944-5. p. 299–321.
- CAKMAK, I. *et al.* - Phytosiderophore release in bread and durum wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Plant and Soil*. ISSN 0032079X, 15735036. 180:2 (1996) p. 183–189.
- CAMILIOS-NETO, Doumit *et al.* - Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. *BMC Genomics*. 15:2014). doi: 10.1186/1471-2164-15-378.
- CASSÁN, Fabricio *et al.* - Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*. ISSN 0178-2762, 1432-0789. 56:4 (2020) p. 461–479. doi: 10.1007/s00374-020-01463-y.
- CASTRO, Cândida P. S.; DOMINGUES, Luis C. S. P. - Produção de hortícolas em modo de produção biológico. (Consultado a 19 dezembro de 2023). Disponível em: URL:<https://agricultura.azores.gov.pt/wp-content/uploads/2022/01/manual-fichas-de-cultura-mpbpdf.pdf>>.
- CASTRO-SOWINSKI, Susana - *Microbial models: from environmental to industrial sustainability*. New York, NY : Springer. Berlin, 2016. ISBN 978-981-10-2554-9.

- CAVAGNARO, T. R. *et al.* - Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *Journal - New Phytologist*.  
ISSN 0028-646X, 1469-8137. 151:2 (2001) p. 469–475.  
doi: 10.1046/j.0028-646x.2001.00191.x.
- CHAPARRO, Jacqueline M. *et al.* - Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*.  
ISSN 0178-2762, 1432-0789. 48:5 (2012) p. 489–499.  
doi: 10.1007/s00374-012-0691-4.
- CHENG, Xiaomei; BAUMGARTNER, Kendra - Arbuscular mycorrhizal fungi-mediated nitrogen transfer from vineyard cover crops to grapevines. *Biology and Fertility of Soils*.  
ISSN 0178-2762, 1432-0789. 40:6 (2004) p. 406–412.  
doi: 10.1007/s00374-004-0797-4.
- DASGUPTA, Debmalya *et al.* - Microbial biofertilizers: Recent trends and future outlook. recent advancement in microbial biotechnology: Elsevier, 2021 (Consultado a 29 de novembro de 2023). Disponível em:  
URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012822098600001X>>.  
ISBN 978-0-12-822098-6. p. 1–26.
- DE ANDRADE, Luana Alves *et al.* - Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. *microorganisms*.  
ISSN 2076-2607. 11:4 (2023) p. 1088.  
doi: 10.3390/microorganisms11041088.
- DÉLANO-FRIER, John Paul; TEJEDA-SARTORIUS, Miriam - Unraveling the network: Novel developments in the understanding of signaling and nutrient exchange mechanisms in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Signaling & Behavior*.  
ISSN 1559-2324. 3:11 (2008) p. 936–944.  
doi: 10.4161/psb.6789.
- DICKSON, S.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E. - Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? *Mycorrhiza*.  
ISSN 0940-6360, 1432-1890. 17:5 (2007) p. 375–393.  
doi: 10.1007/s00572-007-0130-9.
- EBBISA, Addisu - Arbuscular mycorrhizal fungi (amf) in optimizing nutrient bioavailability and reducing agrochemicals for maintaining sustainable agroecosystems. Nogueira De Sousa, Rodrigo (Ed.) - *Arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture - New Insights: IntechOpen*, 2023 (Consultado a 3 janeiro de 2024). Disponível em:  
URL:<https://www.intechopen.com/chapters/83426>>.  
ISBN 978-1-83768-089-4
- EL-RAMADY, Hassan *et al.* - Nanofertilizers vs. Biofertilizers: New Insights. *Environment, Biodiversity and Soil Security*.  
ISSN 2536-9423. 2:1 (2018) p. 40–50.  
doi: 10.21608/jenvbs.2018.3880.1029.

- FAHAD, Shah *et al.* (EDS.) - Biofertilizers for sustainable soil management. First edition ed. Boca Raton, FL : CRC Press, 2024. ISBN 978-1-00-328623-3.
- FREY-KLETT, Pascale *et al.* - Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *Journal - New Phytologist*. ISSN 0028646X, 14698137. 165:1 (2005) p. 317–328.
- GARCÍA-GARRIDO, José Manuel; OCAMPO, Juan A. - Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of experimental botany*. England. ISSN 0022-0957. 53:373 (2002) p. 1377–1386.
- GRANT, Cynthia *et al.* - Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. *Canadian Journal of Plant Science*. ISSN 0008-4220, 1918-1833. 85:1 (2005) p. 3–14. doi: 10.4141/P03-182.
- HAI, Luu Thi Thuy; HUYNH, Nga; LE, Linh Truc - Potential Benefits Of Arbuscular Mycorrhiza Fungi In Sustainable Agricultural Cultivation. *TRA VINH UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE*; ISSN: 2815-6099. 12:46 (2022) p. 82–93. doi: 10.35382/tvujs.1.46.2022.865.
- HAKEEM, Khalid Rehman *et al.* - Nitrate and nitrogen oxides: Sources, health effects and their remediation. De Voogt, Pim (Ed.) - *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Vol. 242: Springer International Publishing, 2016 (Consultado a 3 outubro de 2023). Disponível em: URL:[http://link.springer.com/10.1007/398\\_2016\\_11](http://link.springer.com/10.1007/398_2016_11)>. ISBN 978-3-319-51242-6v. 242. p. 183–217.
- HALBLEIB, Cale M.; LUDDEN, Paul W. - Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of Nutrition*. ISSN 00223166. 130:5 (2000) p. 1081–1084. doi: 10.1093/jn/130.5.1081.
- HAMMER, Edith C. *et al.* - A mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability: P accumulation in an AMF under low plant C status. *FEMS Microbiology Ecology*. ISSN 01686496. 76:2 (2011) p. 236–244. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01043.x.
- HARIS, Mohammad *et al.* - Application of microbial inoculants as an alternative to chemical products for decomposition of organic wastes. *Microbial Inoculants*: Elsevier, 2023 (Consultado a 2 outubro de 2023). Disponível em: URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323990431000062>>. ISBN 978-0-323-99043-1. p. 29–52.

- HARRISON, Maria J. - Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*.  
ISSN 0066-4227, 1545-3251. 59:1 (2005) p. 19–42.  
doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123749.
- HEINRICH, D.; HESS, D. - Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. *Canadian Journal of Microbiology*.  
ISSN 0008-4166, 1480-3275. 31:1 (1985) p. 26–31.  
doi: 10.1139/m85-007.
- HELBER, Nicole *et al.* - A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp. is crucial for the symbiotic relationship with plants. *The Plant Cell*.  
ISSN 1532-298X, 1040-4651. 23:10 (2011) p. 3812–3823.  
doi: 10.1105/tpc.111.089813.
- HOFFMANN, Lúcia Vieira; LUCENA, Valeska Silva - Embrapa - Para Entender Micorrizas Arbusculares, 2006. Disponível em:  
URL:<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/276480/1/DOC156.pdf>>.
- IMAM, M. K.; BADAWEY, F. H. - Response of three potato cultivars to inoculation with *Azotobacter*. *Potato Research*.  
ISSN 0014-3065, 1871-4528. 21:1 (1978) p. 1–8.  
doi: 10.1007/BF02362251.
- IPMA - Fichas Climatológicas 1981-2010, atualizado em 2023. (Consultado a 5 de outubro de 2023). Disponível em: URL:<https://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/1981-2010/normalclimate8110.jsp>>.
- JAKOBSEN, Iver; HAMMER, Edith C. - Nutrient dynamics in arbuscular mycorrhizal networks. HORTON, THOMAS R. (Ed.) - *Mycorrhizal Networks Ecological Studies*. Dordrecht : Springer; Netherlands, 2015 (Consultado a 30 de setembro de 2023). Disponível em: URL:[http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-7395-9\\_4](http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-7395-9_4)>.  
ISBN 978-94-017-7394-2v. 224. p. 91–131.
- JAVOID, Arshad - Arbuscular mycorrhizal mediated nutrition in plants. *Journal of Plant Nutrition*.  
ISSN 0190-4167, 1532-4087. 32:10 (2009) p. 1595–1618.  
doi: 10.1080/01904160903150875.
- JAVOT, Hélène *et al.* - A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.  
ISSN 0027-8424, 1091-6490. 104:5 (2007) p. 1720–1725.  
doi: 10.1073/pnas.0608136104.

- JOERGER, Rolf D.; BISHOP, Paul E.; EVANS, Harold J. - Bacterial alternative nitrogen fixation systems. *Critical Reviews in Microbiology*.  
ISSN 0045-6454. 16:1 (1988) p. 1–14.  
doi: 10.3109/10408418809104465.
- JOHNSON, N. C.; GRAHAM, J. H.; SMITH, F. A. - Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *Journal - New Phytologist*.  
ISSN 0028-646X, 1469-8137. 135:4 (1997) p. 575–585.  
doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00729.x.
- JUAREZ, Jesus; FERNANDEZ, Felix - United States Patent Application Publication, atualizado a 21 junho de 2018. (Consultado a 14 dezembro de 2023). Disponível em:  
URL:<https://patentimages.storage.googleapis.com/5d/a2/21/629f65a9575961/US20180168167A1.pdf>>.
- KAEWCHAI, Saithong; SOYTONG, Kasem; HYDE, Kevin - Mycofungicides and fungal biofertilizers. *Reviews, Critiques and New Ideas, Fungal Diversity*. 38:2009 p. 25–50.
- KHAN, Amir *et al.* - Biofertilizers: a microbial-assisted strategy to improve plant growth and soil health. Em *Advanced Microbial Techniques in Agriculture, Environment, and Health Management* : Elsevier, 2023 (Consultado a 29 de novembro de 2023). Disponível em:  
URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323916431000077>>.  
ISBN 978-0-323-91643-1. p. 97–118.
- KIERS, E. Toby *et al.* - Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science*.  
ISSN 0036-8075, 1095-9203. 333:6044 (2011) p. 880–882.  
doi: 10.1126/science.1208473.
- KOTTEK, Markus *et al.* - World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*.  
ISSN 0941-2948. 15:3 (2006) p. 259–263.  
doi: 10.1127/0941-2948/2006/0130.
- KOUR, Divjot *et al.* - Beneficial microbiomes for bioremediation of diverse contaminated environments for environmental sustainability: present status and future challenges. *Environmental Science and Pollution Research*.  
ISSN 0944-1344, 1614-7499. 28:20 (2021) p. 24917–24939.  
doi: 10.1007/s11356-021-13252-7.
- KRAEPIEL, A. M. L. *et al.* - Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *BioMetals*.  
ISSN 0966-0844, 1572-8773. 22:4 (2009) p. 573–581.  
doi: 10.1007/s10534-009-9222-7.

- KUMAR, Vijay *et al.* - Azotobacter: A Plant Growth Promoting Rhizobacteria a Biofertilizer for Wheat Crop. *Journal of Biological and Chemical Chronicles*. ISSN 2454-7468. 05:02 (2019) p. 41.
- LAMM, Robert B.; NEYRA, Carlos A. - Characterization and cyst production of azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. *Canadian Journal of Microbiology*. ISSN 0008-4166, 1480-3275. 27:12 (1981) p. 1320–1325. doi: 10.1139/m81-202.
- LAVUDI, Harikrishna Naik *et al.* - Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): an overview for sustainable agriculture and development. Em *Rhizobiome*: Elsevier, 2023 (Consultado a 29 de novembro de 2023). Disponível em: URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780443160301000171>>. ISBN 978-0-443-16030-1. p. 95–125.
- LEE, Eun-Hwa *et al.* - Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Roles in Ecosystems. *Mycobiology*. ISSN 1229-8093, 2092-9323. 41:3 (2013) p. 121–125. doi: 10.5941/MYCO.2013.41.3.121.
- LIANG, Liyan *et al.* - Arbuscular Mycorrhizal Fungi Alleviate Low Phosphorus Stress in Maize Genotypes with Contrasting Root Systems. *Plants*. ISSN 2223-7747. 11:22 (2022) p. 3105. doi: 10.3390/plants11223105.
- LOWENFELS, Jeff - Teaming with fungi: the organic grower's guide to mycorrhizae. Fifth printing ed. Portland, Oregon : Timber Press, 2021. ISBN 978-1-60469-729-2.
- MAEDA, Daisuke *et al.* - Knockdown of an Arbuscular Mycorrhiza-inducible Phosphate Transporter Gene of *Lotus japonicus* Suppresses Mutualistic Symbiosis. *Plant and Cell Physiology*. ISSN 1471-9053, 0032-0781. 47:7 (2006) p. 807–817. doi: 10.1093/pcp/pcj069.
- MARSCHNER, Horst; MARSCHNER, Petra (EDS.) - Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed ed. London ; Waltham, MA : Elsevier/Academic Press, 2012. ISBN 978-0-12-384905-2.
- MARSCHNER, Petra - Rhizosphere Biology. Em *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*: Elsevier, 2012 (Consultado a 26 de novembro de 2023). Disponível em: URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849052000157>>. ISBN 978-0-12-384905-2. p. 369–388.

MCROSE, Darcy L. *et al.* - Quorum sensing and iron regulate a two-for-one siderophore gene cluster in *Vibrio harveyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. ISSN 0027-8424, 1091-6490. 115:29 (2018) p. 7581–7586. doi: 10.1073/pnas.1805791115.

MEIER, Uwe - Growth stages of mono- and dicotyledonous plants: BBCH Monograph. 2018). doi: 10.5073/20180906-074619.

MÉNDEZ-CIFUENTES, Ariel *et al.* - Nutrient Solution Electrical Conductivity Affects Yield and Growth of Sub-Irrigated Tomatoes. *Horticulturae*. ISSN 2311-7524. 9:7 (2023) p. 826. doi: 10.3390/horticulturae9070826.

MOORE, David - Ectendomycorrhizas, atual. 2021. (Consultado a 29 de setembro de 2023). Disponível em: URL:[https://www.davidmoore.org.uk/assets/mostly\\_mycology/diane\\_howarth/ectendo.htm](https://www.davidmoore.org.uk/assets/mostly_mycology/diane_howarth/ectendo.htm)>.

NAIR, Ajay *et al.* - Arbuscular mycorrhizae, a treasured symbiont to agriculture. Em *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*: Elsevier, 2022 (Consultado a 5 de dezembro de 2023). Disponível em: URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323851633000119>>. ISBN 978-0-323-85163-3. p. 45–62.

NANDURI, Kameswara *et al.* - Handbooks for Genebanks No. 8 Seed Handling in Genebanks

NONGTHOMBAM, Jenita *et al.* - *Azotobacter*: A Complete Review. Vol 10 (6):2021) p. 72–79.

OKON, Yaacov; ITZIGSOHN, Robin - The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnology Advances*. ISSN 07349750. 13:3 (1995) p. 415–424. doi: 10.1016/0734-9750(95)02004-M.

OLIVEIRA, Thales *et al.* - O PAPEL DAS MICORRIZAS NA MITIGAÇÃO DOS ESTRESSES ABIÓTICOS EM PLANTAS CULTIVADAS. ISBN 9786557068168. p. 180–189.

ORTAS, Ibrahim - Effect of Selected Mycorrhizal Inoculation on Phosphorus Sustainability in Sterile and Non-sterile Soils in the Harran Plain in South Anatolia. *Journal of Plant Nutrition*. ISSN 0190-4167, 1532-4087. 26:1 (2003) p. 1–17. doi: 10.1081/PLN-120016494.

PARK, Sunghun - Explant preparation. Em *Plant Tissue Culture* (Em linha). (S.l.) : Elsevier, 2021 (Consultado a 8 de outubro de 2023). Disponível em:  
URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128211205000134>>.  
ISBN 978-0-12-821120-5. p. 47–53.

PAŚMIONKA, Iwona Beata; BULSKI, Karol; BOLIGŁOWA, Elżbieta - The Participation of Microbiota in the Transformation of Nitrogen Compounds in the Soil—A Review. *Agronomy*.  
ISSN 2073-4395. 11:5 (2021) p. 977.  
doi: 10.3390/agronomy11050977.

PATREZE, Camila; MOREIRA, Milene; TSAI, Siu - Advances in Molecular Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Phylum Glomeromycota) in Forest Ecosystems. ISBN 978-953-51-0202-1. p. 53–80.

REDDY, Chilekampalli A.; SARAVANAN, Ramu S. - Polymicrobial Multi-functional Approach for Enhancement of Crop Productivity. Em *Advances in Applied Microbiology*: Elsevier, 2013 (Consultado a 26 de novembro de 2023). Disponível em:  
URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012407679200003X>>.  
ISBN 978-0-12-407679-2v. 82. p. 53–113.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I. - Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *Journal of Bacteriology*.  
ISSN 0021-9193, 1098-5530. 162:1 (1985) p. 190–195.  
doi: 10.1128/jb.162.1.190-195.1985.

REZAEI-CHIYANEH, Esmail *et al.* - Biostimulants alleviate water deficit stress and enhance essential oil productivity: a case study with savory. *Scientific Reports*.  
ISSN 2045-2322. 13:1 (2023) p. 720.  
doi: 10.1038/s41598-022-27338-w.

RILLIG, Matthias C.; STEINBERG, Peter D. - Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biology and Biochemistry*.  
ISSN 00380717. 34:9 (2002) p. 1371–1374.  
doi: 10.1016/S0038-0717(02)00060-3.

RITIKA, Bhattacharjee; UTPAL, Dey - Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. *African Journal of Microbiology Research*.  
ISSN 1996-0808. 8:24 (2014) p. 2332–2343.  
doi: 10.5897/AJMR2013.6374.

- RÖMHELD, Volker - Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiologia Plantarum*.  
ISSN 0031-9317, 1399-3054. 70:2 (1987) p. 231–234.  
doi: 10.1111/j.1399-3054.1987.tb06137.x.
- ROSHANI, Amir Khan, et al. - Development of Potential Microbial Consortia and their Assessment on Wheat (*Triticum aestivum*) Seed Germination. *Environment and Ecology*.  
ISSN 0970-0420 38:1 (2020) p. 6-16.
- SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Micorriza arbuscular: papel, funcionamento e aplicação da simbiose. Em: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Ed.). *Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica/Seropédica: Embrapa Agrobiologia, cap. 5. (2005) p. 101-149.
- SETHI, Santosh Kumar; ADHIKARY, Siba Prasad - Azotobacter: a plant growth-promoting rhizobacteria used as biofertilizer. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*. 6:1 (2012) p. 68–74.
- SHEIKH-ASSADI, Morteza *et al.* - Arbuscular Mycorrhizae Contribute to Growth, Nutrient Uptake, and Ornamental Characteristics of *Statice* (*Limonium sinuatum* (L.) Mill.) Subject to Appropriate Inoculum and Optimal Phosphorus. *Horticulturae*.  
ISSN 2311-7524. 9:5 (2023) p. 564.  
doi: 10.3390/horticulturae9050564.
- SHRESTHA, Sanju *et al.* - Effect of different substrate sterilization methods on performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Journal of Agricultural Science*  
ISSN 2228-4893. 32:1 (2021) p. 127-132.  
doi: 10.15159/JAS.21.03.
- SINGH, Akanksha *et al.* - *Trichoderma*. Em *Biotechnology and Biology of Trichoderma*: Elsevier, 2014 (Consultado a 3 de dezembro de 2023). Disponível em:  
URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444595768000400>>.  
ISBN 978-0-444-59576-8. p. 533–542.
- SINGH, Devendra *et al.* - *Biofertilizers: Mechanisms and application*. Em *Biofertilizers*: Elsevier, 2021 (Consultado a 29 de novembro de 2023). Disponível em:  
URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128216675000245>>.  
ISBN 978-0-12-821667-5. p. 151–166.
- SMITH, Sally E.; READ, David - *The symbionts forming arbuscular mycorrhizas*. Em *Mycorrhizal Symbiosis*: Elsevier, 2008 (Consultado a 3 de dezembro de 2023). Disponível em:  
URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123705266500039>>.  
ISBN 978-0-12-370526-6. p. 13–41.

- SMITH, Sally E.; READ, David J. - Mycorrhizal Symbiosis: Elsevier Science, 2010.  
ISBN 978-0-08-055934-6.
- SMITH, Sally E.; SMITH, F. Andrew - Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia*.  
ISSN 0027-5514, 1557-2536. 104:1 (2012) p. 1–13.  
doi: 10.3852/11-229.
- STEENHOUDT, Oda; VANDERLEYDEN, Jos - Azospirillum , a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*.  
ISSN 1574-6976. 24:4 (2000) p. 487–506.  
doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x.
- SUMBUL, Aisha *et al.* - Azotobacter: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi Journal of Biological Sciences*.  
ISSN 1319562X. 27:12 (2020) p. 3634–3640.  
doi: 10.1016/j.sjbs.2020.08.004.
- TAL, Sara; OKON, Yaacov - Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Microbiology*.  
ISSN 0008-4166, 1480-3275. 31:7 (1985) p. 608–613.  
doi: 10.1139/m85-115.
- TAO, Ke; KELLY, Simon; RADUTOIU, Simona - Microbial associations enabling nitrogen acquisition in plants. *Current Opinion in Microbiology*.  
ISSN 13695274. 49:2019) p. 83–89.  
doi: 10.1016/j.mib.2019.10.005.
- TAYLOR, Andy F. S.; ALEXANDER, Ian - The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist*.  
ISSN 0269915X. 19:3 (2005) p. 102–112.  
doi: 10.1017/S0269-915X(05)00303-4.
- TROIAN, Rogério Fraga *et al.* - Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnology Letters*.  
ISSN 0141-5492, 1573-6776. 36:10 (2014) p. 2095–2101.  
doi: 10.1007/s10529-014-1583-5.

TYAGI, Aditya; MAMAN, Shalma; TYAGI, Swati - Biostimulants signaling under Cd, Al, As, Zn, and Fe toxicity. Em *Biostimulants in Alleviation of Metal Toxicity in Plants*: Elsevier, 2023 (Consultado a 17 de dezembro de 2023). Disponível em: URL:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323996006000207>>. ISBN 978-0-323-99600-6. p. 449–467.

VAN DE BROEK, Ann; LAMBRECHT, Mark; VANDERLEYDEN, Jos - Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*. ISSN 1350-0872, 1465-2080. 144:9 (1998) p. 2599–2606. doi: 10.1099/00221287-144-9-2599.

VARMA, Ajit; PRASAD, Ram; TUTEJA, Narendra - Mycorrhiza - Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration: Springer International Publishing, 2017 (Consultado a 25 de julho de 2023). Disponível em: URL:<https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-68867-1>>. ISBN 978-3-319-68866-4.

VELOSO, Anabela *et al.* - Manual de fertilização das culturas. 3a ed. (Consultado a 25 de outubro de 2023). Disponível em: URL:[https://www.iniav.pt/images/publicacoes/livros-manuais/Manual\\_Fertilizacao\\_das\\_culturas.pdf](https://www.iniav.pt/images/publicacoes/livros-manuais/Manual_Fertilizacao_das_culturas.pdf)>.

VERA-GARCÍA, Sara-Luz *et al.* - Enhancing Phosphorus and Nitrogen Uptake in Maize Crops with Food Industry Biosolids and *Azotobacter nigrificans*. *Plants*. ISSN 2223-7747. 12:17 (2023) p. 3052. doi: 10.3390/plants12173052.

Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche Y. - Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied And Environmental Microbiology*. 64:12 (1998) p. 5004–5007. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.5004-5007.1998>

WANG, Liyang *et al.* - Ensuring future food security and resource sustainability: insights into the rhizosphere. *iScience*. ISSN 25890042. 25:4 (2022) p. 104-168. doi: 10.1016/j.isci.2022.104168.

WANG, Yi; CHEN, Yi-Fang; WU, Wei-Hua - Potassium and phosphorus transport and signaling in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*. ISSN 1672-9072, 1744-7909. 63:1 (2021) p. 34–52. doi: 10.1111/jipb.13053.

- WANI, Sartaj A. *et al.* - *Azotobacter chroococcum* – A Potential Biofertilizer in Agriculture: An Overview. *Soil Science: Agricultural and Environmental Prospectives*. (2016) p. 333.
- WHITE, P. J. - Calcium in Plants. *Annals of Botany*.  
ISSN 0305-7364, 1095-8290. 92:4 (2003) p. 487–511.  
doi: 10.1093/aob/mcg164.
- WU, Fei *et al.* - Effects of Phosphate Solubilizing Bacteria on the Growth, Photosynthesis, and Nutrient Uptake of *Camellia oleifera* Abel. *Forests*. .  
ISSN 1999-4907. 10:4 (2019) p. 348.  
doi: 10.3390/f10040348.
- ZAEFARIAN, Faezeh *et al.* - Impact of Mycorrhizae Formation on the Phosphorus and Heavy-Metal Uptake of Alfalfa. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. .  
ISSN 0010-3624, 1532-2416. 44:8 (2013) p. 1340–1352.  
doi: 10.1080/00103624.2012.756505.
- ZHANG, Wantong *et al.* - Mycorrhizal Inoculation Enhances Nutrient Absorption and Induces Insect-Resistant Defense of *Elymus nutans*. *Frontiers in Plant Science*.  
ISSN 1664-462X. 13:2022) p. 898-969.  
doi: 10.3389/fpls.2022.898969.
- ZHAO, YanYan *et al.* - Arbuscular mycorrhizal fungi and production of secondary metabolites in medicinal plants. *Mycorrhiza*.  
ISSN 0940-6360, 1432-1890. 32:3–4 (2022) p. 221–256.  
doi: 10.1007/s00572-022-01079-0.
- ZHULIN, I. B. *et al.* - Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*.  
ISSN 0021-9193, 1098-5530. 178:17 (1996) p. 5199–5204.  
doi: 10.1128/jb.178.17.5199-5204.1996.
- ZHULIN, I. B.; ARMITAGE, J. P. - Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*.  
ISSN 0021-9193, 1098-5530. 175:4 (1993) p. 952–958.  
doi: 10.1128/jb.175.4.952-958.1993.