

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Explorando *legacy* P com plantas de cobertura a longo prazo: resposta das culturas, dinâmica do P e estequiometria enzimática do solo

João Henrique Silva da Luz

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

Piracicaba
2023

João Henrique Silva da Luz
Engenheiro Agrônomo

Explorando *legacy P* com plantas de cobertura a longo prazo: resposta das culturas,
dinâmica do P e estequiometria enzimática do solo
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **PAULO SERGIO PAVINATO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Luz, João Henrique Silva da

Explorando *legacy P* com plantas de cobertura a longo prazo: resposta das culturas, dinâmica do P e estequiometria enzimática do solo / João Henrique Silva da Luz. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

94 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Fontes fosfatadas 2. Frações de P 3. Especificação de P 4. Enzimas do solo I. 5. Sustentabilidade agrícola I. Título

DEDICO

Aos meus pais, **João M. Luz** e **Carmem G. Silva**,
aos meu avôs, especialmente **João Gomes** (*in
memoriam*), a minhas irmãs, **M^a Fernanda** e
Geovana Luz, e aos meus afilhados
João Arthur e **M^a Luiza Luz**.

AGRADECIMENTOS

- À **Deus** pela vida e ensinamentos.

- Aos familiares. Ao meu pai, **João M. Luz** e mãe **Carmem G. Silva**, as minhas irmãs **Geovana Luz** e **M^a Fernanda Luz**, aos afilhados **João Arthur** e **M^a Luiza**, avôs maternos **Maria Eliene** e **João Gomes** (*in memoriam*) e paternos **Getúlio Luz** e **Ana Vindoura**, e a todos os meus tios, tias e primos por todo amor, orações, pelo conforto nas horas dolorosas e por serem fonte de inspiração. Esta conquista também é de vocês!

- Aos meus amigos: Alexandre Hugo, Tulio Luz, Gilson Moura, Thalia Luz, Nathalia Maria, Nelson Passos, Hyara Lima, Hanrara Pires, Evandro Ribeiro, Bruno Di Napolis e Leydinara Silva que, apesar da distância, sempre se esforçaram para estarem presentes ao longo dessa caminhada.

- Aos amigos que fiz nesta jornada em Piracicaba. Em especial **Arnaldo Souza**, **Caroline Jardim**, Luana Barbosa <3, Deyvison Soares, André Espinoza, Rosemery Santos, Luiza Brumr e Ianna Barros.

- Ao meu supervisor Prof. **Paulo S. Pavinato** pela orientação, paciência, confiança e amizade.

- Aos colaboradores deste projeto de pesquisa, em especial Prof. **Laercio Sartor** e ao **Grupo de Estudos em Fertilidade e Adubação** (GEFA) e seus membros: Augusto Leão, Mauricio Cunha, Lenir Gotz, Ana Paula, Thais Soares, Ádila Natália, Pedro Ronzani, Caroline, Wellington, Guilherme, Irshad Ali, Gislaine, Rolf, Pedro, Juliano, Murilo, Felipe, Nicole e Cecília.

- À **Universidade de São Paulo** (USP), em especial ao **Departamento de Ciência do Solo** e o **Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição Plantas** (PPGSNP) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) pela oportunidade, infraestrutura laboratorial e recursos humanos altamente qualificados. Em especial aos docentes que auxiliaram neste processo e aos técnicos laboratoriais que ajudaram a “carregar o piano” (Luiz Silva (*in memoriam*), Ednéia Mondoni, Denise Mescolotti, Luiz Fernando, Eleusa, Anderson, Aline Vitti e Nivanda).

- À Embrapa Instrumentação (São Carlos), na pessoa do Prof. **Luiz Colnago**, a técnica **Viviane Soares** e Prof. Thiago Morais que facilitaram a análise de ressonância magnética nuclear para especiação química de P.

- À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo financiamento da bolsa de estudos de mestrado (N^o: [2021/08396-7](#)) e auxílio à pesquisa regular (N^o: [2019/25314-4](#)) que foram fundamentais para realização deste projeto de pesquisa.

- À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

Sou muito grato!

*“Faça o teu melhor, na condição que tem,
enquanto não tem condições melhores,
para fazer melhor ainda!”*

— Mário Sérgio Cortella

*“Somos todos aprendizes de um ofício que nunca
ninguém se torna mestre!”*

— Ernest Hemingway

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
Referências	14
2. RENDIMENTO DE MILHO-SOJA ASSOCIADOS A PLANTAS DE COBERTURA E FONTES DE FOSFATO A LONGO-PRAZO: CINCO SAFRAS EXPLORANDO O LEGACY P DO SOLO	17
Resumo	17
Abstract	17
2.1. Introdução	18
2.2. Material e Métodos	19
2.2.1. Desenho experimental	20
2.2.2. Avaliações de produção	22
2.2.3. Análises de planta e solo	22
2.3. Análises estatísticas	23
2.4. Resultados	24
2.4.1. Produção de grãos	24
2.4.2. Biomassa e absorção de nutrientes pelas plantas de cobertura	28
2.4.3. Atributos químicos do solo	32
2.4.4. Comparações multivariadas da 7 ^o e 12 ^o safra	34
2.5. Discussão	36
2.6. Conclusão	37
Referências	38
Material suplementar	41
3. EXPLORANDO O <i>LEGACY P</i> COM PLANTAS DE COBERTURA: DINÂMICA DO P A LONGO-PRAZO EM SOLO ARGILOSO TROPICAL	53
Resumo	53
Abstract	53
3.1. Introdução	54
3.2. Material e Métodos	55
3.2.1. Desenho experimental	56

3.2.2. Amostragem de solo	57
3.2.3. Frações de P e especiação da solução ^{31}P em RMN.....	57
3.2.4. Indicadores microbiológicos	58
3.2.5. Análise estatística	58
3.3. Resultados e Discussão.....	59
3.3.1. Frações de P.....	59
3.3.2. Especiação da solução de ^{31}P em RMN.....	62
3.3.3. Indicadores microbianos.....	64
3.3.4. Análise de componentes principais	66
3.4. Conclusão	67
Referências	68
Material suplementar	71
4. ESTEQUIOMETRIA ENZIMÁTICA E AQUISIÇÃO DE C, N E P MICROBIANO SÃO MODULADOS POR PLANTAS DE COBERTURA SOB MANEJO QUE EXPLORA O <i>LEGACY P</i> DO SOLO.....	75
Resumo.....	75
Abstract.....	xx
4.1. Introdução.....	76
4.2. Material e Métodos.....	77
4.2.1. Desenho experimental	77
4.2.2. Amostragem de solo e planta	78
4.2.3. Biomassa microbiana e atividades enzimáticas do solo	78
4.2.4. Estimativa da limitação metabólica microbiana.....	78
4.2.5. Análise estatística	80
4.3. Resultados e Discussão.....	80
4.3.1. Biomassa e atividade microbiana do solo.....	80
4.3.2. Modelagem da estequiometria enzimática	83
4.4. Conclusão	87
Referências	87
Material suplementar	90

RESUMO

Explorando *legacy* P com plantas de cobertura a longo prazo: resposta das culturas, dinâmica do P e estequiometria enzimática do solo

O uso frequente de fertilizantes fosfatados resulta no acúmulo de P nos solos (também conhecido como *legacy* P) em formas orgânicas (Po) e inorgânicas (Pi). No entanto, grande parte destas formas de P não estão disponíveis para absorção pelas culturas comerciais. O cultivo de plantas de cobertura, na entressafra, pode aumentar a disponibilidade de P para as culturas comerciais, por possuírem diferentes estratégias de aquisição de P que podem acessar o *legacy* P do solo. O objetivo foi investigar o efeito das plantas de cobertura explorando o *legacy* P associadas à fontes fosfatadas no rendimento de grãos, ciclagem de nutrientes, atributos químicos, dinâmica de P e estequiometria enzimática do solo a longo prazo, com sete safras sob adubação fosfatada e cinco safras explorando o *legacy* P. Os tratamentos foram compostos por cinco plantas de cobertura de inverno e um pousio, associadas com duas fontes fosfatadas (superfosfato simples (SPS), fosfato natural (FN)) e sem entradas de P (Sem-P). As plantas de cobertura impulsionaram as respostas em produtividade de grãos em safras com e sem aplicação de P, no entanto as maiores respostas foram explorando o *legacy* P. Nesta última, tremoço-branco com fosfato natural aumentou em 25% a produtividade de grãos. A maior absorção de P pelas plantas de cobertura ocorreu com nabo forrageiro e aveia preta, para N foi tremoço-branco, nabo forrageiro e aveia preta, no entanto, o K, no geral, foi dependente da produção de biomassa das plantas de cobertura. As plantas de cobertura reduziram o P-resina e K trocável do solo, especialmente com fosfato natural, mas isto não refletiu diretamente em perdas de produtividade de grãos. Os reservatórios de P lábil foram compostos, em média, de 83, 69 e 52% por Po lábil para Sem-P, SPS e FN, respectivamente. Em Po lábil houve diferença das plantas de cobertura apenas em Sem-P (12 anos explorando *legacy* P), onde ervilhaca, azevém e tremoço foram inferiores ao pousio em 24, 17 e 14%. Na atividade da fosfatase ácida, o tremoço-branco foi superior às outras plantas de cobertura e se destacou na fonte SPS, sendo 46% superior ao pousio. O efeito das plantas de cobertura na dinâmica de P foi modulado principalmente pelas fontes fosfatadas devido as diferenças no P total aplicado. Nabo forrageiro e aveia preta foram as espécies que mais esgotaram as frações de P menos lábeis. As plantas de coberturas regularam a homeostase microbiana prevista por estequiometria enzimática em cenários que exploram o *legacy* P, no entanto, esta resposta pode não ser observada conforme o modelo aplicado. Sempre ocorreu limitação de C pela microbiota, embora nabo forrageiro, aveia preta e centeio reduziram esta limitação. Mesmo sobre alto teor de P disponível, ervilhaca manteve a homeostase de N/P e tremoço sempre favoreceu a limitação de P, com estímulos a atividade enzimática de P-aquisição. Isto não ocorreu para gramíneas, onde o gradiente de P disponível favoreceu limitação de N, semelhante os pousios.

Palavras-chave: Fontes fosfatadas, Frações de P, Especificação de P, Atividade enzimática, Sustentabilidade agrícola

ABSTRACT

Exploring legacy P with cover crops in long-term: change in grain yield, P dynamics and soil enzymatic stoichiometry

The frequent use of phosphate fertilizers may result in the accumulation of P in soils (also known as legacy P) in organic (Po) and inorganic (Pi) forms. However, most of these forms of P are not available for absorption by cash crops. The cultivation of cover crops, in the off-season, can increase the availability of P for commercial crops because they have different P acquisition strategies that can access the soil legacy P. The objective was to investigate the effect of cover crops associated with phosphate sources on grain yield, nutrient cycling, chemical attributes, P dynamics and soil enzymatic stoichiometry in the long-term, with seven crops under phosphate fertilization and five crops exploring legacy P. The treatments were composed of five winter cover crops and one fallow, associated with two phosphate sources (simple superphosphate (SSP) and rock phosphate (RP)) and without the P inputs (Nil-P). The cover crops boosted the responses in grain yield in years with and without P application. However, it was superior in exploring legacy P. In the latter, white lupin with rock phosphate increased grain yield by 25%. The highest p uptake by the cover crops occurred with fodder radish and black oat, for N, it was white-lupin, fodder radish and black oat. However, in general, K depended on the biomass production of the cover crops. The cover crops reduced soil P-resin and K⁺, especially with rock phosphate, but this did not directly reflect grain yield losses. The cover crops increased agricultural sustainability by promoting increasing grain yields (soybean or corn) with or without P inputs in the system, in addition to having increased nutrient cycling and exploiting the legacy P. On average, the labile P pools were 83, 69, and 52% by labile Po for Nil-P, SSP, and RP, respectively. In labile Po there was a difference of cover plants only in Nil-P (12 years exploring legacy P), common vetch, ryegrass, and white lupin were lower than 24, 17, and 14% to the fallow. In the activity of acid phosphatase, white lupin was superior to the other cover plants and stood out in the SSP source, with 46% higher than fallow. Phosphate sources mainly modulated the effect of the cover crops on P dynamics due to differences in the total P applied. Fodder radish and black oat were the species that most exhausted these fractions of P loss labile. The cover crops regulated the microbial homeostasis predicted by enzyme stoichiometry in legacy P scenarios, and this response may be flawed according to the applied model. There has always been C limitation by the microbiota, although fodder radish, black oats, and rye have reduced this limitation. Even on high available P content, common vetch maintained N/P homeostasis and white lupin always favored P limitation, with stimuli to P-acquisition enzymatic activity. This did not occur for grasses, where the available P gradient favored N limitation, similar to fallows.

Keywords: Phosphate sources, P fractions, P speciation, enzymatic activity, Agricultural sustainability

1. INTRODUÇÃO GERAL

Fósforo é um componente essencial do ATP (Adenosina Trifosfato), logo ATP é a moeda biosférica do metabolismo animal e vegetal (Smil, 2003). Este nutriente não é o mais requerido pelas plantas, porém, é o que mais limita a produção agrícola e dos ecossistemas terrestres nos trópicos (Weil & Brady, 2017). Isto o torna nutriente-chave para o futuro da segurança alimentar-energética-hídrica, com consequências diretas sobre o desenvolvimento socioeconômico mundial (Cordell & White, 2014; Lun et al., 2021).

Sua gestão é crucial para atingir as metas da ODS2 (fome zero e agricultura sustentável), ODS6 (água limpa e saneamento), ODS14 (vida abaixo da água) dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas (Langhans et al., 2022). Porém, o gerenciamento de P é um paradoxo entre excessos e limitações (o primeiro pode provocar eutrofização e o último a redução da produção primária), além de ser um recurso finito, não substituível e geograficamente restrito (Cordell & White, 2014).

Em solos agrícolas são aplicados fertilizantes fosfatados anualmente para suprir as deficiências de P, além de manter ou intensificar os rendimentos das culturas (Mogollón et al., 2021; Withers et al., 2018). Porém, ocorre baixa eficiência do uso de P pelas culturas agrícolas (Lambers, 2022) devido ao P do fertilizante ter alta afinidade para precipitar com cátions como Fe^{3+} , Al^{3+} e Ca^{2+} (Fig. 1), bem como ser adsorvido nas superfícies carregadas positivamente no solo, como nos oxihidróxidos de Fe e Al, nos sítios positivos da matéria orgânica e nas bordas dos filossilicatos (Weil & Brady, 2017). Consequentemente, grandes quantidades de fertilizantes são aplicadas para atingir os níveis críticos de P requeridos pelas plantas (Doydora et al., 2020).

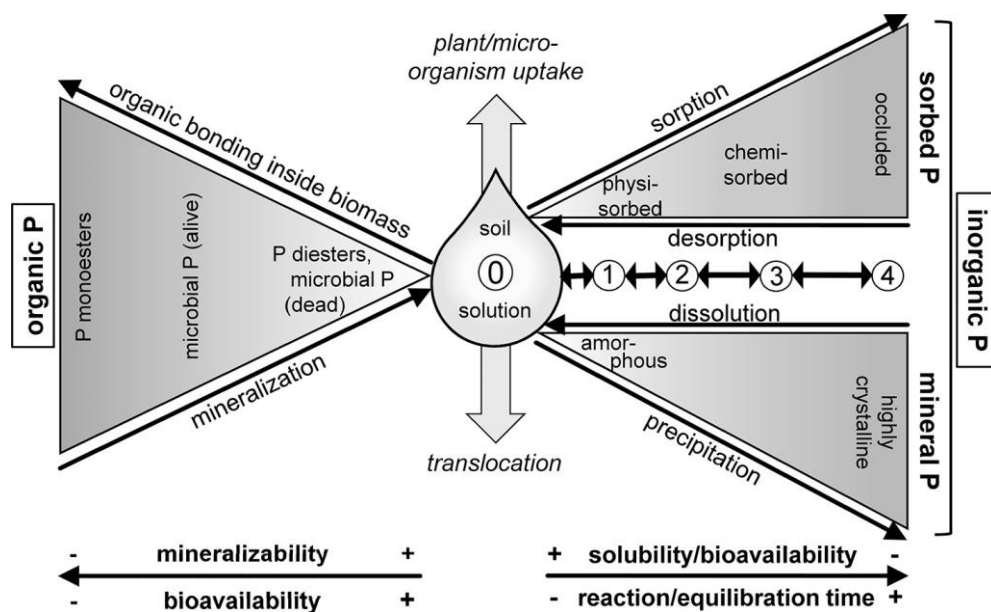


Figura 1. Principais frações de P e suas inter-relações no solo. Adaptado de Weihrauch & Opp (2018).

A aplicação de P em quantidades maiores que requerido pelas plantas resulta na acumulação de P no solo ao longo das safras agrícolas (também chamado P-residual, ou atualmente *legacy P*). Ou seja, as entradas de P menos o P exportado via grãos (Oliveira-Filho & Pereira, 2020; Pavinato et al., 2020). Uma forma de promover o uso mais eficiente deste nutriente, que na maioria das culturas é <30% (Lun et al., 2021; Pavinato et al., 2021), é a adoção de manejo que promova a depleção do *legacy P* (Doydora et al., 2020), redução da adsorção e aumento da dessorção de P do solo (Vermeiren et al., 2022), pelo aumento das estratégias de aquisição/absorção de P pelas plantas (ver Fig. 1) (Lambers, 2022; Mogollón et al., 2021; Soltangheisi et al., 2020).

As plantas de cobertura podem alterar a dinâmica das transformações do P de forma benéfica, maximizando o uso de P no solo (Lambers, 2022; Rheinheimer et al., 2019). Estas possuem mecanismos bioquímicos, fisiológicos e estruturais que podem explorar frações de P menos lábeis do solo (Hallama et al., 2019). Isto inclui: adaptação da morfologia radicular, associações micorrízicas e modificações bioquímicas da rizosfera através da exsudação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, fosfatases, fitases e prótons (Fig. 2) (Lambers, 2022).

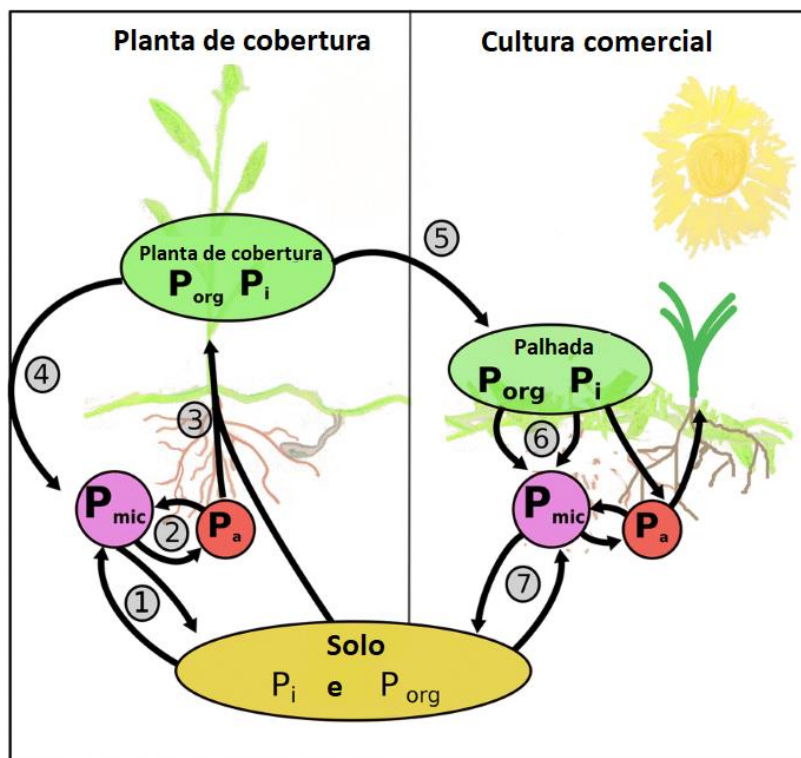


Figura 2. Modelo das vias de transferência de fósforo e processos microbianos vegetais que afetam a disponibilidade de P por plantas de cobertura. Adaptado de Hallama et al. (2019).

A figura 2 ilustra o modelo do mecanismo mais aceito de como as plantas de cobertura interfere na dinâmica de P para as culturas comerciais. Segundo Hallama et al. (2019) são eles: 1) as frações de P do solo de vários graus de labilidade são solubilizados e/ou mineralizados e são

imobilizados na biomassa microbiana; 2) a biomassa microbiana libera P na solução do solo que 3) acaba na planta via raiz ou absorção micorrízica; 4) as raízes liberam rizodépósitos que moldam a comunidade microbiana, eventualmente levando ao aumento da mineração de P; 5) o P armazenado na biomassa da cultura de cobertura é transferido para a cultura comercial através dos resíduos da planta de cobertura, que são decompostos pela comunidade microbiana do solo; 6) a comunidade microbiana do solo na safra comercial pode aumentar capacidade de extrair P do solo; A comunidade microbiana do solo (ou seja, fungos micorrízicos) na safra da cultura principal, reforçada pelas culturas de cobertura, pode possuir uma capacidade aumentada de extrair P para a cultura principal (7).

Além disto, foi demonstrado que as plantas de cobertura favorecem o aumento da diversidade e funcionalidade do microbioma (Kim et al., 2020), e isto aumenta a ciclagem dos nutrientes, devido maiores atividades enzimáticas de aquisição de nutrientes pela microbiota (Curtright & Tiemann, 2021). Como as enzimas extracelulares do solo são principalmente de origem microbiana, a atividade enzimática está intimamente ligada à biomassa e principalmente às características funcionais da fração ativa da comunidade microbiana (Fig. 3) (Sokot et al., 2022).

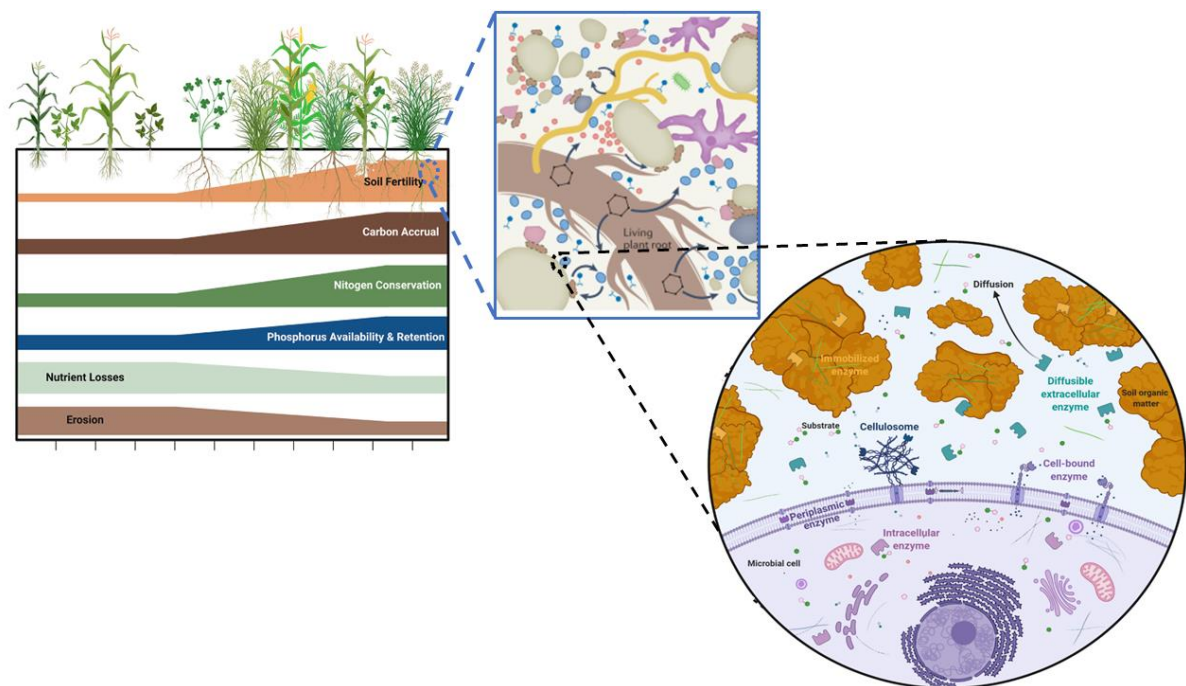


Figura 3. Benefícios nos atributos do solo promovido pela adoção de plantas de cobertura na entressafra de culturas comerciais e distribuição de exoenzimas no solo. Adaptado de Mosier et al. (2021), Sokol et al. (2022) e Fanin et al. (2022).

A estequiometria enzimática revelou ser eficiente em prever limitações de nutrientes para o metabolismo microbiano em ecossistemas naturais (Allen & Gillooly, 2009; Moorhead et al., 2016; Sinsabaugh et al., 2009). Desta forma, estequiometria enzimática pode ser uma ferramenta

para prever facilitação ou competição por nutrientes em solos agrícolas, embora tenha sido pouco aplicada em agroecossistemas.

Desta forma, testamos as hipóteses que as (i) plantas de cobertura favorecem o aumento de produtividade e modificam a dinâmica do fósforo no solo. (ii) Essas modificações estão associadas com modulação da estequiometria enzimática microbiana do solo.

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o efeito das plantas de cobertura associadas com fontes fosfatadas a longo prazo explorando o *legacy* P. No primeiro capítulo foram investigadas as respostas nos rendimentos de grãos, ciclagem de nutrientes e atributos químicos do solo após 12 safras de cultivo com plantas de cobertura e fontes fosfatadas, as últimas cinco safras explorando o *legacy* P. O segundo capítulo foi focado na dinâmica de P, com uso das técnicas de fracionamento sequencial, especiação química com ressonância magnética nuclear (^{31}P RNM) e indicadores de ciclagem de P do solo-planta. Por fim, o terceiro capítulo investigou o efeito das plantas cobertura em direcionar a estequiometria enzimática em cenários que exploram o *legacy* P do solo, com uso de modelagem para prever limitações de nutrientes para o metabolismo microbiano.

Referências

- Allen, A. P., & Gillooly, J. F. (2009). Towards an integration of ecological stoichiometry and the metabolic theory of ecology to better understand nutrient cycling. *Ecology Letters*, 12(5), 369–384. <https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2009.01302.X>
- Cordell, D., & White, S. (2014). Life's bottleneck: Sustaining the world's phosphorus for a food secure future. *Annual Review of Environment and Resources*, 39(1), 161–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-010213-113300>
- Curtright, A. J., & Tiemann, L. K. (2021). Intercropping increases soil extracellular enzyme activity: A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 319, 107489. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2021.107489>
- Doydora, S., Gatiboni, L., Grieger, K., Hesterberg, D., Jones, J. L., McLamore, E. S., Peters, R., Sozzani, R., Van den Broeck, L., & Duckworth, O. W. (2020). Accessing Legacy Phosphorus in Soils. *Soil Systems*, 4(4), 74. <https://doi.org/10.3390/SOILSYSTEMS4040074>

- Fanin, N., Mooshammer, M., Sauvadet, M., Meng, C., Alvarez, G., Bernard, L., Bertrand, I., Blagodatskaya, E., Bon, L., Fontaine, S., Niu, S., Lashermes, G., Maxwell, T. L., Weintraub, M. N., Wingate, L., Moorhead, D., & Nottingham, A. T. (2022). Soil enzymes in response to climate warming: Mechanisms and feedbacks. *Functional Ecology*, 36(6), 1378–1395. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14027>
- Hallama, M., Pekrun, C., Lambers, H., & Kandeler, E. (2019). Hidden miners – the roles of cover crops and soil microorganisms in phosphorus cycling through agroecosystems. *Plant and Soil*, 434(1–2), 7–45. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3810-7>
- Kim, N., Zabaloy, M. C., Guan, K., & Villamil, M. B. (2020). Do cover crops benefit soil microbiome? A meta-analysis of current research. *Soil Biology and Biochemistry*, 142, 107701. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2019.107701>
- Lambers, H. (2022). Phosphorus Acquisition and Utilization in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 73(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102720-125738>
- Langhans, C., Beusen, A. H. W., Mogollón, J. M., & Bouwman, A. F. (2022). Phosphorus for Sustainable Development Goal target of doubling smallholder productivity. *Nature Sustainability*, 5(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00794-4>
- Lun, F., Sardans, J., Sun, D., Xiao, X., Liu, M., Li, Z., Wang, C., Hu, Q., Tang, J., Ciais, P., Janssens, I. A., Obersteiner, M., & Peñuelas, J. (2021). Influences of international agricultural trade on the global phosphorus cycle and its associated issues. *Global Environmental Change*, 69, 102282. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2021.102282>
- Mogollón, J. M., Bouwman, A. F., Beusen, A. H. W., Lassaletta, L., van Grinsven, H. J. M., & Westhoek, H. (2021). More efficient phosphorus use can avoid cropland expansion. *Nature Food*, 2(7), 509–518. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00303-y>
- Moorhead, D. L., Sinsabaugh, R. L., Hill, B. H., & Weintraub, M. N. (2016). Vector analysis of ecoenzyme activities reveal constraints on coupled C, N and P dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 93, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2015.10.019>
- Mosier, S., Córdova, S. C., & Robertson, G. P. (2021). Restoring Soil Fertility on Degraded Lands to Meet Food, Fuel, and Climate Security Needs via Perennialization. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 356. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2021.706142/BIBTEX>
- Oliveira-Filho, J. de S., & Pereira, M. G. (2020). Analyzing the research on phosphorus fractions and phosphorus legacy in soil: a bibliometric analysis. *Journal of Soils and Sediments*, 20(9), 3394–3405. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02669-1>

- Pavinato, P. S., Cherubin, M. R., Soltangheisi, A., Rocha, G. C., Chadwick, D. R., & Jones, D. L. (2020). Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72302-1>
- Pavinato, P. S., Soltangheisi, A., Rocha, G. C., & Cherubin, M. R. (2021). Acúmulo de fósforo no solo em áreas agrícolas no Brasil: diagnóstico atual e potencialidades futuras. *Nutrição de Plantas Ciências e Tecnologia*, 9(1), 1–9.
- Rheinheimer, D. dos S., Fornari, M. R., Bastos, M. C., Fernandes, G., Santanna, M. A., Calegari, A., dos Santos Canalli, L. B., Caner, L., Labanowski, J., & Tiecher, T. (2019). Phosphorus distribution after three decades of different soil management and cover crops in subtropical region. *Soil and Tillage Research*, 192, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.04.018>
- Sinsabaugh, R. L., Hill, B. H., & Follstad Shah, J. J. (2009). Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature* 2009 462:7274, 462(7274), 795–798. <https://doi.org/10.1038/nature08632>
- Smil, V. (2003). PHOSPHORUS IN THE ENVIRONMENT: Natural Flows and Human Interferences. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Energy.25.1.53>, 25, 53–88. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ENERGY.25.1.53>
- Soltangheisi, A., Teles, A. P. B., Sartor, L. R., & Pavinato, P. S. (2020). Cover cropping may alter legacy phosphorus dynamics under long-term fertilizer addition. *Frontiers in Environmental Science*, 8, 13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00013>
- Vermeiren, C., Kerckhof, P., Reheul, D., & Smolders, E. (2022). Increasing soil organic carbon content can enhance the long-term availability of phosphorus in agricultural soils. *European Journal of Soil Science*, 73(1), e13191. <https://doi.org/10.1111/EJSS.13191>
- Weil, R. R., & Brady, N. C. (2017). *The nature and properties of soils* (15th ed., Vol. 1). Pearson .
- Withers, P. J. A., Rodrigues, M., Soltangheisi, A., De Carvalho, T. S., Guilherme, L. R. G., Benites, V. D. M., Gatiboni, L. C., De Sousa, D. M. G., Nunes, R. D. S., Rosolem, C. A., Andreote, F. D., Oliveira, A. De, Coutinho, E. L. M., & Pavinato, P. S. (2018). Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20887-z>

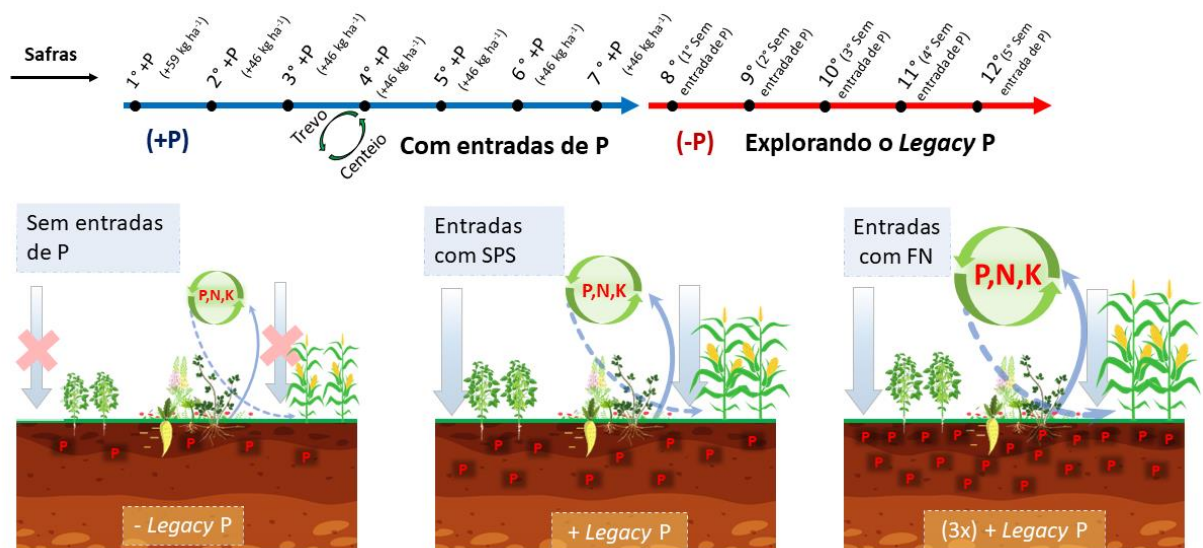
2. RENDIMENTO DE MILHO-SOJA ASSOCIADOS A PLANTAS DE COBERTURA E FONTES DE FOSFATO A LONGO-PRAZO: CINCO SAFRAS EXPLORANDO O LEGACY P DO SOLO

Resumo

Plantas de coberturas favorecem o cultivo das culturas comerciais, mas grande parte dos estudos não são em condições de campo a longo prazo e a capacidade de promover a sustentabilidade explorando o *legacy P* do solo permanece pouco explorada. Foi conduzido um ensaio de campo em solo argiloso tropical (sul do Brasil) onde foram aplicados sucessivamente em setes safras 46 kg ha^{-1} de P solúvel (via superfosfato simples ou fosfato natural) associados com plantas de coberturas nas entressafras das culturas comerciais (soja ou milho). Além disto, foram conduzidas mais cinco safras em seguida sem aplicação de P, com a finalidade de explorar o *legacy P* do solo. Nas 12 safras foram avaliados a produtividade das culturas principais, biomassa e ciclagem de N, P e K pelas plantas de cobertura. No solo, em 2015 (7° safra) e 2020 (12° e 5° safra explorando o *legacy P*) foram determinados: P-resina, MO, pH e K trocável do solo. As plantas de cobertura impulsionaram as respostas em produtividade de grãos em anos com e sem aplicação de P, no entanto, foi superior explorando o *legacy P*. Nesta última, tremoço-branco com fosfato natural aumentou em 25% a produtividade de grãos. A maior absorção de P pelas plantas de cobertura ocorreu com nabo forrageiro e aveia preta, para N foi tremoço-branco, nabo forrageiro e aveia preta, já o K no geral foi dependente da produção de biomassa das plantas de cobertura. As plantas de cobertura reduziram o P-resina e o K trocável do solo, especialmente com fosfato natural, mas isto não refletiu diretamente em perdas de produtividade de grãos. As plantas de cobertura aumentaram a sustentabilidade agrícola por promover ganhos em produtividade de grãos (soja ou milho) com ou sem entradas de P no sistema, além de ter aumentado a ciclagem de nutrientes e explorado o *legacy P* do solo.

Palavras-chave: Agricultura sustentável, Supressão de P, Solos tropicais, Ensaio de longo prazo, Ciclagem de nutrientes.

Gráfico abstract



Abstract

Cover crops favor the cultivation of cash crops, but many of the studies are not in long-term field conditions, and the ability to promote sustainability by exploiting legacy P soil remains little explored. We evaluate a field trial in tropical clay soil (southern Brazil) where 46 kg ha⁻¹ of soluble P (via single superphosphate or rock phosphate) associated with cover crops in the off-season of cash crops (soybean or corn) were applied to seven crops. In addition, five more crops were conducted without P input to explore the soil legacy P. In the 12 harvests, the productivity of the cash crops, biomass, and cycling of N, P, and K by the cover crops were evaluated. In 2015 (7th crop) and 2020 (12th crop and 5th crop exploring legacy P) P-resin, OM, pH, and exchangeable K of the soil were evaluated. The cover crops boosted the responses in grain yield in years with and without P application. However, it was superior in exploring legacy P. In the latter, white lupin with rock phosphate increased grain yield by 25%. The highest P uptake by the cover crops occurred with fodder radish and black oat, for N, it was white-lupin, fodder radish and black oat. However, in general, K depended on the biomass production of the cover crops. The cover crops reduced soil P-resin and exchangeable K, especially with rock phosphate, but this did not directly reflect grain yield losses. The cover crops increased agricultural sustainability by promoting increasing grain yields (soybean or corn) with or without P inputs in the system, in addition to having increased nutrient cycling and exploiting the legacy P.

Keywords: Agricultural sustainability, P suppression, Tropical soil, Long-term experiments, Cycling nutrients.

2.1. Introdução

As próximas décadas serão de grandes desafios globais, e cada vez mais os sistemas de produção agrícolas estarão inseridos como fator-chave para garantir sustentabilidade, segurança climática, alimentar e hídrica, consequentemente favorecendo o desenvolvimento socioeconômico mundial. A gestão de nutrientes nestes sistemas, especialmente P, é crucial para atingir as metas da ODS2 (fome zero e agricultura sustentável), ODS6 (água limpa e saneamento), ODS14 (vida abaixo da água) dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas (Langhans et al., 2022). Porém, o gerenciamento de P é um paradoxo entre excessos e limitações (o primeiro pode provocar eutrofização e o último a redução a produção primária), além de ser um recurso finito, não substituível e geograficamente restrito (Cordell & White, 2014).

Globalmente, as áreas agrícolas em expansão e/ou intensificação, exigem altas taxas de aplicação inicial de fertilizantes fosfatados (especialmente em solos tropicais) para atingir o nível crítico de P (Roy et al., 2016). No caso do Brasil (com solos com baixo P total e alta capacidade de fixar P), estas taxas chegam a ser 25 a 400% maiores em comparação a países da América do Norte e Europa, e isto fragiliza a sustentabilidade da produção agrícolas nos trópicos (Lun et al., 2021; Roy et al., 2016).

Estas quantidades de P maiores que as requeridas pelas plantas resulta na acumulação de P no solo ao longo das safras agrícolas - também chamado de P-residual, ou atualmente “*legacy P*” (Pavinato et al., 2020; Rowe et al., 2015; Roy et al., 2016). Este *legacy P* é acumulado em reservatórios de baixa labilidade e integrá-lo na nutrição das plantas comerciais é um dos principais desafios globais atualmente (Doydora et al., 2020; Oliveira-Filho & Pereira, 2020; Pavinato et al., 2020). Acessar o *legacy P* promoverá o uso mais eficiente deste nutriente, que na maioria das culturas é <30%, em alguns casos <9% (Yu et al., 2021). Os mecanismos envolvidos abrangem práticas agrícolas que reduzam a adsorção e aumentem a dessorção de P do solo (Vermeiren et al., 2022) para aumentar as estratégias de aquisição/absorção de P pelas plantas (Lambers, 2022; Pavinato et al., 2020).

Aumentar a diversidade de plantas nos sistemas agrícolas com plantas de coberturas tem sido difundido como alternativa viável para explorar o *legacy P* (Hallama et al., 2019; Soltangheisi et al., 2020). Porém, a adoção destas plantas é frequentemente associada aos seus serviços ecossistêmicos: como a supressão de pragas, doenças e ervas daninhas, e outros que afetam a ciclagem de nutrientes, armazenamento de carbono orgânico do solo, estrutura do solo, infiltração de água, erosão e biodiversidade do solo.

Aqui apresentamos um dos primeiros estudos nos trópicos com respostas a longo prazo com plantas de cobertura explorando o *legacy P* e os reflexos sobre a ciclagem de nutrientes, atributos químicos do solo e produtividade de grãos. O objetivo foi avaliar as respostas de fontes fosfatadas associadas com plantas de coberturas nos rendimentos de grãos, ciclagem de nutrientes e nos atributos químicos do solo em safras com entradas de P e posteriormente explorando o *legacy P* do solo.

2.2. Material e Métodos

O experimento de campo foi conduzido por 12 safras sucessivas (2009 a 2020, registrado na plataforma de metadados GLTEN; <https://www.gltten.org/experiments/318>) em Dois Vizinhos, Paraná, sul do Brasil (25°44'05"S; 53°03'31"W; altitude de 509 m). As precipitações médias registradas nos últimos 15 anos (estação de monitoramento, a 1 km do local) e no período experimental são apresentadas na fig. 1. O ensaio foi cultivado em solo Latossolo Vermelho argiloso (73% de argila), com baixo teor de P resina inicial (Tab. A1). Mais detalhes da condição experimental podem ser encontrados em Pavinato et al. (2017) e Soltangheisi et al. (2018, 2020).

2.2.1. Desenho experimental

O experimento foi estabelecido em blocos casualizados, com parcelas subdivididas, em esquema fatorial 3x7, com três repetições. O primeiro fator foi composto por fontes fosfatadas: fosfato natural da Argélia (FN, 9% de P₂O₅ solúvel e 29% de P₂O₅ total), superfosfato simples (SPS, 18% de P₂O₅ solúvel) e um controle (Sem-P). O segundo fator foram plantas de coberturas de inverno: ervilhaca (*Vicia sativa* L.), tremoço-branco (*Lupinus albus* L.), nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.), azevém (*Lolium multiflorum* Lam), aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.), trevo-branco (*Trifolium repens* L.) e um pousio (dessecação frequente das plantas espontâneas). Houve substituição das parcelas com trevo-branco (cultivado entre 2009/10 a 2012/13) por centeio (*Secale cereale* L., após safra 2013/14), devido à cultura não ter apresentado aptidão edafoclimática. As plantas de cobertura foram estabelecidas entre fevereiro a maio de cada ano agrícola (logo após a colheita da cultura comercial). As parcelas experimentais foram de 5 x 5 m (25 m²).

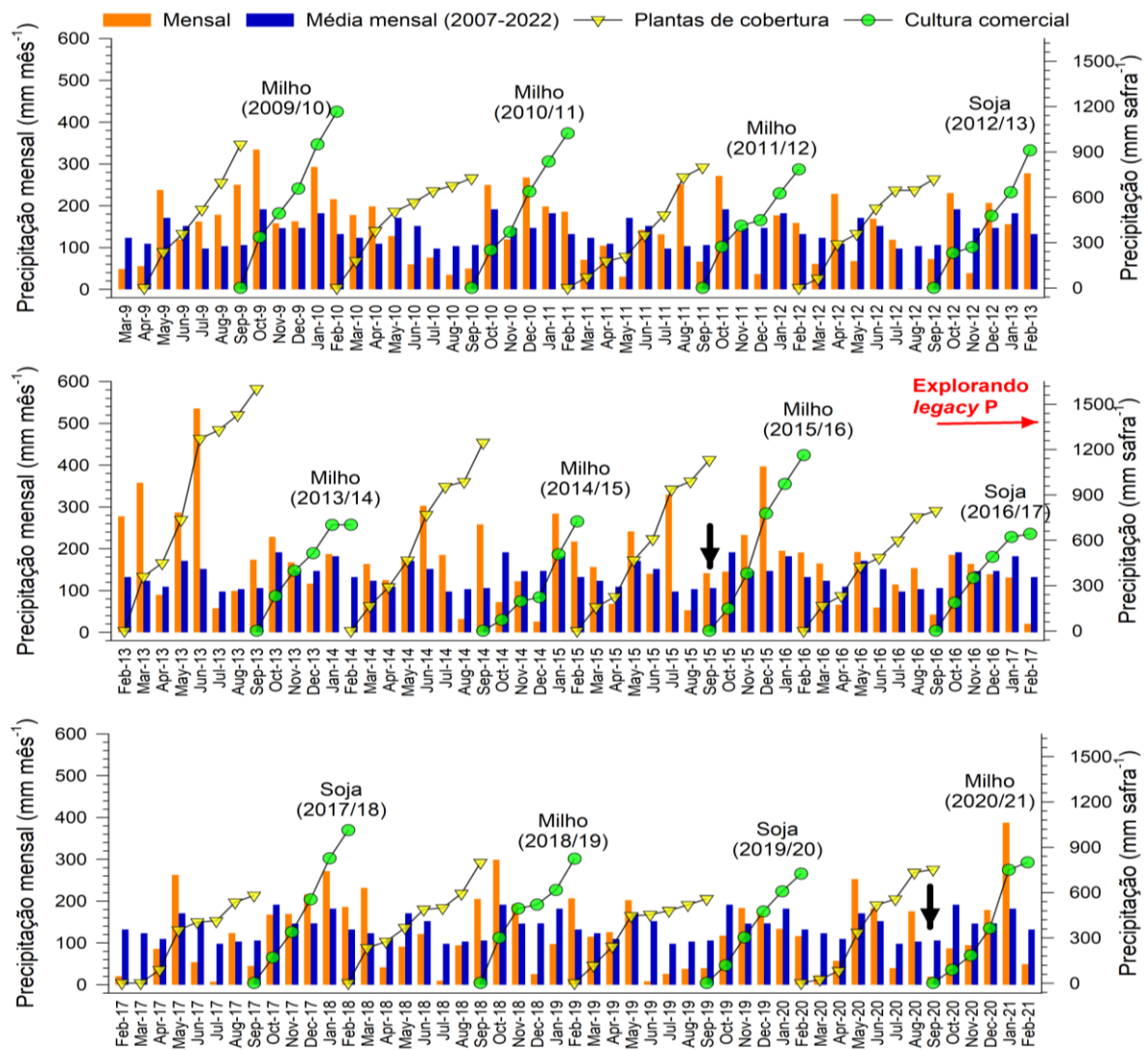


Figura 1. Precipitação mensal do período experimental (2009-2021), média histórica conhecida da precipitação (2007-2022) e precipitação acumulada na estação de cultivo de soja/milho ou das plantas de cobertura em Dois Vizinhos (Estados do Paraná, sul do Brasil). Setas pretas indicam os momentos das amostragens do solo e a vermelha o início do período explorando o *legacy* P.

As fontes fosfatadas foram aplicadas a lanço nas setes primeiras safras (2009/10 a 2015/16) na dose de 46 kg ha^{-1} de P solúvel. A fertilização fosfatada foi suspensa a partir da safra 2016/17, devido ao P-resina ter atingido níveis altos ($>50 \text{ mg kg}^{-1}$, Rajj et al. (1997)) nas parcelas com entradas de P. O P total aplicado foi de 335 kg ha^{-1} com SPS e 1078 kg ha^{-1} com RP. As últimas cinco safras (2016/17 a 2020/21) foram cultivadas explorando o *legacy* P (efeito residual da fertilização fosfatada). Anualmente foram aplicados 33 kg ha^{-1} de K (KCl, 60% de K_2O) apenas nas safras comerciais. Nas plantas de cobertura não-leguminosas foram aplicados 40 kg ha^{-1} de N (via ureia) em cobertura. Nas safras principais, o milho recebeu 120 kg ha^{-1} de N (via ureia) dividido em

três estádios da cultura (40 kg ha^{-1} na semeadura e a mesma dose em cada cobertura nos estádios V4-V5 e V7-V8) e a soja foi inoculada com cepas comerciais de *Bradyrhizobium japonicum*.

O milho foi cultivado em oito safras e a soja em quatro (ver Fig. 1, e tabela S2). Porém, na safra de 2012/13 não foi avaliada a produtividade da soja devido à excesso de chuvas durante a colheita. Em 2018/19, apenas os tratamentos com SPS e Sem-P receberam 3 t ha^{-1} de calcário dolomítico com PRNT de 92% para correção da acidez do solo. Não foi observada acidificação do solo nas parcelas com FN. Mais detalhes da época e semeadura das culturas, materiais genéticos das culturas comerciais, tratos culturais e manejo de dessecação das plantas de cobertura estão descritos em Pavinato et al. (2017) e Soltangheisi et al. (2018, 2020).

2.2.2. Avaliações de produção

As produtividades (Mg ha^{-1}) do milho e da soja, foram avaliadas anualmente por colheita manual das quatro linhas centrais de cada repetição/parcela, excluindo 0,5 m de bordadura ao final das linhas e duas linhas laterais de cada parcela. A debulha das espigas/vagens foram em trilhadeira estacionária, com umidade dos grãos corrigida para 13%.

A massa seca da parte aérea (Mg ha^{-1}) produzida pelas plantas de cobertura foi avaliada anualmente, antes da dessecação, cortando-se rente ao solo todas as plantas contidas em uma área aleatória de $0,5 \text{ m}^2$ de cada parcela. As amostras das biomassas foram secas em estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h (ou até peso constante), pesadas e moídas em malha de 2 mm em moinho Wiley, para posterior análise do teor de nutrientes no tecido.

2.2.3. Análises de planta e solo

Foram determinados os teores P, N e K nos tecidos foliares das plantas de cobertura, após digestão nitroperclórica (P e K) ou sulfúrica (para N), conforme método descrito por Tedesco et al. (1995). O potencial de ciclagem destes nutrientes foi obtido após multiplicar os teores foliares pela biomassa seca das plantas (kg ha^{-1}).

Ao fim do sétimo e 12º ciclo de cultivo das plantas de cobertura (safra 2015 e 2020) foi realizada amostragem de solo nas camadas de 0-10 e 10-30 cm, com seis subamostras por parcela para compor amostra composta de cada camada. Em seguidas foram secas ao ar e peneiradas em malha de 2 mm, para determinação dos atributos químicos do solo. Os teores de P disponível e K trocável foram determinados com extração por resina trocadora aniônica e catiônica (do tipo esférica com $2,5 \text{ cm}^3$ por amostra), o P foi determinado por colorimétrica (azul de molibdato), o K

por espectroscopia de emissão atômica. A matéria orgânica do solo (OM) foi determinada por oxidação com dicromato de potássio e o pH em CaCl_2 0,01 mol L^{-1} , relação 1:2,5 de solo:solução (Teixeira et al., 2017).

2.3. Análises estatísticas

A normalidade (*Shapiro-Wilks*) e homoscedasticidade da variância (*Bartlett*) foram verificadas para todas as variáveis, quando não atendidos estes pressupostos foram transformação por Anderson-Darling. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA, $p \leq 0,05$), desdobrando os fatores com interação significativa, e comparações *post-hoc* pelo teste Tukey (HDS, $p \leq 0,05$). Apenas nas propriedades do solo foi aplicado modelo fatorial triplo, onde as camadas do solo entraram como parcelas subdivididas (Tab. S5). As safras não foram comparadas entre si, devido a alta variabilidade climática entre os anos (Fig. 1), e por isso os anos foram analisados separadamente (Tab. S2, S3).

A magnitude das respostas nos rendimentos das culturas comerciais promovidos pelos efeitos das plantas de cobertura e fontes de P foi analisada por tamanho de efeito (Hedges et al., 1999). A razão de resposta log-transformada natural (LRRi) foi calculada para todas as safras (resposta global), para as com entradas de P e explorando o *legacy* P, conforme equação 1.

$$LRRi = \ln \frac{P.CC}{P.pousio\ i} \quad (1)$$

Onde P.CC e P.pousio *i* representam dos rendimentos com a planta de cobertura e o pousio, respectivamente. Foi avaliada a razão logarítmica média de resposta (LRRm) de acordo com dois fatores cruzados com a equação 2.

$$LRRm = \frac{\sum LRRi}{n} \quad (2)$$

Onde "n" corresponde ao número total de observações de cada tratamento. Para facilitar a interpretação, a razão logarítmica média de resposta e os limites de confiança foram transformados para percentagem com a equação 3.

$$\% \text{respostas em produtividade} = (e^{LRRm} - 1) \times 100 \quad (3)$$

A regressão linear foi aplicada para estimar a relação direta da produção de biomassa das plantas de coberturas com o rendimento relativo (RR%) das culturas comerciais, calculado conforme equação 4.

$$RR\% = \frac{\sum \text{Produtividade de grãos (Mg ha}^{-1}\text{)}}{\text{Maxima produtividade de grãos (Mg ha}^{-1}\text{)}} \quad (4)$$

Foi aplicada a análise multivariada de componentes principais em todos os resultados da sétima (com entradas de P, 2015/16) e 12^o safra (ou quinta safra explorando o *legacy* P, 2020/21), com apenas a camada de 0-10 cm (por conterem as maiores diferenças). Esta técnica foi aplicada para reduzir a dimensionalidade e explorar a covariação principal das associações entre as variáveis e os tratamentos (Hair et al., 2009) e aplicada a distância de Mahalanobis para mediar a dissimilaridades dos tratamentos. Todas as análises e os gráficos foram realizados no programa R versão 4.1.3.

2.4. Resultados

2.4.1. Produção de grãos

A interação dos fatores na produtividade dos grãos ocorreu apenas após cinco safras (milho em 2013/14, $p = 0,0000016$, Tab. S2 e Fig. S1D), e apenas a partir desta ocorreu efeito simples das plantas de cobertura ($p = 0,00005$), embora não quantificamos os resultados da 4^o safra com soja devido às perdas por excesso de chuva na colheita. Esta resposta também ocorreu na 6^o e 7^o (2014/15 e 2015/16) safras com milho e entrada de P (Tab. S2, e Fig. S1E e F), e para soja (8^o e 9^o safra, 2016/17 e 2017/18) e milho (10^o safra, 2018/19) explorando o *legacy* P (Tab. S2 e, Fig. S2A, B e C).

Os efeitos das fontes nas três primeiras safras apresentaram tendência semelhantes, mas com fortes variações (2,5 a 9,0 Mg ha⁻¹ de grãos de milho, Fig. S1A, B e C) provocadas pela disponibilidade hídrica (Fig. 1). No geral, o milho com SPS e FN produziram ~7,1 Mg ha⁻¹, superior ~2,1 Mg ha⁻¹ (ou 30%) comparados ao Sem-P (Fig. S1A, B e C). Esta mesma resposta voltou a ocorrer na quarta safra explorando o *legacy* P (11^o safra, 2019/20), onde a soja apresentou produtividade de ~4,3 Mg ha⁻¹ com as fontes, superior 1,9 Mg ha⁻¹ (ou 44%) ao Sem-P (Fig. S2D). Porém, com milho na quinta safra (12^o, 2020/21) explorando *legacy* P, FN foi superior (19%) a SPS (Fig. S2E).

Nas safras com boa disponibilidade hídrica (2013/14 e 2015/16) e com entradas de P, as plantas de cobertura foram superiores ou iguais ao pousio, exceto em 2013/14 em que quando aveia preta, nabo forrageiro, tremoço-branco e ervilhaca associadas a SPS houve redução de 3,8 Mg ha⁻¹ na produtividade do milho comparado ao pousio (11,7 Mg ha⁻¹). Nesta mesma safra, apenas tremoço-branco com a fonte de baixa solubilidade (FN) diferiu do pousio (+27%, 2,4 Mg ha⁻¹, $p = 0,00002$).

Resultados semelhantes ocorreram para milho em 2015/16 sob tremoço-branco, nabo forrageiro, azevém sob FN ($p = 0,0001$) e tremoço-branco sob SPS ($p = 0,00001$). Em 2018/19 para aveia preta sob SPS ($p = 0,00001$) e azevém sob Sem-P ($p = 0,0001$), e em 2020/21 para todas as plantas de cobertura ($p = 0,0002$), independente da fonte. Na soja, de forma surpreendente, esta resposta só ocorreu quando Sem-P (cenário sem entrada de P em todas as safras), onde em 2016/17 (primeira safra explorando *legacy* P de FN e SPS, Fig. S2A) azevém aumentou 52% a produtividade em relação ao pousio ($4,0$ vs. $2,63$ Mg ha⁻¹, $p = 0,013$) e não diferiu das fontes ($p = 0,08$). O mesmo ocorreu em 2017/18, incluindo aveia preta, mas inferior ~25% sob SPS e FN ($p = 0,0002$, Fig. S2B). A falta de respostas em 2019/20 pode estar associada ao déficit hídrico que ocorreu no estágio de plântulas e enchimento de grão da soja, como também no cultivo das plantas de cobertura (Fig. S2D e Fig. 1).

A produção total dos grãos (soja e milho) foi apenas alterada pelos efeitos simples das fontes ($p = 0,0000001$) e das plantas de cobertura ($p = 0,00006$) (Fig. 2). As melhores fontes, por ordem decrescente, foram FN, SPS e Sem-P com 75, 71 e 46 Mg ha⁻¹ de grãos, respectivamente. Azevém apresentou melhor desempenho (68 Mg ha⁻¹), embora tremoço-branco, aveia preta e ervilhaca foram ligeiramente superiores ao pousio. Na produção acumulada da soja (Fig. 2A), as plantas de cobertura não influenciaram sob SPS e FN ($p = 0,26$ e $0,95$), com produção de grãos de $\sim 12,7 \pm 0,2$ Mg ha⁻¹. Já sob Sem-P, azevém e aveia preta foram superiores com incrementos de 3,4 e 2,8 Mg ha⁻¹ ($p = 0,0001$) comparado ao pousio, respectivamente.

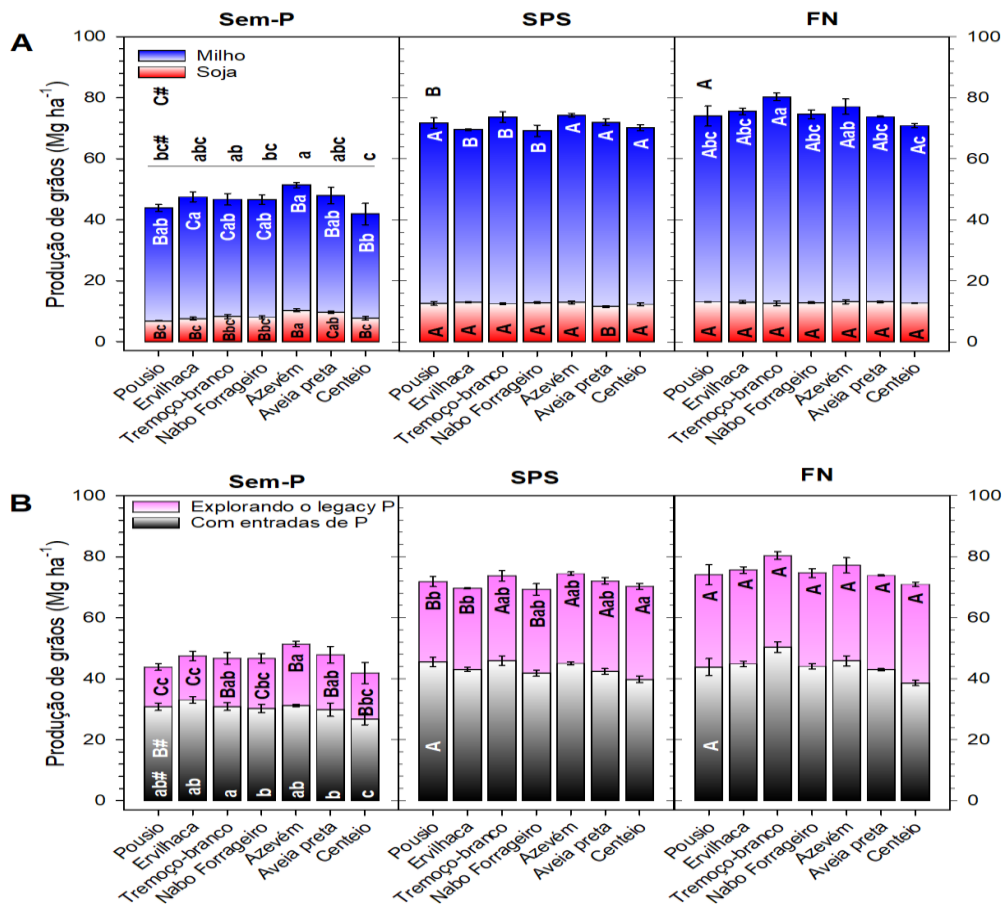


Figura 2. Rendimento acumulado por cultura comercial (A) e por períodos com entradas de P ou explorando o legado P (B). O ápice das colunas representa o acúmulo total. Letras iguais maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). #: respostas apenas com efeitos simples; Sem-P: sem aplicação de fosfatadas; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

Na produção do milho, as plantas de cobertura influenciaram apenas sob FN e Sem-P ($p = 0,000001$ e $0,03$). As produções sob SPS e FN foram semelhantes, exceto quando SPS foi cultivado com ervilhaca, tremoço-branco e nabo forrageiro, onde houve uma redução de $\sim 11\%$ comparado ao FN (Fig. 2A). A maior produção de milho foi com tremoço-branco em FN (68 Mg ha^{-1}), 11% superior ao respectivo pousio. Sob Sem-P, azevém e ervilhaca foram 10 e 8% superiores ao pousio, com aumento de 4 e 3 Mg ha^{-1} de grãos de milho.

A produção total nas safras com entradas de P (2009/10 a 2015/16), não apresentou interação ($p = 0,13$). FN e SPS não diferiram entre si, e produziram $13,3 \text{ Mg ha}^{-1}$ a mais que Sem-P ($p = 0,00001$). Tremoço-branco, azevém, ervilhaca foram superiores as outras espécies, mas não diferiram do pousio (Fig. 3B). Já o acúmulo das safras explorando o *legacy* P (2016/17 para 2020/21) foi fortemente influenciado pelas fontes de P e plantas de cobertura ($p = 0,007$). Neste período, as plantas de cobertura não apresentaram efeito significativo em FN ($p = 0,89$), mas fundamentais

para explorarem *legacy* P de SPS (fonte que fornece P 100% solúvel, $p = 0,002$) e principalmente Sem-P (período com 7 a 12 safras explorando o *legacy* P, $p = 0,0001$). Exceto ervilhaca, todas as plantas de cobertura favoreceram a produção de grãos quando comparadas com o pousio. Em relação aos pousios, destacamos que azevém sob Sem-P aumentou em 55% ($+7,2 \text{ Mg ha}^{-1}$) e centeio explorando *legacy* P sob SPS aumentou em 16% na produção de grãos acumuladas.

A análise de tamanho de efeito revelou que as plantas de cobertura aumentaram globalmente a resposta no rendimento da soja ou milho, e estas foram influenciadas pelos cenários de P no solo (Fig. 3A). O maior incremento foi com FN ($\sim 21,0\%$, limite crítico a 95% (IC95%) – 0,19 para 0,23) seguida de SPS ($\sim 14,6\%$, IC95% – 0,12 para 0,17), e houve redução de -27% (IC95% – $-0,30$ para $-0,25$) sob Sem-P, mas nesta condição as plantas de cobertura proporcionaram aumento de $\sim 7\%$ comparadas ao pousio. Exceto sob Sem-P, a diferença das plantas de cobertura ocorreu apenas entre tremoço-branco e nabo forrageiro sob FN e com ervilhaca sob SPS.

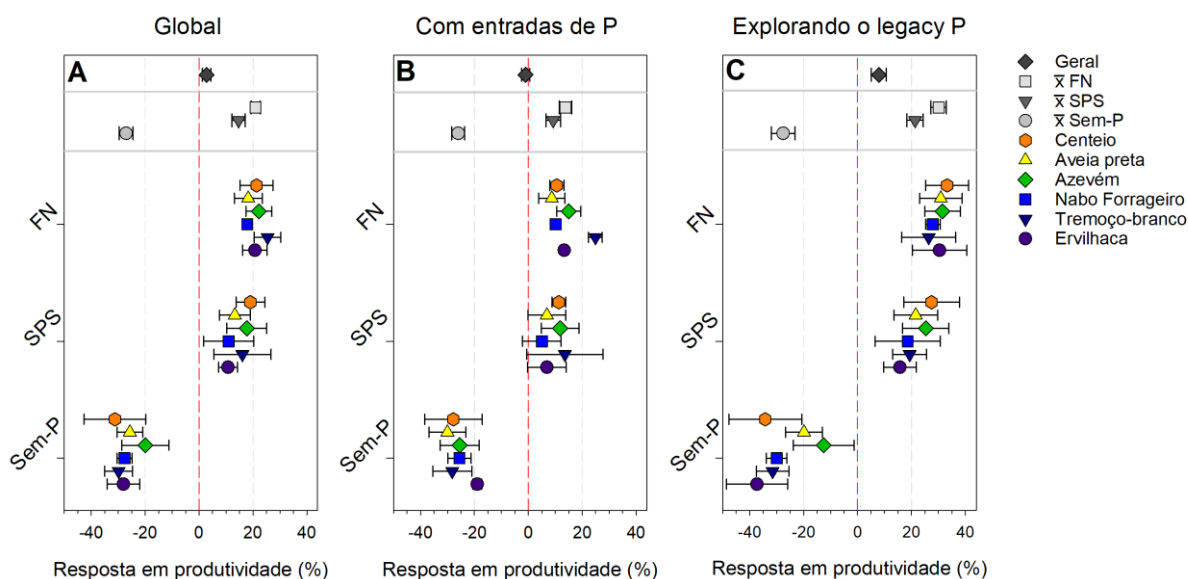


Figura 3. Respostas em produtividade de grãos promovidas por plantas de cobertura em comparação com pousio via meta-análise. Efeito global nas 12 safras (A), para safras com entradas de P (B) e exploração do *legacy* P (C). As barras de erro mostram intervalo de confiança (IC) a 95%. A variação da produtividade \pm IC95% não se sobrepõem $p > 0,05$. Sem-P: sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fósforo natural.

Ao considerar as safras com entradas de P (Fig. 3B) e explorando o *legacy* P (Fig. 3C), curiosamente houve maior resposta de produção em safras explorando o *legacy* P do que com entradas de P (\bar{x} geral, $8,0$ vs. $-1,0\%$), porém com maior variabilidade. Com entradas de P, tremoço-branco sob FN aumentou em 25% a resposta de produção (IC95% – 0,23 para 0,27) e foi significativamente superior aos demais tratamentos (Fig. 3B). Neste mesmo cenário, as fontes foram ligeiramente semelhantes, mas sob SPS com tremoço-branco, ervilhaca, nabo forrageiro e

aveia preta ocorreu alta variabilidade e por isso apresentaram respostas próximas a nulas, estatisticamente ($p < 0,05$). Já as plantas que exploraram o *legacy* P sob FN apresentaram maiores respostas de produtividade quando comparadas sob SPS (~30 vs. ~21%, $p = 0,0001$). No entanto, apenas nabo forrageiro, azevém e centeio sob FN foram superiores à ervilhaca sob SPS (Fig. 3C). Sob Sem-P (12 safras explorando o *legacy* P), houve maior diferença entre as plantas de cobertura, e azevém proporcionou menor redução da produção (-12,6%, IC95% – -0,21 para -0,04) quando comparado às outras espécies (~-27%, IC95% – -0,32 para -0,23).

2.4.2. Biomassa e absorção de nutrientes pelas plantas de cobertura

A biomassa e potencial de ciclagem de P, N e K pelas plantas de cobertura foram fortemente impulsionadas pelas espécies e fontes de P – tanto para o total acumulado, como para o acumulado em anos com entradas de P ou explorando o *legacy* P ($p \leq 0,05$).

A produção de biomassa seca anual da parte aérea das plantas de cobertura variou de 0,1 a 19,0 Mg ha⁻¹, e fortemente influenciadas pelos fatores climáticos das entressafras (geadas, quantidade e distribuição temporal das chuvas) (Fig. 1). Apenas trevo-branco não apresentou boa aptidão edafoclimática e por isso foi substituído por centeio após a terceira safra, devido à baixa produção de biomassa (característica essencial para adoção de plantas de cobertura nos sistemas agrícolas), ~2,9 Mg ha⁻¹, ou seja, -128% inferior as outras espécies. Nas estações com déficit hídrico no início do estabelecimento das plantas de cobertura ou por longos períodos (2009, 2011, 2017 e 2020, Fig. 1) não houve interação dos fatores e foram onde ocorreram as menores biomassas (Tab. S2, Fig. S3A, C e F, e Fig. S4C e E). Excessos de chuvas nesta fase (2014, Fig. S3D) aumentou a variação da biomassa (CV = 36%) e por isto não houve respostas significativas.

De modo geral, a produtividade de biomassa da ervilhaca foi inferior as outras espécies em todos os anos, exceto em 2014 que foi semelhante ($p = 0,001$, Fig. S3F), e não foi influenciada pelas fontes de P ($p > 0,05$), com exceção de 2016 e 2019 (Fig. S4A e D). A resposta das outras espécies foi variável, especialmente com entradas de P (Fig. S3), mas, em anos explorando o *legacy* P, ocorreu maior consolidação das diferenças entre SPS, FN e Sem-P. Neste período, houve tendência das gramíneas (centeio, aveia preta e azevém) produzirem mais biomassa quando comparadas às outras espécies.

A aveia preta apresentou a maior produção de biomassa total comparada às outras espécies em todos os níveis das fontes P, sendo que apenas nabo forrageiro sob FN foi semelhante à aveia preta com 71 Mg ha⁻¹ de massa seca acumulada (Fig. 4A, Tab. S2). Os menores acúmulos foram observados na ervilhaca, independente da fonte ($p = 0,001$), embora sob Sem-P foi ~47%

menor que sob SPS e FN. Centeio diferiu apenas sob SPS com ervilhaca. Nas safras com entradas de P, as fontes apenas diferiram com o nabo forrageiro, azevém e aveia preta. No geral, FN foi semelhante a SPS e superiores a Sem-P. Já explorando o *legacy* P, SPS não diferiu de FN apenas com aveia preta, azevém e ervilhaca, e todas as espécies foram inferiores sob Sem-P (condição com 12 safras explorando o *legacy* P). Aveia preta e centeio acumularam mais biomassa que as outras espécies (independente da fonte P), e, curiosamente, centeio foi a única espécie onde SPS foi superior a FN.

A ciclagem de P total (absorção de P) pelas plantas de cobertura foi ligeiramente superior com FN, exceto com aveia preta onde SPS foi 16% maior que FN (266 vs. 229 kg ha⁻¹) (Fig. 4B e Tab. S3). Obviamente esta resposta ocorreu devido à maior absorção média de P nas safras com entradas de P (Tab. S3 e S4). Nabo forrageiro foi apenas superior as outras espécies em condições de alta disponibilidade de P, com maior potencial sob FN (344 kg ha⁻¹ de P), seguido de SPS (242 kg ha⁻¹ de P). A menor absorção de P total foi com ervilhaca sob Sem-P, com médias anuais de 6,3 nas safras com entradas de P e 3,0 kg ha⁻¹ explorando o *legacy* P. Nesta última, apenas centeio manteve absorção de P média e total sob SPS semelhante ao FN (p = 0,0001). Nas outras plantas de cobertura, houve redução de ~37,3 kg ha⁻¹ (ou -34%) do acumulado, ou, em média, ~-5,3 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de FN para SPS.

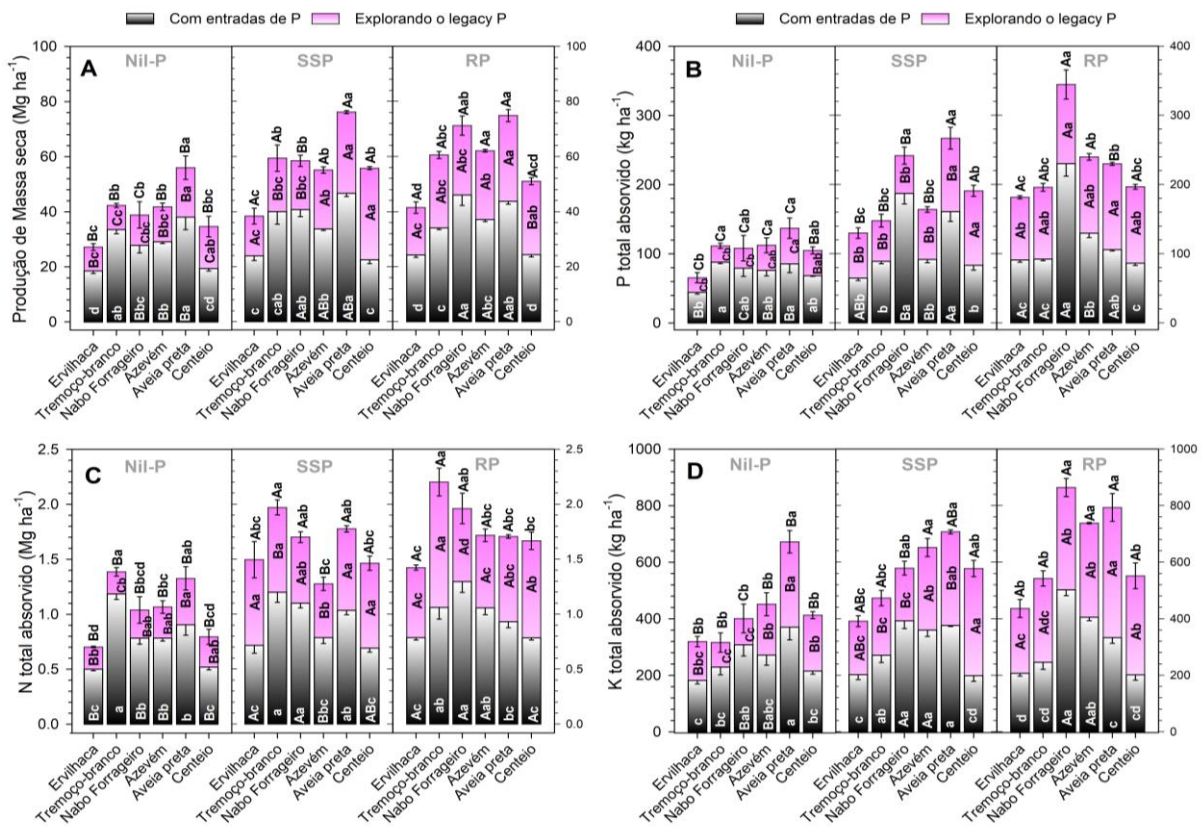


Figura 4. Massa seca acumulada (A), absorção de P (B), N (C) e K (D) das plantas de cobertura sob fontes fosfatadas com entradas de P (7 safras), explorando o *legacy* P (5 safras) e total (12 safras). O ápice das colunas representa o acúmulo total. Letras iguais, maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura, não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). Sem-P: sem aplicação de fosfatadas; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

A absorção de N acumulado nas 12 safras variou de 0,7 a 2,4 Mg ha^{-1} (Fig. 4C, Tab. S3). Entre as plantas de cobertura, tremoço-branco apresentou maior absorção de N em todas as fontes de P, embora sob FN e SPS aumentou em 0,82 e 0,58 Mg ha^{-1} de N, respectivamente, comparado a Sem-P. Sob FN, nabo forrageiro foi semelhante a tremoço-branco e a aveia preta sob SPS. Já em Sem-P, apenas aveia preta foi semelhante a tremoço-branco. Nas safras com entradas de P, não houve diferença entre SPS e FN, exceto com azevém sob SPS foi semelhante à Sem-P, e para tremoço-branco e aveia preta as fontes de P não foram influenciaram absorção de N ($p = 0,19$ e 0,26). Em safras explorando o *legacy* P, tremoço-branco sob FN acumulou mais absorção de N que todos os outros tratamentos (1,1 Mg ha^{-1}) e surpreendentemente reciclou mais N neste cenário (cinco safras) comparado as setes safras com entradas de P (1,0 Mg ha^{-1}). Estes resultados representam uma forte economia para as entradas de N no sistema, devido ao tremoço-branco ser uma fabaceae, por isso não foi aplicado N na cultura – como ocorreu nas outras quatro não

leguminosas, ou seja, esta absorção de N foi parte da reciclagem das culturas comerciais e principalmente da fixação biológica de nitrogênio.

O potássio foi aplicado igualmente em todas as parcelas na cultura comercial, porém as fontes de P e principalmente as plantas de cobertura alteraram significativamente a reciclagem de K no sistema ($p \leq 0,05$) (Fig. 4D, Tab. 3S e 4S). As maiores reciclagens de K total foram observadas pelas plantas de cobertura não leguminosas sob FN e SPS (654,0 e 563,0 *vs.* 429 kg ha⁻¹ sob Sem-P). Não houve diferença das fontes para as leguminosas, e, de modo geral, ervilhaca absorveu -38% e tremoço-branco -28% de K comparada as outras espécies. Nas safras com entradas de P, nabo forrageiro, azevém e aveia preta reciclaram mais K, superiores, em média, em 88% sob FN e 44% sob SPS em relação à Sem-P. Apenas aveia preta não apresentou respostas significativamente às fontes de P ($p = 0,45$). Estes resultados foram semelhantes nas safras explorando o *legacy* P, apenas aveia preta sob Sem-P foi ~54% superior as outras plantas. Os resultados da absorção de K foram positivamente correlacionadas ($r: 0,81, p = 0,001$) com a produção de biomassa das plantas.

A regressão linear dos efeitos das biomassas das plantas de cobertura no rendimento relativo de grãos das culturas comerciais mostrou que os incrementos diretos foram maiores explorando o *legacy* P (Fig. 5A). Neste cenário, cada tonelada de biomassa produzidas pelas plantas de cobertura aumentou em 3,1% a produtividade relativa, duas vezes maior comparado com entradas de P. As respostas foram maiores com soja do que o milho (2,1 *vs.* 1,7%), embora a estimativa do rendimento relativo da soja foi inicialmente maior comparado ao milho (54,6 *vs.* 45,6%, Fig. 5B).

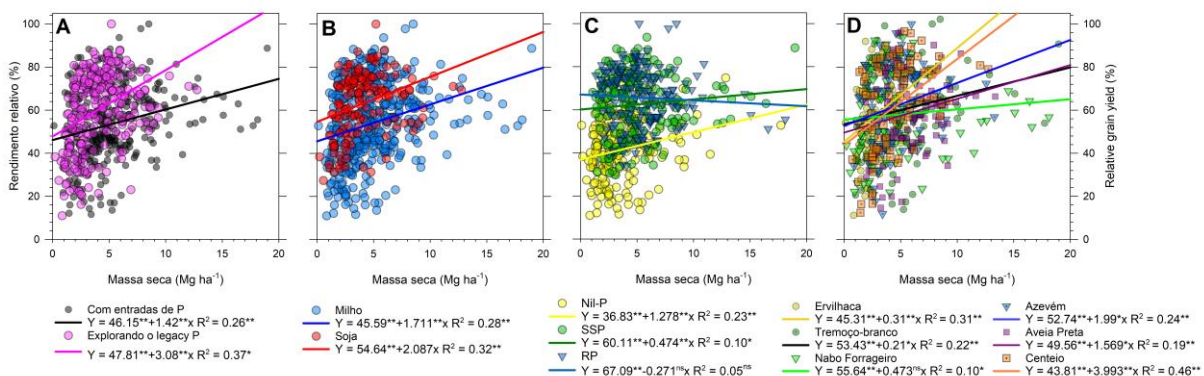


Figura 5. Regressão linear da massa seca das plantas de cobertura com o rendimento relativo de grãos para as safras com e sem entradas de P (A), soja e milho (B), fontes fosfatadas (C) e por planta cobertura (D) das 12 safras. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

As fontes de P – aqui de modo geral – apresentaram baixa resposta, onde sob Sem-P a resposta foi minimizada devido ao baixo rendimento relativo inicial (37%) comparado às fontes de P. Esta resposta global foi fortemente alterada nas safras com entradas ou não de P (Fig. 5A). As plantas de cobertura que mais favoreceram o rendimento relativo foram centeio e aveia preta, com aumento médio de 4,0 e 1,6% para cada tonelada de biomassa produzida (Fig. 5D).

2.4.3. Atributos químicos do solo

Mudanças no P-resina, K trocável, OM e pH do solo foram impulsionadas pelas plantas de cobertura e fontes de P nas duas camadas avaliadas em 2015 e 2020 ($p < 0,05$, Tab. S5), exceto no pH em 2015 (Tab. S8, $p = 0,77$). De modo geral, o P resina foi maior sob FN em ambos os anos e camadas (especialmente em 0-10 cm, $p = 0,00001$), e SPS foi superior a Sem-P apenas em 2020 (com supressão de P) explorando o *legacy* P (Tab. 1). Em 2015, exceto com aveia preta e centeio, o SPS não diferiu de Sem-P devido à alta variabilidade dos resultados ($CV = 29\%$), mas SPS apresentou aumento médio de $34,4 \text{ mg dm}^{-3}$ de P-resina comparado a Sem-P.

As plantas de cobertura foram semelhantes ao pousio, exceto sob FN em 2015 na camada 0-10 cm, onde tremoço-branco e aveia preta aumentaram fortemente o teor de P ($+66,8$ e $+29,2 \text{ mg dm}^{-3}$, respectivamente). Tremoço-branco e azevém, em 2020 na camada subsuperficial (10–30 cm), aumentaram em $15,4$ e $12,0 \text{ mg dm}^{-3}$ de P-resina. Apenas nestas fontes com entradas de P (2015) o nabo forrageiro reduziu 94 mg dm^{-3} o P disponível e pode ser justificado pelo rápido aumento da absorção de P (Fig. 4B).

Já explorando o *legacy* P (2020), o nabo forrageiro apresentou resposta semelhante, mas acompanhado de ervilhaca. As mudanças dos teores de P-resina entre os anos sugerem solubilização de P ligado a Ca do FN devido o rápido aumento em todas as espécies de plantas de cobertura (especialmente em 0-10 cm). Houve redução média de $13,7 \text{ mg dm}^{-3}$ sob SPS em 0-10 cm. Na camada 10–30 cm sob SPS e Sem-P não houve mudanças significativas no P disponível.

Tabela 1. Teor de P resina disponível por profundidade do solo em 2015 (com entradas P) e 2020 (explorando o *legacy* P) e diferença entre anos com fontes fosfatadas e plantas de cobertura. As médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre a cultura de cobertura, não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: Por estética, as letras são expostas apenas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). Sem-P: sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

Fontes P/Camadas	Pousio	Ervilhaca	Tremoço-branco	Nabo forrageiro	Azevém	Aveia preta	Centeio	Média de fontes P
----- P resina 2015 (mg dm ⁻³) -----								
0-10 cm								
Sem-P	10,0 B	14,5 B	11,8 B	7,7 B	10,0 B	7,7 C	9,2 C	10,1
SPS	37,3 Bab	43,0 Bb	39,7 Bab	36,7 Bb	38,2 Bab	39,7 Bab	76,8 Ba	44,5
FN	247,8 Ac	250,0 Ac	301,7 Aa	153,8 Ad	216,7 Ac	277,0 Aab	230,2 Ac	239,5
Média	98,4	102,5	122,1	66,1	88,3	108,1	105,4	
----- P resina 2015 (mg dm ⁻³) -----								
10-30 cm								
Sem-P	4,5 B	6,8	11,3	5,8	6,1	4,9	5,8	6,5
SPS	5,2 B	22,6	8,1	8,7	9,4	13,6	7,8	10,8
FN	53,7 Aa	10,3 b	21,0 ab	9,7 b	13,6 b	11,0 b	26,5 b	20,8
Média	21,1	13,3	13,5	8,1	9,7	9,8	13,4	
----- P resina 2020 (mg dm ⁻³) -----								
0-10 cm								
Sem-P	11,3 Cab	12,8 Ca	13,5 Ca	8,7 Cc	10,7 Cabc	10,5 Cabc	8,8 Cbc	10,9
SPS	27,1 Bab	27,7 Bab	33,1 Bab	30,6 Bab	22,9 Bb	35,5 Ba	38,8 Ba	30,8
FN	360,3 Aa	194,5 Ae	317,1 Ab	263,1 Ac	268,1 Ac	230,7 Ad	230,5 Ad	266,3
Média	132,9	78,4	121,2	100,8	100,6	92,2	92,7	
----- P resina 2020 (mg dm ⁻³) -----								
10-30 cm								
Sem-P	7,3 C	7,2 B	7,5 C	7,3 C	7,1 C	7,4 C	7,2 C	7,2
SPS	9,1 Bab	8,5 Bab	10,1 Ba	8,9 Ba	7,9 Bb	9,2 Bab	8,8 Bab	8,9
FN	24,2 Ac	23,2 Ac	36,2 Aab	26,1 Abc	39,6 Aa	25,9 Abc	26,4 Aabc	28,8
Média	13,5	12,9	17,8	13,9	18,2	14	14,1	
----- Δ P-resina (diferença entre 2015 e 2020) -----								
0-10 cm								
Sem-P	+1,3 (+13%)	-1,7 (-11%)	+1,7 (+16%)	+1 (+16%)	+0,7 (+8%)	+2,9 (+38%)	-0,3 (-2%)	+0,8 (+11%)
SPS	-10,3 (-27%)	-15,3 (-31%)	-6,7 (-10%)	-6,1 (-16%)	-15,3 (-38%)	-4,2 (-10%)	-38,1 (-49%)	-13,7 (-26%)
FN	+112,4(+46%)	-55,5 (-22%)	+18,8 (+7%)	+109,3 (+77%)	+51,5 (+26%)	-46,3 (-15%)	+0,3 (0%)	+26,8 (+17%)
Média	+34,5 (+11%)	-24,2 (-22%)	-0,8 (+3%)	+34,8 (+26%)	+12,3 (-1%)	-15,9 (+4%)	-12,7 (-17%)	
----- Δ P-resina (diferença entre 2015 e 2020) -----								
10-30 cm								
Sem-P	+2,7 (+67%)	+0,4 (+7%)	-4,3 (-36%)	+1,2 (+31%)	+0,9 (+18%)	+2,2 (+44%)	+1,2 (+26%)	+0,6 (+22%)
SPS	+3,9 (+76%)	-14,2 (-62%)	+2,1 (+34%)	+0,1 (+20%)	-1,5 (-7%)	-4,4 (-27%)	+1 (+18%)	-1,9 (+7%)
FN	-29,4 (-55%)	+12 (+142%)	+15 (+110%)	+16,3 (+227%)	+26 (+252%)	+14,9 (+164%)	-0,1 (+2%)	+7,9 (+121%)
Média	-7,6 (+29%)	-0,3 (+29%)	+4,3 (+36%)	+5,9 (+93%)	+8,5 (+88%)	+4,2 (+61%)	+0,7 (+15%)	

Os maiores teores de K trocável foram observados sob Sem-P, independente do ano e camadas do solo ($p = 0,0001$, Tab. S5 e S6). Esta resposta pode ser reflexo direto da maior produção de biomassa, consequentemente maior extração de K do solo, pelas plantas de cobertura sob SPS e FN. O pousio apresentou mais K trocável comparado às plantas de cobertura, exceto em 2020 sob Sem-P onde aveia preta e centeio foram ~37% superior nas duas camadas do solo.

Na matéria orgânica (MO), em 2015, houve baixa resposta das plantas de cobertura às fontes P, exceto para tremoço-branco sob FN que foi ~18% superior a SPS e Sem-P (Tab. S5 e

S7). No pousio, houve redução de ~19% da MO sob SPS comparado ao Sem-P e FN, sendo que apenas nesta condição o pousio foi inferior a todas as plantas de cobertura ($p = 0,006$), um possível efeito *priming* negativo. Já em 2020, na camada superficial, FN apresentou menos MO comparado a SPS e Sem-P para a ervilhaca, tremoço-branco e nabo forrageiro, e não houve diferença com as outras plantas de cobertura. Nesta mesma camada, o pousio foi apenas inferior às plantas de cobertura sob Sem-P ($p = 0,003$) e SPS ($p = 0,0001$).

A acidificação do solo (pH em CaCl_2) foi menor com FN em 2015, e aveia preta apresentou maior acidificação sob Sem-P, embora foi semelhante ao pousio e nabo forrageiro. Apenas nesta última planta houve diferença significativa entre as camadas ($p = 0,00001$), onde a subsuperfície apresentou mais acidez ativa.

2.4.4. Comparações multivariadas da 7° e 12° safra

A análise de componentes principais (PCA) é frequentemente utilizada para separar grupos de tratamentos com alta dissimilaridade com base na correlação linear de todas as variáveis (Hair et al., 2009). Os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 63,3% da variação total em 2015 (7° safra com entrada de P, Fig. 6A) e 67,1% em 2020 (12° safra ou 5° explorando o *legacy* P, Fig. 6C) - os autovalores são fornecidos na Fig. S5.

A PCA mostrou que os pousios em 2015 (exceto ervilhaca sob Sem-P) apresentaram alta dissimilaridade com as plantas de cobertura (Fig. 6A). A maior distância de Mahalanobis do pousio sob Sem-P foi com centeio sob SPS (12,5) seguido de aveia preta sob FN (10,3). Estes tratamentos juntos a azevém e aveia preta sob SPS foram positivamente correlacionados com a produção de biomassa, reciclagem de nutrientes e a matéria orgânica do solo – variáveis estas as principais deficiências do pousio sob Sem-P – embora sem correlação direta com o rendimento de grãos. Esta última foi relacionada positivamente com o teor de P-resina e altos valores de pH do solo. Este grupo de variáveis foi principalmente associado a FN com tremoço-branco, nabo forrageiro, azevém e ervilhaca, e apenas tremoço-branco sob SPS (esta foi inferior aos dois primeiros tratamentos).

As principais mudanças que ocorreram nos resultados da PCA em 2020 foi que a MO do solo contribuiu mais para a formação dos componentes (de 0,86% em 2015 para 9,5% em 2020, Tabela S9). Houve um distanciamento da ciclagem de nutrientes com a biomassa das plantas de cobertura, e esta última foi mais positivamente correlacionada com o rendimento de grãos de milho - resposta considerada nula em 2015 (Fig. 6C). Todas as plantas de cobertura sob FN foram mais associadas com o rendimento de grãos – especialmente azevém, centeio e aveia preta – e teor de

P-resina no solo – principalmente tremoço-branco, nabo forrageiro e ervilhaca. As plantas de cobertura cultivadas sob SPS apresentaram maior associação com a reciclagem de nutrientes e teor de MO. Os tratamentos que apresentaram maiores distancias de Mahalanobis com o pousio sob Sem-P foram ligeiramente aveia preta (29,6) e tremoço-branco sob SPS (10,7), azevém (11,0) e aveia preta sob FN (10,1).

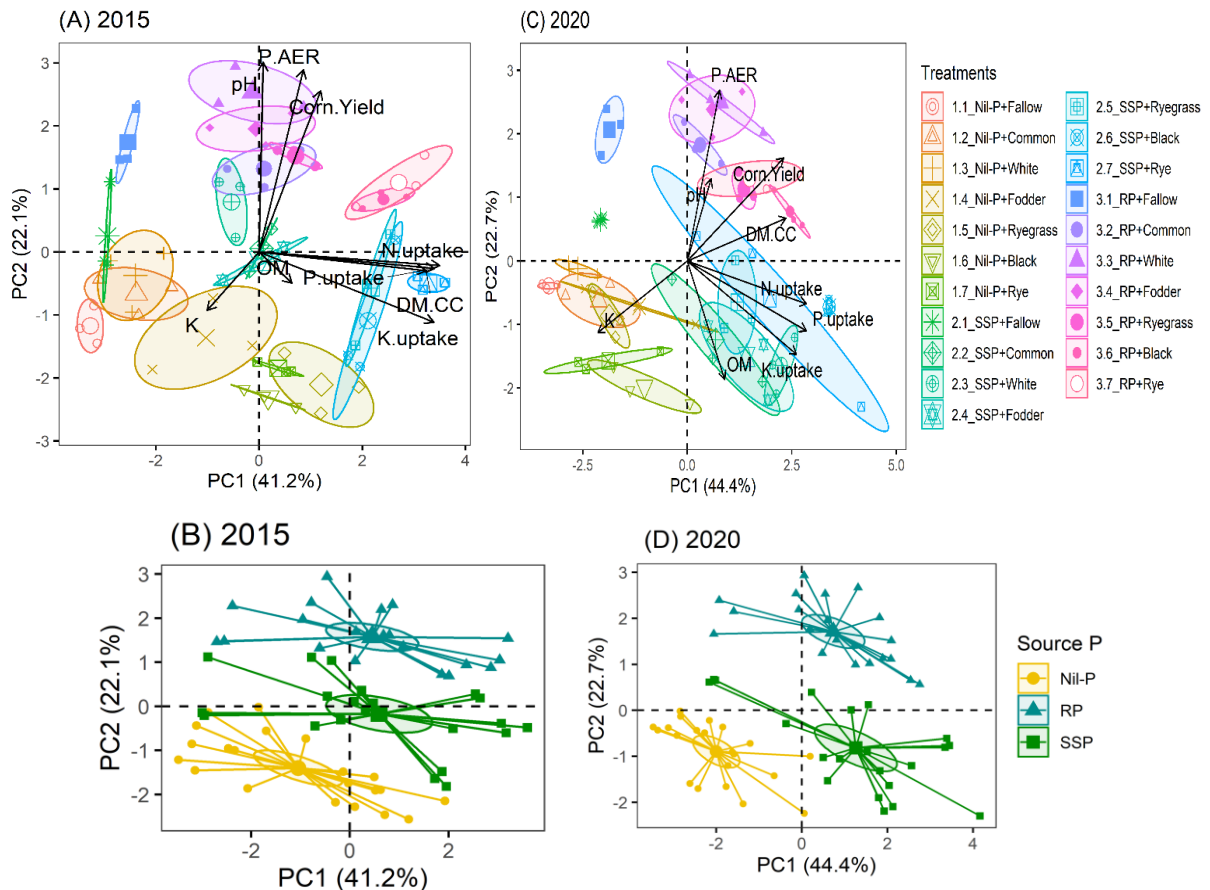


Figura 6. *Biplots* dos dois componentes principais (PC) dos efeitos das plantas de cobertura e das fontes de P nas propriedades químicas do solo, produtividade do milho, massa seca e a absorção de P, N e K pelas plantas de cobertura em 2015 (A e B) e 2020 (C e D). Os *biplots* diferenciam as observações com base na interação P fontes x planta de cobertura (A e C, $n = 3$) e apenas fontes de P (B e D, $n = 21$). As elipses representam o limite de confiança de 95%. DM.CC: massa seca das plantas de cobertura; OM: matéria orgânica do solo; P.AER: P resina; Corn.Yield: produtividade do milho; N.uptake, P.uptake e K.uptake: Absorção de N, P e K pelas plantas de cobertura. Nil-P: Sem entradas de P; RP: fósforo natural; SSP: superfósforo simples.

Os resultados da PCA sugerem que as respostas observadas foram moduladas principalmente pela fonte de P. FN apresentou maior dissimilaridade com Sem-P (~ 4) em ambas as safras, e houve um aumento da distância de Mahalanobis de 1,8 em 2015 para 2,4 em 2020 de SPS com Sem-P. Este aumento também ocorreu de FN *vs.* SPS, de 2,3 em 2015 para 3,1 em 2020.

Embora não esperássemos, o teor de K trocável do solo nos dois anos foi inversamente proporcional aos rendimentos de grãos, ou seja, foram negativamente correlacionados. Isto sugere um possível excesso de K no sistema.

2.5. Discussão

Na maior parte das safras, as plantas de cobertura melhoraram os rendimentos do milho e soja devidos aos efeitos positivos acima e abaixo do solo. Estas respostas foram dependentes das fontes fosfatadas, em safras com entradas de P apresentaram baixa variabilidade, porém maiores explorando o *legacy* P (Fig. 3, 5 e 6, Tab. S2). Este achados são coerentes com meta-análise recente de Hallama et al. (2019). Desde a 1ª safra, a produção de biomassa das plantas de cobertura variou conforme a espécie, mas os reflexos sobre o rendimento da cultura principal iniciaram após a 5ª safra, ou seja, efeito acumulado e de longo-prazo que é frequentemente relatado na literatura (Li et al., 2021). Estas respostas são devido aos mecanismos facilitadores de espécies específicas que exploram diferentes nichos do solo. As facilitações podem ser abióticas diretas (*eg.*: melhoria do microclima acima do solo e enriquecimento de recursos abaixo do solo) e facilitações bióticas indiretas (por exemplo, mobilização de nutrientes mediada por micróbios, proteção contra patógenos e pragas, e *feedback* bióticos) (Yu et al., 2022).

Curiosamente as plantas de cobertura aumentaram o rendimento da soja sob Sem-P na 8º e 9º safras, quando estava explorando o *legacy* P (Fig. 5b, Fig. S2A e B), a níveis ligeiramente semelhantes ao SPS e FN, especialmente sob residual de tremoço-branco, azevém e aveia prata. Nesta condição, o teor de P disponível era ~3 a 15 vezes (médias das duas camadas) menor que SPS e FN na 7º safra, respectivamente, imediatamente antes a estes cultivos. O P disponível e a contribuição direta da ciclagem de P pela biomassa das plantas de cobertura (~11 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de P) não são suficientes para sustentar a produtividade de 3,9 a 4,8 Mg ha⁻¹ de soja observadas sob Sem-P. O restante do P requerido pela soja pode ter sido acessado do *legacy* P do solo (Gatiboni et al., 2021).

Em estudos anteriores nesta mesma área (Soltangheisi et al., 2020), o tremoço-branco apresentou maior acúmulo de P não-lábil e há relatos consistentes que esta espécie possui alta capacidade de mobilizar *legacy* P do solo (Hallama et al., 2019), embora os teste de P de rotina possam não identificar estas diferenças (Pavinato et al., 2017). Além disto, há evidências que a fixação biológica de N (FBN) estimula mecanismos de mutualismo microbiano e de aquisição de P pelas plantas sob deficiência de P. Qin et al. (2022) relataram que estes mecanismos foram maximizados em consórcios de gramíneas com soja explorando o *legacy* P, com estímulos de +73%

na nodulação da soja e aumento de 15% no teor de P nos nódulos, o que pode explicar os resultados obtidos com azevém e aveia preta.

No entanto, houve respostas negativas sob SPS com tremoço-branco, nabo forrageiro e aveia preta, com redução do rendimento em relação ao pousio (e.g. 2013/14, reduziram em 32% o rendimento do milho). São estes efeitos nulos ou negativos no rendimento de grãos que frequentemente impõe barreiras à adoção desta prática nos sistemas agrícolas (Leuthold et al., 2021). Scavo et al. (2022) recentemente indicaram que plantas de cobertura leguminosas tem maior potencial de aumentar o rendimento de grãos devido aporte significativos de N (via FBN) para a cultura subsequente. Já as gramíneas podem esgotar o N disponível do solo e, devido à alta relação C/N, podem imobilizar N disponível durante a decomposição do resíduo de biomassa, que compete diretamente nos estádios de crescimento da cultura comercial (Leuthold et al., 2021; Scavo et al., 2022).

Porém, estas respostas não foram observadas com alta frequência em nosso estudo, devido à aplicação de 40 kg ha⁻¹ N nas plantas de cobertura não-leguminosas para não limitar o crescimento vegetativo. Estas entradas de N também explicam a maior ou igual ciclagem de N por estas plantas comparadas às leguminosas (Fig. 4C e Tab. S4). Mas reiteramos a importância de ervilhaca e tremoço-branco no sistema de produção por reciclarem de 0,8 a 3,2 Mg ha⁻¹ de N total via biomassa, com apenas entradas de N mineral no milho e via FBN.

A maior ciclagem de P pelas plantas de cobertura ocorreu nas safras com entradas de P e moduladas pelas fontes fosfatadas que refletiram na disponibilidade de P (Tab. 2). As médias anuais de absorção de P (Tab. S4) e totais (Fig. 4B) sugerem plasticidade quanto a estratégias de aquisição de P do solo, especialmente para gramíneas onde ocorreram maiores diferenças aos cenários de P (Lambers, 2022) .

2.6. Conclusão

As plantas de cobertura aumentaram a sustentabilidade agrícola por promoverem ganhos em produtividade de grãos (soja ou milho) com ou sem entradas de P no sistema, além de ter aumentado a ciclagem de nutrientes e explorarem o *legacy* P do solo. No início, o fosfato natural apresentou respostas semelhantes ao superfosfato simples, embora mais P total no sistema foi aplicado, mas a produtividade nesta fonte explorando o *legacy* P do solo foi superior. Foi possível cultivar quatro safras explorando o *legacy* P de superfosfato simples sem perdas de produtividade. No controle sem-P, tremoço-branco, azevém e aveia preta aumentaram a produtividade da soja a níveis semelhantes às fontes fosfatadas.

Referências

- Cordell, D., & White, S. (2014). Life's bottleneck: Sustaining the world's phosphorus for a food secure future. *Annual Review of Environment and Resources*, 39(1), 161–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-010213-113300>
- Doydora, S., Gatiboni, L., Grieger, K., Hesterberg, D., Jones, J. L., McLamore, E. S., Peters, R., Sozzani, R., Van den Broeck, L., & Duckworth, O. W. (2020). Accessing Legacy Phosphorus in Soils. *Soil Systems*, 4(4), 74. <https://doi.org/10.3390/SOILSYSTEMS4040074>
- Gatiboni, L. C., Schmitt, D. E., Tiecher, T., Veloso, M. G., dos Santos, D. R., Kaminski, J., & Brunetto, G. (2021). Plant uptake of legacy phosphorus from soils without P fertilization. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 119(1), 139–151. <https://doi.org/10.1007/s10705-020-10109-2>
- Hair, J. F. J., Black, W. C., Badin, B. J., Anderson, R. E., & Tatham, R. L. (2009). *Análise multivariada de dados* (A. S. Sant'Anna & Consultoria (eds.); 6th ed.). Bookman.
- Hallama, M., Pekrun, C., Lambers, H., & Kandeler, E. (2019). Hidden miners – the roles of cover crops and soil microorganisms in phosphorus cycling through agroecosystems. *Plant and Soil*, 434(1–2), 7–45. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3810-7>
- Hedges, L. V, Gurevitch, J., & Curtis, P. S. (1999). The meta-analysis of response ratios in experimental ecology. *Ecology*, 80(4), 1150–1156. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080)
- Lambers, H. (2022). Phosphorus Acquisition and Utilization in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 73(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102720-125738>
- Langhans, C., Beusen, A. H. W., Mogollón, J. M., & Bouwman, A. F. (2022). Phosphorus for Sustainable Development Goal target of doubling smallholder productivity. *Nature Sustainability*, 5(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00794-4>
- Leuthold, S. J., Salmerón, M., Wendroth, O., & Poffenbarger, H. (2021). Cover crops decrease maize yield variability in sloping landscapes through increased water during reproductive stages. *Field Crops Research*, 265, 108111. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2021.108111>

- Li, X. F., Wang, Z. G., Bao, X. G., Sun, J. H., Yang, S. C., Wang, P., Wang, C. B., Wu, J. P., Liu, X. R., Tian, X. L., Wang, Y., Li, J. P., Wang, Y., Xia, H. Y., Mei, P. P., Wang, X. F., Zhao, J. H., Yu, R. P., Zhang, W. P., ... Li, L. (2021). Long-term increased grain yield and soil fertility from intercropping. *Nature Sustainability*, 4(11), 943–950. <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00767-7>
- Lun, F., Sardans, J., Sun, D., Xiao, X., Liu, M., Li, Z., Wang, C., Hu, Q., Tang, J., Ciais, P., Janssens, I. A., Obersteiner, M., & Peñuelas, J. (2021). Influences of international agricultural trade on the global phosphorus cycle and its associated issues. *Global Environmental Change*, 69, 102282. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2021.102282>
- Oliveira-Filho, J. de S., & Pereira, M. G. (2020). Analyzing the research on phosphorus fractions and phosphorus legacy in soil: a bibliometric analysis. *Journal of Soils and Sediments*, 20(9), 3394–3405. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02669-1>
- Pavinato, P. S., Cherubin, M. R., Soltangheisi, A., Rocha, G. C., Chadwick, D. R., & Jones, D. L. (2020). Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72302-1>
- Pavinato, P. S., Rodrigues, M., Soltangheisi, A., Sartor, L. R., & Withers, P. J. A. (2017). Effects of Cover Crops and Phosphorus Sources on Maize Yield, Phosphorus Uptake, and Phosphorus Use Efficiency. *Agronomy Journal*, 109(3), 1039–1047. <https://doi.org/10.2134/agronj2016.06.0323>
- Qin, X., Pan, H., Xiao, J., Tang, L., & Zheng, Y. (2022). Increased nodular P level induced by intercropping stimulated nodulation in soybean under phosphorus deficiency. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05668-z>
- Raij, B. van, Cantarella, H., Quaggio, J. A., & Furlani, A. M. C. (1997). *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo (1st ed.)*: IAC. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGB.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=180938>
- Rowe, H., Withers, P. J. A., Baas, P., Chan, N. I., Doody, D., Holiman, J., Jacobs, B., Li, H., MacDonald, G. K., McDowell, R., Sharpley, A. N., Shen, J., Taheri, W., Wallenstein, M., & Weintraub, M. N. (2015). Integrating legacy soil phosphorus into sustainable nutrient management strategies for future food, bioenergy and water security. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 2015 104:3, 104(3), 393–412. <https://doi.org/10.1007/S10705-015-9726-1>

- Roy, E. D., Richards, P. D., Martinelli, L. A., Coletta, L. Della, Lins, S. R. M., Vazquez, F. F., Willig, E., Spera, S. A., VanWey, L. K., & Porder, S. (2016). The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. *Nature Plants* 2016 2:5, 2(5), 1–6. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.43>
- Scavo, A., Fontanazza, S., Restuccia, A., Pesce, G. R., Abbate, C., & Mauromicale, G. (2022). The role of cover crops in improving soil fertility and plant nutritional status in temperate climates. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 2022 42:5, 42(5), 1–25. <https://doi.org/10.1007/S13593-022-00825-0>
- Soltangheisi, A., Rodrigues, M., Coelho, M. J. A., Gasperini, A. M., Sartor, L. R., & Pavinato, P. S. (2018). Changes in soil phosphorus lability promoted by phosphate sources and cover crops. *Soil and Tillage Research*, 179, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.01.006>
- Soltangheisi, A., Teles, A. P. B., Sartor, L. R., & Pavinato, P. S. (2020). Cover cropping may alter legacy phosphorus dynamics under long-term fertilizer addition. *Frontiers in Environmental Science*, 8, 13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00013>
- Tedesco, M., Gianello, C., Bissani, C., & Bohnen, H. (1995). *Análises de solo, plantas e outros materiais* (2nd ed.). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Teixeira, P. C., Donagemma, G. K., Fontana, A., & Teixeira, W. G. (2017). *Manual de métodos de análise de solo* (3rd ed.). Embrapa Solos.
- Teles, A. P. B., Rodrigues, M., Bejarano Herrera, W. F., Soltangheisi, A., Sartor, L. R., Withers, P. J. A., & Pavinato, P. S. (2017). Do cover crops change the lability of phosphorus in a clayey subtropical soil under different phosphate fertilizers? *Soil Use and Management*, 33(1), 34–44. <https://doi.org/10.1111/sum.12327>
- Vermeiren, C., Kerckhof, P., Reheul, D., & Smolders, E. (2022). Increasing soil organic carbon content can enhance the long-term availability of phosphorus in agricultural soils. *European Journal of Soil Science*, 73(1), e13191. <https://doi.org/10.1111/EJSS.13191>
- Yu, R.-P., Yang, H., Xing, Y., Zhang, W.-P., Lambers, H., Li, L., Yu, R.-P., Yang, H., Xing, Y., Zhang, W.-P., Li, L., & Lambers, H. (2022). Belowground processes and sustainability in agroecosystems with intercropping. *Plant and Soil* 2022 476:1, 476(1), 263–288. <https://doi.org/10.1007/S11104-022-05487-1>
- Yu, X., Keitel, C., & Dijkstra, F. A. (2021). Global analysis of phosphorus fertilizer use efficiency in cereal crops. *Global Food Security*, 29, 100545. <https://doi.org/10.1016/J.GFS.2021.100545>

Material suplementar

Tabela S1. Caracterização química e textural do solo no início do experimento em 2009.

Camada (cm)	pH	MO ¹	P-resina	Al ³⁺	H+Al	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	V ²	Argila	Silte	Areia
	CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	----- mmol _e dm ⁻³ -----					%	g kg ⁻¹		
0-5	5,4	40,2	8,1	0,0	34,2	54,0	26,9	5,0	71,5	701,4	259,3	39,3
5-10	5,2	40,2	9,7	0,0	36,8	56,2	29,8	2,8	70,7	739,0	243,2	17,8
10-20	5,0	26,8	4,8	0,8	39,7	43,2	21,3	1,3	62,4	751,5	231,5	17,0

¹Matéria orgânica; ²Saturação por bases.

Tabela S2. Análise de variância dos rendimentos de milho ou soja, massa seca produzida por plantas de cobertura e totais acumulados nas 12 safras com o efeito de fontes de fosfatadas e plantas de cobertura em solo argiloso.

Safras/ano	Fonte de P	Plantas de cobertura (CC)	Fontes x CC	CV (%)			
Massa seca das CC (2009)	0,15097	ns	0,00001	****	0,34	ns	36,00
Milho (2009/10)	0,00227	**	0,4732	ns	0,9587	ns	16,24
Massa seca das CC (2010)	0,00001	****	0,000001	****	0,007079	**	17,06
Milho (2010/11)	0,00001	****	0,349	ns	0,7459	ns	10,05
Massa seca das CC (2011)	0,00003	****	0,00039	***	0,12954	ns	25,12
Milho (2011/12)	0,00001	****	0,2115	ns	0,1766	ns	16,94
Massa seca das CC (2012)	0,525	ns	0,3859	ns	0,5408	ns	35,71
Soja (2012/13) †		----- Sem colheita -----					
Massa seca das CC (2013)	0,000027	****	0,00001	****	0,0000049	****	15,89
Milho (2013/14)	0,00001	****	0,00005	****	0,0000016	****	9,73
Massa seca das CC (2014)	0,00001	****	0,00001	****	0,00104	**	15,48
Milho (2014/15)	0,00001	****	0,0049	**	0,0225	*	11,09
Massa seca das CC (2015)	0,00004	****	0,00001	****	0,00014	***	18,09
Milho (2015/16)	0,00001	****	0,00001	****	0,00001	****	7,07
Massa seca das CC (2016)	0,00001	****	0,0001	***	0,01091	*	18,2
Soja (2016/17)	0,00001	****	0,045	*	0,0438	*	12,41
Massa seca das CC (2017)	0,00001	****	0,00002	****	0,197	ns	20,32
Soja (2017/18)	0,00001	****	0,264	ns	0,00192	**	8,82
Massa seca das CC (2018)	0,00001	****	0,00002	****	0,0276	*	23,76
Milho (2018/19)	0,00001	****	0,00008	****	0,00001	****	6,51
Massa seca das CC (2019)	0,00001	****	0,00001	****	0,00011	***	21,96
Soja (2019/20)	0,00001	****	0,47	ns	0,386	ns	15,41
Massa seca das CC (2020)	0,00001	****	0,000321	***	0,24	ns	32,11
Milho (2020/21)	0,00001	****	0,000207	***	0,312	ns	16,22
Milho acumulado (8 safras)	0,00001	****	0,00001	****	0,0001	****	4,09
Soja acumulado (3 safras)	0,00001	****	0,0161	*	0,00146	**	6,48
Produção com entradas de P	0,00001	****	0,00001	****	0,0003	***	3,76
Produção explorando o <i>legacy</i> P	0,00001	****	0,00001	****	0,13700	ns	5,43
Produção total (11 safras) †	0,00001	****	0,00001	****	0,00724	**	5,40
Massa seca total das CC com entradas de P	0,00001	****	0,00001	****	0,02274	*	11,08
Massa seca total das CC explorando o <i>legacy</i> P	0,00001	****	0,00001	****	0,00032	***	12,00
Massa seca total das CC (12 safras)	0,00001	****	0,00001	****	0,00001	****	8,48

† Em 2012/13 não houve colheita; CC: plantas de cobertura; ns: não significativo, $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$,

Tabela S3. Análise de variância da absorção acumulada e média anual de P, N e K pelas plantas de cobertura sob efeito de fontes fosfatadas, Dois Vizinhos-PR.

Absorção por cenário de P	Fontes de P	Plantas de cobertura (CC)	Fontes x CC	CV (%)
----- Absorção acumulada -----				
Absorção de P com entradas de P	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00001 ****	14,60
Absorção de P explorando legacy P	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00051 ***	12,28
Absorção de P total	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00001 ****	10,13
Absorção de N com entradas de P	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00047 ***	11,25
Absorção de N explorando legacy P	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00001 ****	14,96
Absorção de N total	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00686 **	9,48
Absorção de K com entradas de P	0,00254 **	0,00001 ****	0,00268 **	14,65
Absorção de K explorando legacy P	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00026 ***	13,70
Absorção de All K total	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00011 ***	10,17
----- Absorção média anual -----				
Absorção de P com entradas de P	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00001 ****	14,11
Absorção de P explorando legacy P	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00051 ***	12,28
Absorção de N com entradas de P	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00072 ***	11,34
N explorando legacy P	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00001 ****	14,96
Absorção de K com entradas de P	0,00387 **	0,00001 ****	0,00464 **	14,73
K explorando legacy P	0,00001 ****	0,00001 ****	0,00026 ***	13,70

ns = not significant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$,

Tabela S4. Absorção média de P, N e K pelas plantas de cobertura em anos com entradas de P e explorando o *legacy* P. Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

Fontes	Ervilhaca	Tremoço-branco	Nabo forrageiro	Azevém	Aveia preta	Centeio	Média
----- Média de absorção de P com entradas de P (kg ha ⁻¹ ano ⁻¹) -----							
Sem-P	6,3 Bb	14,7 a	11,3 Cab	10,9 Bab	12,2 Ba	11,4 ab	11,1
SPS	9,2 ABc	14,8b	26,7 Ba	13,1 Bbc	22,9 Aa	13,9 bc	16,8
FN	13,0 Ac	15,4 bc	32,9 Aa	18,5 Ab	15,1 Bbc	14,4 bc	18,2
Média	9,5	15,0	23,6	14,2	16,8	13,2	
----- Média de absorção de P explorando <i>legacy</i> P (kg ha ⁻¹ ano ⁻¹) -----							
Sem-P	3,0 Cb	3,4 Cb	4,1 Cb	5,2 Cab	7,3 Ca	5,2 Bab	4,7
SPS	9,3 Bb	8,4 Bb	7,8 Bb	10,3 Bb	15,2 Ba	15,4 Aa	11,1
FN	13 Ab	14,8 Aab	16,4 Aa	15,8 Aab	17,7 Aa	15,8 Aab	15,6
Média	8,4	8,9	9,4	10,4	13,4	12,1	
----- Média de absorção de N com entradas de P (kg ha ⁻¹ ano ⁻¹) -----							
Sem-P	71,5 Bd	197,4 a	111,8 Bbc	111,9 Abc	129,3 b	86,6 Ccd	118,1
SPS	102,3 Ad	199,8 a	157,0 Ab	112,3 Ad	147,6 bc	115,0 Bd	139,0
FN	112,2 Ac	176,6a	185,0 Aa	151,1 Bab	132,9bc	130,8 Abc	148,1
Média	95,4	191,3	151,3	125,1	136,6	110,8	
----- Média de absorção de N explorando <i>legacy</i> P (kg ha ⁻¹ ano ⁻¹) -----							
Sem-P	28,7 Bb	28,8 Cb	36,7 Bab	40,3 Bab	60,2 Ba	39,4 Bab	39,0
SPS	111,3 Aa	110,1 Ba	85,8 Aab	69,8 Ab	105,9 Aa	110,3 Aa	98,9
FN	90,9 Ac	163,0 Aa	95,0 Ac	94,2 Ac	110,8 Abc	125,9 Ab	113,3
Média	77,0	100,6	72,5	68,1	92,3	91,9	
----- Média de absorção de K com entradas de P (kg ha ⁻¹ ano ⁻¹) -----							
Sem-P	26,0 c	38,3 abc	44,1 Bab	38,8 Babc	53,0 a	35,9 bc	39,3
SPS	28,9 c	45,0 ab	56,1 Ba	51,4 Aa	53,7 a	33,0 bc	44,7
FN	29,5 d	40,9 cd	71,7 Aa	57,8 Aab	47,6 bc	33,6 cd	46,9
Média	28,1	41,4	57,3	49,3	51,4	34,2	
----- Média de absorção de K explorando <i>legacy</i> P (kg ha ⁻¹ ano ⁻¹) -----							
Sem-P	19,7 Bbc	12,4 Cc	13,2 Cc	25,7 Bb	43,1 Ba	28,3 Bb	23,7
SPS	27,0 ABc	28,9 Bc	26,6 Bc	41,7 Ab	47,3 Bab	54,1 Aa	37,6
FN	32,8 Ac	42,4 Abc	51,6 Ab	47,5 Ab	65,7 Aa	50,0 Ab	48,3
Média	26,5	27,9	30,5	38,3	52,0	44,1	

Letras iguais maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural

Tabela S5. Análise da variância das propriedades químicas do solo após 7° safras com entradas de P (2015) e 12° ou 5° safras explorando o *legacy* P (2020) com efeitos de fontes fosfatadas e plantas de cobertura, Dois Vizinhos-PR.

Fator de variação	Propriedades químicas do solo							
	2015	P-resina		MO		pH		K ⁺
Fonte de P (SP)	0,00001	****	0,06490	ns	0,00001	****	0,00001	****
Plantas de cobertura (CC)	0,00001	****	0,00010	***	0,33030	ns	0,00001	****
SP x CC	0,00001	****	0,00140	**	0,00010	***	0,00001	****
Camada (SD)	0,00001	****	0,00001	****	0,40510	ns	0,00001	****
SP x SD	0,00001	****	0,16430	ns	0,32300	ns	0,66470	ns
CC X SD	0,00040	***	0,07440	ns	0,01025	*	0,27680	ns
SP x CC x SD	0,00001	****	0,00140	**	0,7054	ns	0,01160	*
CV%	29,06		7,65		5,49		19,72	

Fator de variação	Propriedades químicas do solo							
	2020	P-resina		MO		pH		K ⁺
Fontes de P (SP)	0,00001	****	0,00001	****	0,00001	****	0,00001	**
Plantas de cobertura (CC)	0,00001	****	0,0012	**	0,0056	**	0,00001	****
SP x CC	0,00001	****	0,00001	****	0,00001	****	0,00001	****
Camada (SD)	0,00001	****	0,00001	****	0,00001	****	0,00001	***
SP x SD	0,00001	****	0,7565	ns	0,00001	****	0,00001	ns
CC X SD	0,00001	****	0,0009	***	0,5038	ns	0,0001	ns
SP x CC x SD	0,00001	****	0,0006	***	0,0003	***	0,00001	ns
CV%	13,56		4,12		3,36		13,28	

MO: matéria orgânica; CV%: coeficiente de variação ns = não significativo ($p > 0,05$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Tabela S6. Teor de K⁺ trocável no solo em 2015 (7° safra) e 2020 (12° safra ou 5ª explorando *legacy* P) com fontes fosfatadas e culturas de cobertura, Dois Vizinhos-PR.

Fontes/Camadas	Pousio	Ervilhaca	Tremoço-branco	Nabo forrageiro	Azevém	Aveia preta	Centeio	Média
----- K ⁺ em 2015 (mmol _c dm ⁻³) -----								
0-10 cm								
Sem-P	5,27 ab	3,78 b	4,72 Aab	4,05 Bab	4,12 ab	4,42 Aab	5,57 Aa	4,56
SPS	4,60 ab	3,18 bc	2,70 Bc	5,97 Aa	3,22 bc	3,18 Bbc	4,25 Bbc	3,87
FN	4,83	3,82	3,90 AB	3,88 B	3,30	4,33 AB	3,98 B	4,01
Média	4,90	3,59	3,77	4,63	3,54	3,98	4,60	
10-30 cm								
Sem-P	2,43 ab	1,29 b	3,27 Aa	3,09 Aa	3,18 Aa	2,76 ab	2,82 ab	2,69
SPS	2,49	2,16	1,08 B	2,37 AB	2,28 A	1,83	2,13	2,05
FN	3,09 a	1,77 ab	1,59 Bab	1,68 Bab	0,84 Bb	2,58 a	2,10 ab	1,95
Média	2,67	1,74	1,98	2,38	2,10	2,39	2,35	
----- K ⁺ em 2020 (mmol _c dm ⁻³) -----								
0-10 cm								
Sem-P	4,9 Abcd	4,6 Acd	5,6 Ab	4,4 Ad	5,4 Abc	6,7 Aa	7,2 Aa	5,6
SPS	4,1 Ba	1,9 Bd	2,7 Bcd	4,5 Aa	3,8 Bab	2,3 Bcd	2,9 Bbc	3,2
FN	5,5 Aa	2,3 Bc	2,6 Bbc	3,5 Bb	2,9 Cbc	2,8 Bbc	2,4 Bc	3,1
Média	4,9	2,9	3,7	4,1	4,1	3,9	4,2	
10-30 cm								
Sem-P	2,5 Abc	1,9 Acd	2,5 Abcd	1,6 d	2,2 Acd	3,1 Aab	3,7 Aa	2,5
SPS	1,2 B	0,9 B	1,2 B	1,3	1,3 B	0,8 B	0,8 B	1,1
FN	1,8 Ba	0,7 Bb	0,9 Bab	1,3 ab	1,4 Bab	1,1 Bab	1,1 Bab	1,2
Média	1,9	1,2	1,6	1,4	1,6	1,6	1,9	

Letras iguais maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

Tabela S7. Teor de matéria orgânica (MO) do solo em 2015 (7° culturas) e 2020 (12° culturas ou 5° explorando *legacy* P) com fontes fosfatadas e culturas de cobertura, Dois Vizinhos-PR.

Fontes/Camadas	Pousio	Ervilhaca	Tremoço-branco	Nabo forrageiro	Azevém	Aveia preta	Centeio	Média
----- MO em 2015 (g dm ⁻³) -----								
0-10 cm								
Sem-P	42,3 Aab	47,2a	39,2 Bb	39,2 b	48,5 a	45,2 ab	46,5 a	44,0
SPS	35,7 Bb	41,5 ab	42,3 Bab	43,7 a	43,7 a	43,8 a	44,5 a	42,2
FN	43,0 Aab	46,8 ab	48,3 Aa	41,5 ab	45,5 ab	43,0 ab	40,7 b	44,1
Média	40,3	45,2	43,3	41,4	45,9	44,0	43,9	
10-30 cm								
Sem-P	34,0 b	34,6 ab	33,6 b	32,3 b	41,7 Aa	30,4 b	31,4 b	34,0
SPS	34,6	36,9	29,7	31,7	32,0 B	34,0	30,7	32,8
FN	33,6	31,7	34,0	28,8	33,6 B	31,7	33,3	32,4
Média	34,1	34,4	32,4	30,9	35,8	32,0	31,8	
----- MO em 2020 (g dm ⁻³) -----								
0-10 cm								
Sem-P	43,4 c	47,6 Aa	43,8 Bbc	44,9 Aabc	44,7 abc	46,5 abc	47,1 Aab	45,4
SPS	42,4 c	48,9 Aa	47,6 Aa	46,8 Aab	43,2 bc	46,2 ab	48,7 Aa	46,3
FN	45,3 ab	42,1 Bb	42,2 Bb	41,9 Bb	46,2 a	47,0 a	43,8 Bab	44,1
Média	43,7	46,2	44,5	44,5	44,7	46,5	46,5	
10-30 cm								
Sem-P	29,1 Bb	27,3 Bb	29,9 Bab	29,8 ab	29,4 ab	32,9 Aa	31,0 ab	29,9
SPS	30,1 ABab	33,1 Aa	33,4 Aa	28,8 b	30,4 ab	28,9 Bb	30,8 ab	30,8
FN	32,4 Aa	26,4 Bc	28,5 Bbc	27,2 c	29,7 abc	27,6 Bbc	31,1 ab	29
Média	30,5	28,9	30,6	28,6	29,8	29,8	30,9	

Letras iguais maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

Tabela S8. O pH do solo em 2015 (7° safra) e 2020 (12° safra ou 5° explorando *legacy* P) com fontes fosfatadas e culturas de cobertura, Dois Vizinhos-PR.

Fontes/Camadas	Pousio	Ervilhaca	Tremoço-branco	Nabo forrageiro	Azevém	Aveia preta	Centeio	Média
----- pH em 2015 (CaCl ₂) -----								
Sem-P	4,7 Bcd	5,1 Aa	5,0 Aab	4,6 Bcd	4,7 c	4,4 Bd	4,7 c	4,7
SPS	4,8 ABab	4,6 Bb	4,6 Bb	4,8 Bab	4,7 b	5,0 Aa	4,9 Aab	4,8
FN	4,9 A	4,7 B	4,9 A	5 A	4,9	4,9 A	4,8 A	4,9
Média	4,8	4,8	4,9	4,8	4,7	4,8	4,8	
0-10 cm	4,9 ab	4,8 ab	4,8 ab	4,9 Aa	4,7 b	4,8 ab	4,8 ab	4,8
10-30 cm	4,8	4,8	4,9	4,6 B	4,8	4,7 A	4,8	4,8
Média	4,8	4,8	4,9	4,8	4,7	4,8	4,8	
----- pH em 2020 (CaCl ₂) -----								
Sem-P	4,7 Bcd	5,1 Aa	5,0 Aab	4,6 Bcd	4,7 c	4,4 Bd	4,7 c	4,7
SPS	4,8 ABab	4,6 Bb	4,6 Bb	4,8 Bab	4,7 b	5,0 Aa	4,9 ab	4,8
FN	4,9 A	4,7 B	4,9 A	5,0 A	4,9	4,9 A	4,8	4,9
Média	4,8	4,8	4,9	4,8	4,7	4,8	4,8	
0-10 cm	4,9 ab	4,8 ab	4,8 ab	4,9 Aa	4,7 Bb	4,8 ab	4,8 ab	4,8
10-30 cm	4,8 a	4,8 a	4,9 a	4,7 Ba	4,8 Aa	4,7 a	4,8	4,8
Média	4,8	4,8	4,9	4,8	4,7	4,8	4,8	

Letras iguais maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

Tabela S9. Contribuição das variáveis para a formação dos três primeiros componentes a partir dos efeitos das plantas de cobertura e fontes fosfatadas em 2015 e 2020.

PCA/ano	Produtividade	DM.CC	P absorvido	N absorvido	K absorvido	pH	MO	P-AER	K ⁺
2015									
PC1	2,88	21,25	23,44	24,80	23,26	0,01	0,81	1,48	2,06
PC2	24,68	0,33	0,26	0,17	4,69	34,14	0,92	31,56	3,24
PC3	4,17	0,00	0,00	0,00	0,44	3,39	36,05	11,05	44,88
2020									
PC1	13,21	13,84	20,18	20,18	16,94	0,81	1,99	1,48	11,36
PC2	12,80	2,20	5,87	2,21	10,48	8,14	16,95	35,17	6,18
PC3	0,20	0,09	0,27	2,14	0,13	63,29	30,59	0,46	2,84

DM.CC: massa seca das plantas de cobertura; MO: matéria orgânica; P.AER: P resina.

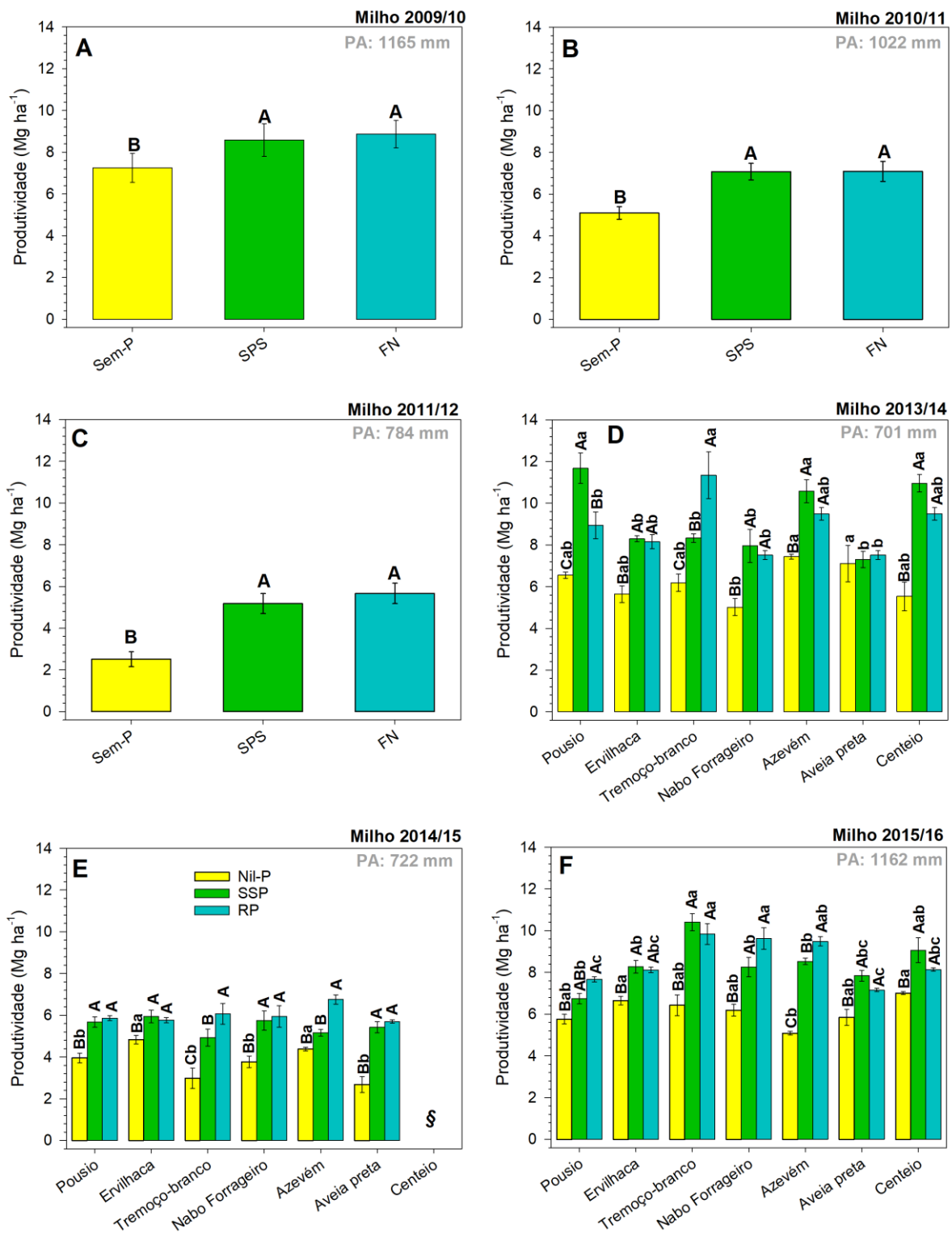


Figura S1. Produtividade do milho (Mg ha⁻¹) em função das fontes fosfatadas e plantas de cobertura de 2009/10 a 2015/16 em solo argiloso, Dois Vizinhos-PR. Letras iguais maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural; PA: precipitação acumulada; §: parcelas perdidas.

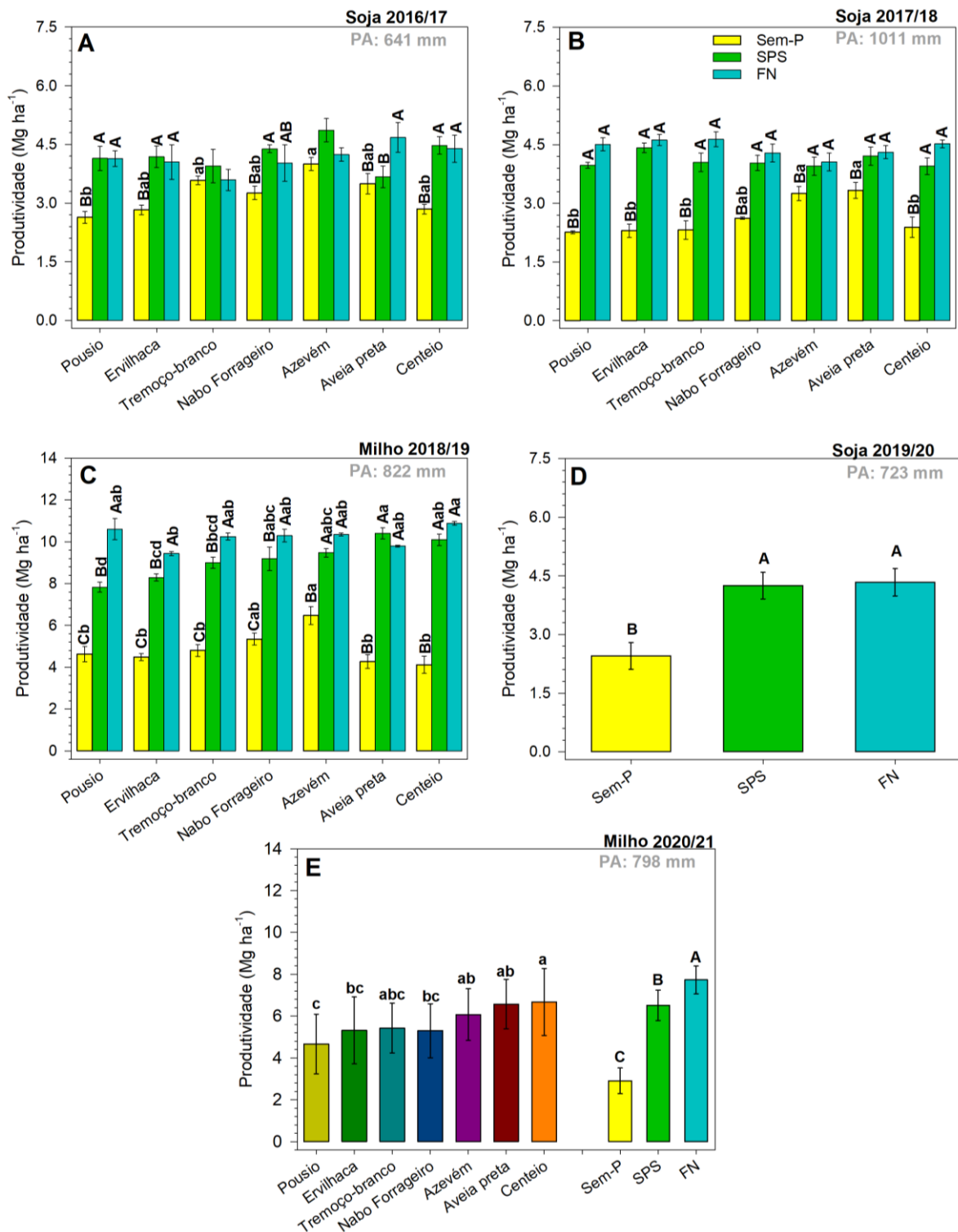


Figura S2. Produtividade do milho e soja (Mg ha^{-1}) em função das fontes fosfatadas e plantas de cobertura de 2016/17 a 2020/21, Dois Vizinhos-PR. Letras iguais maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural; PA: precipitação acumulada.

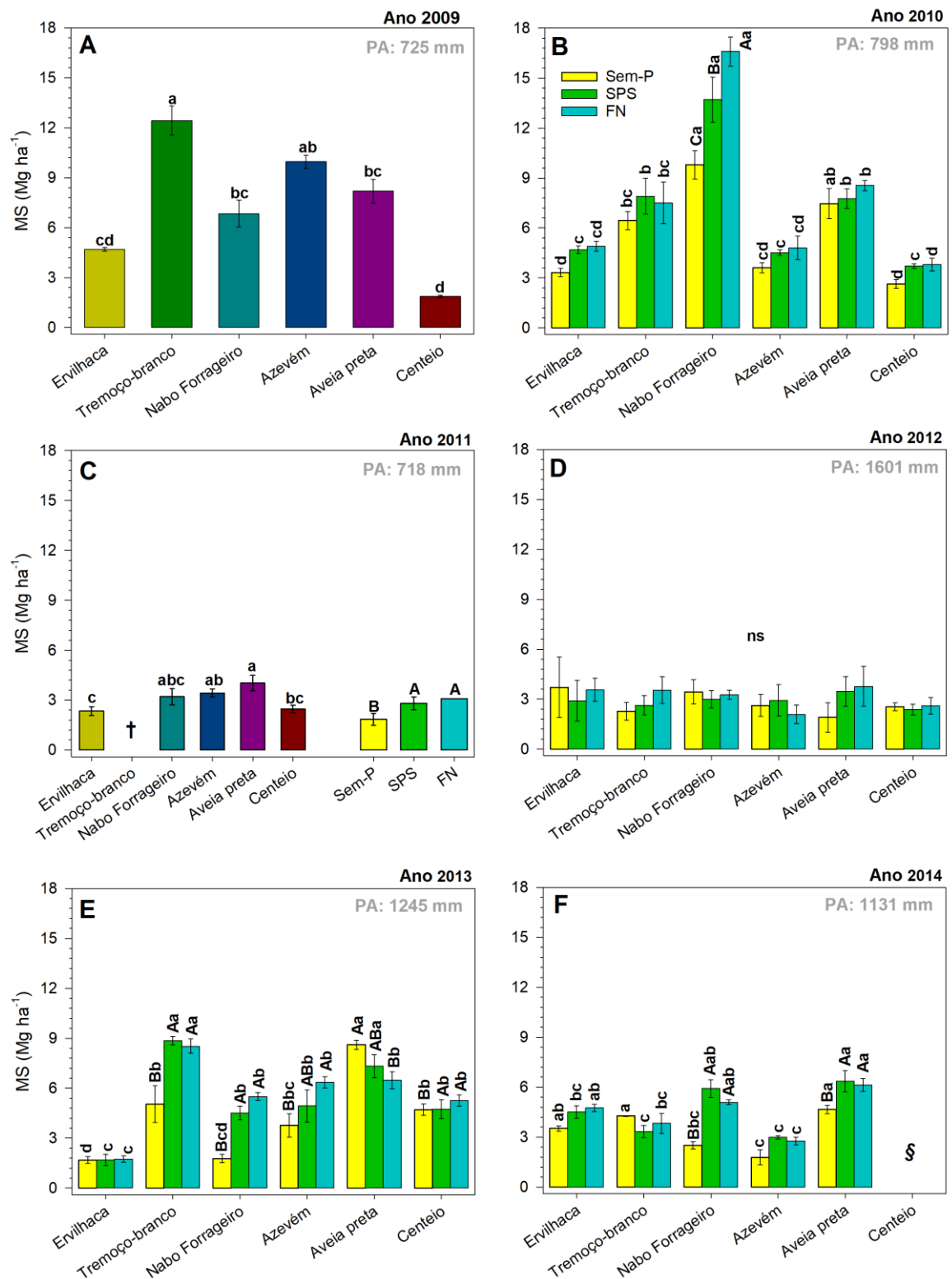


Figura S3. Massa seca das plantas de cobertura (MS, Mg ha⁻¹) em função das fontes fosfatadas de 2009 a 2014, Dois Vizinhos-PR. Letras iguais maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural. PA: precipitação acumulada. † e § plantas de cobertura não completaram o ciclo.

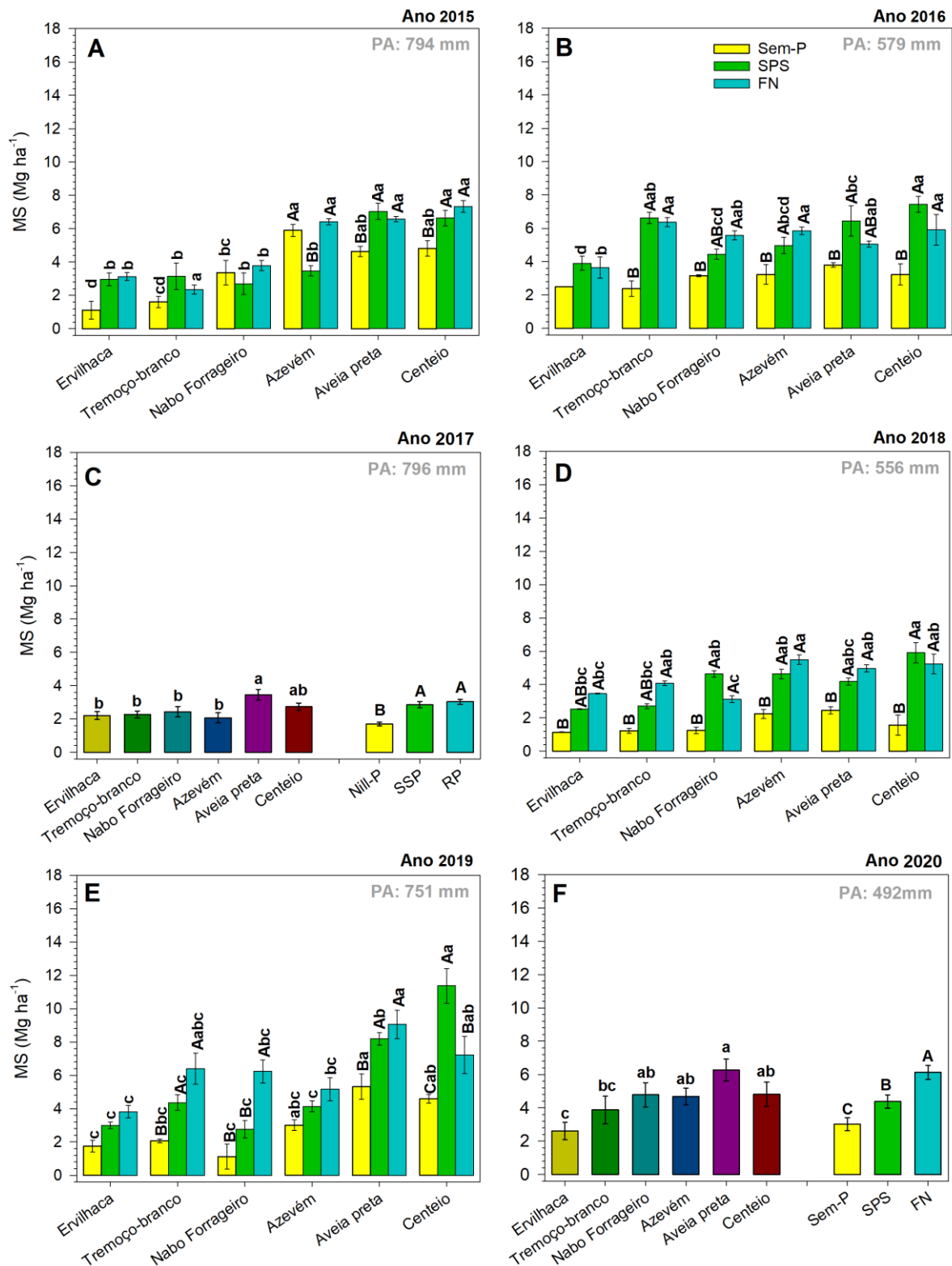


Figura S4. Massa seca das plantas de cobertura (MS, Mg ha⁻¹) em função das fontes fosfatadas de 2015 a 2020, Dois Vizinhos-PR. Letras iguais maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. ns: não significativo pelo teste F ($p > 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural; PA: precipitação acumulada.

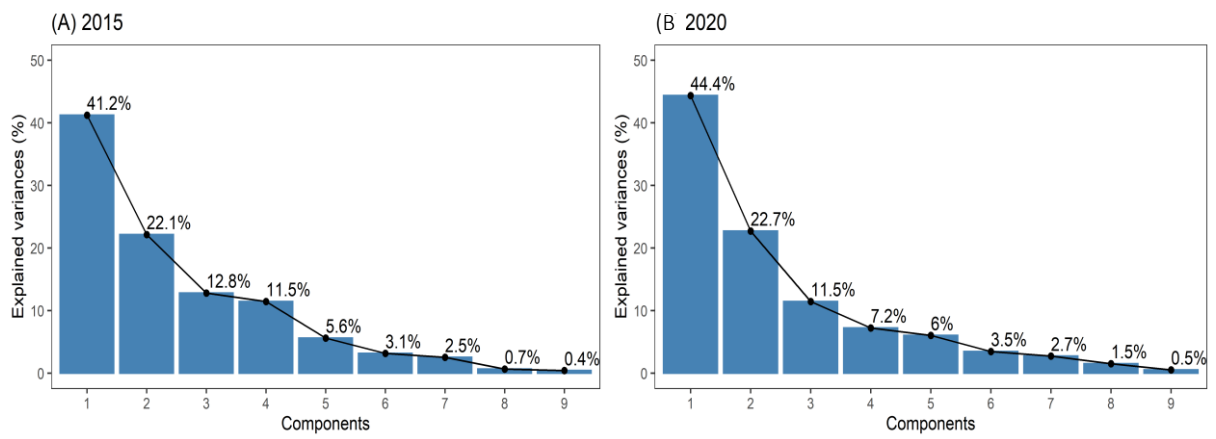


Figura S5. Autovalores ou variância explicados pelos componentes gerados a partir dos efeitos de plantas de cobertura e fontes fosfatadas em 2015 (A) e 2020 (B) nas variáveis avaliadas.

3. EXPLORANDO O LEGACY P COM PLANTAS DE COBERTURA: DINÂMICA DO P A LONGO- PRAZO EM SOLO ARGILOSO TROPICAL

Resumo

O uso frequente fertilizantes fosfatados resulta no acúmulo de P nos solos (também conhecido como *legacy P*) em formas químicas de baixo aproveitamento pelas culturas comerciais. O cultivo de plantas de coberturas, na entressafra, pode aumentar a disponibilidade de P para as culturas comerciais por possuírem diferentes estratégias de aquisição de P. Porém, não há estudos que descrevam a sustentabilidade de explorar o *legacy P* em solos tropicais. Desta forma, o objetivo foi avaliar alterações promovidas por plantas de cobertura nas frações e especiação química de P do solo em sistemas a longo prazo, com cinco anos explorando o *legacy P*. O estudo foi conduzido em um Latossolo no Sul do Brasil por 12 anos, cultivado com soja/milho sob semeadura direta. Os tratamentos foram compostos por cinco plantas de cobertura de inverno e um pousio, associadas com duas fontes fosfatadas [superfosfato simples (SPS) e fosfato natural (FN)] e sem adição de P (Sem-P). A fertilização fosfatada ocorreu nos primeiros setes anos do experimento, e os últimos cinco anos foram sob supressão de P. Determinou-se o fracionamento químico de P, atributos químicos e atividades enzimáticas do solo. Os reservatórios de P lábil foram compostos em média de 83, 69 e 52% por Po lábil para Sem-P, SPS e FN, respectivamente. Em Po lábil houve diferença das plantas cobertura apenas em Sem-P (12 anos explorando *legacy P*), onde ervilhaca, azevém e tremoço foram inferiores 24, 17 e 14% ao pousio. Na atividade da fosfatase ácida, o tremoço-branco foi superior as outras plantas de cobertura e se destacou na fonte SPS, 46% superior ao pousio. O efeito das plantas de cobertura na dinâmica de P foi modulado principalmente pelas fontes fosfatadas devido as diferenças no P total aplicado. Nabo forrageiro e aveia preta foram as espécies que mais esgotaram estas frações de P menos lábeis.

Palavras-chaves: Frações de P, Fosfatase ácida, Especiação química de P

Abstract

The frequent use of phosphate fertilizers results in the accumulation of P in soils (also known as *legacy P*) in chemical forms of low utilization by cash crops. The cultivation of cover crops in the off-season can increase the availability of P for cash crops because they have different strategies for acquiring P. However, no studies describe the sustainability of exploring *legacy P* in tropical soils. The objective was to evaluate changes promoted by cover crops in fractions, chemical speciation of soil P in long-term systems, with five years exploring the *legacy P*. The study was conducted in a Oxisol in southern Brazil for 12 years, cultivated with soybean/corn under no-sowing. The treatments were composed of five winter cover crops and one fallow, associated with two phosphate sources [simple superphosphate (SSP) and rock phosphate (RP)] and without the P inputs (Nil-P). Phosphate fertilization occurred in the first seven years of the experiment, and the last five years were under P suppression. Were determined chemical P fractionation, speciation of the ^{31}P NMR, and microbial indicators of the soil. On average, the labile P pools were 83, 69, and 52% by labile Po for Nil-P, SSP, and RP, respectively. In labile Po there was a difference of cover plants only in Nil-P (12 years exploring *legacy P*), common vetch, ryegrass, and white lupin were lower than 24, 17, and 14% to the fallow. In the activity of acid phosphatase, white lupin was superior to the other cover plants and stood out in the SSP source, was 46% higher than fallow.

Phosphate sources mainly modulated the effect of the cover crops on P dynamics due to differences in the total P applied. Fodder radish and black oat were the species that most exhausted these fractions of P loss labile.

Keywords: P fractions, Acid Phosphatase, Speciation of P

3.1. Introdução

O fósforo não é o nutriente mais requerido pelas plantas, porém, é o nutriente que mais limita a produção agrícola e dos ecossistemas terrestres (Weil & Brady, 2017). Dessa forma, torna-o um nutriente-chave para o futuro da segurança alimentar-energética-hídrica, com consequências diretas sobre o desenvolvimento socioeconômico mundial (Cordell & White, 2014; Lun et al., 2021).

Em solos tropicais, a dinâmica deste nutriente é fortemente afetada pelos baixos teores naturais e, principalmente, pela alta capacidade de adsorção de P. Cerca de 60% dos fertilizantes fosfatados utilizados na agricultura brasileira são importados, sendo que as rochas fosfáticas nacionais fornecem quantidades limitadas devido à baixa solubilidade da rocha ígnea e altos custos de processamento, com vida útil estimada em ~50 anos (Pavinato et al., 2020; Withers et al., 2018).

A aplicação de fertilizantes fosfatados em quantidades maiores do que a demandada das plantas resulta na acumulação de P no solo ao longo dos anos das safras agrícolas (também chamado P-residual, ou *legacy* P pela comunidade internacional) (Oliveira-Filho & Pereira, 2020). Uma forma de promover o uso mais eficiente deste nutriente, que para o milho é <60% (Pavinato et al., 2021), é explorar/acessar as formas de P acumulado no solo (Soltangheisi et al., 2020). Explorar o P-residual, ou *legacy* P, está surgindo como um grande desafio para pesquisas atuais (*hotspot*). (Pavinato et al., 2020) determinaram que a taxa de acúmulo de P nos solos brasileiros está em ~1,6 milhão de t ano⁻¹, e conseguir acessar esse recurso pode gerar uma economia de 20,8 bi de US\$ para agricultura brasileira.

Apesar do grande potencial destas reservas, para aumentar a sustentabilidade da agricultura, muitas questões ainda permanecem incertas como, por exemplo, a maior parte do *legacy* P (~94%) não estão prontamente disponíveis (Soltangheisi et al., 2020) para as plantas absorverem facilmente. Além disto, até que ponto e por quanto tempo pode-se suprimir a demanda das culturas de forma agrônômica e economicamente viável (Pavinato et al., 2021).

O cultivo de plantas de cobertura na entressafra vem sendo difundido como excelente estratégia para aumentar a disponibilidade de P_i para as culturas comerciais (Guedes et al., 2020; Hallama et al., 2019; Pavinato et al., 2017; Rheinheimer et al., 2019; Soltangheisi et al., 2020; Teles et al., 2017). As plantas de cobertura possuem diferentes estratégias e mecanismos fisiológicos para

absorver o P do solo, evidenciando que existem espécies que conseguem adquirir P de frações menos disponíveis (Soltangheisi et al., 2020).

Embora esses mecanismos estejam bem descritos (visto na tópico introdução geral), os resultados das plantas de cobertura sobre a ciclagem de P e as respostas das culturas comerciais ainda são inconclusivos. Em solos brasileiros com alta capacidade máxima de adsorção de P (CMAP), Almeida & Rosolem (2016) e Pavinato et al. (2017) relatam que as plantas cobertura reduzem as frações de P menos lábeis do solo, sem afetar as frações lábeis, porém, não houve resultados consistentes sobre o rendimento das culturas comerciais (soja e milho). Por outro lado, Dube et al. (2014) descrevem que as frações de P não foram afetadas, mas registraram aumento na produtividade do milho.

Em uma meta-análise recente, Hallama et al. (2019) descrevem que os benefícios das plantas de cobertura sobre a dinâmica de P é fortemente influenciada pelo tamanho do legacy P (reservatório de P total) no solo. Além disso, a disponibilidade de P no solo e a qualidade dos resíduos culturais exercem forte influência na interação das plantas de cobertura com a comunidade microbiana do solo que maximizam as estratégias de aquisição de P. O objetivo foi avaliar alterações promovidas por plantas de cobertura nas frações, especiação e ciclagem de P do solo em sistemas a longo prazo, com cinco anos explorando o legacy P. Desta forma, testamos a hipótese que as plantas de cobertura modificam a dinâmica do fósforo (frações e formas) em manejo agrícola que explorar o *legacy* P (ou P residual) do solo.

3.2. Material e Métodos

O estudo foi realizado em experimento de longa duração conduzido desde 2009 (na safra 2020/2021 completou 12 anos de condução) na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), município de Dois Vizinhos - PR (25 44' 05" S, 53 03' 31" W), a 509 m de altitude. A classificação climática, segundo Köppen, é subtropical úmido mesotérmico, tipo "Cfa" (Alvares et al., 2013). A temperatura média nos meses mais quentes é 22 °C e nos mais frios 13 °C, com pluviosidade média anual de 2100 mm. Antes da instalação do experimento, a área foi cultivada desde 2001 no sistema de semeadura direta, com culturas comerciais (milho e soja no verão, trigo ou aveia no inverno).

O teor de P disponível no solo (resina de troca aniônica, RTA) no estabelecimento do experimento era classificado como baixo nas camadas de 0–5 cm (8,1 mg kg⁻¹) e 5-10 cm (9,7 mg kg⁻¹), e muito baixo na camada de 10-20 cm (4,8 mg kg⁻¹), de acordo com (RAIJ et al., 1997). A

capacidade máxima de adsorção de P (CMAP) do solo da área experimental era alta, 1600 mg kg⁻¹ de solo (Teles et al., 2017).

3.2.1. Desenho experimental

O delineamento experimental foi estabelecido em blocos casualizados, com parcelas subdivididas, em esquema fatorial 3 x 6, com três repetições. O primeiro fator foi composto por fontes fosfatadas: fosfato natural da Argélia (FN, 9% de P₂O₅ solúvel e 29% de P₂O₅ total), superfosfato simples (SPS, 18% de P₂O₅ solúvel) e um controle (Sem-P, sem aplicação de fosfato). O segundo fator por plantas de coberturas de inverno (ervilhaca - *Vicia sativa*, tremoço-branco - *Lupinus albus*, nabo forrageiro - *Raphanus sativus*, azevém - *Lolium multiflorum* e aveia preta - *Avena strigosa*) e um pousio com dessecação frequente das plantas espontâneas. As fontes fosfatadas constituíram as parcelas, e as espécies de plantas de cobertura as subparcelas. Cada subparcela apresentava 5 x 5 m (25 m²).

A adubação fosfatada foi realizada anualmente ao longo das safras de 2009 até 2015, com dose média de 46 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de P solúvel, sendo aplicada a lanço e sem incorporação (total de 335 kg ha⁻¹ ano⁻¹ para SSP e 1078 kg ha⁻¹ ano⁻¹ para FN). Essa adubação foi interrompida a partir de 2016, pois o P-RTA atingiu níveis muito altos (> 50 mg kg⁻¹) nas parcelas fertilizadas (Raij et al., 1997). Dessa forma, do ciclo 2016 em diante foi explorado o efeito residual das fertilizações fosfatadas. Em síntese, foram fertilizados 7 anos e 5 anos sob supressão de P.

Ao longo dos 12 anos, a semeadura das plantas de cobertura foi realizada na primeira quinzena de maio, manualmente, logo após a colheita da safra de verão. A quantidade de sementes viáveis utilizadas foi de 70 kg ha⁻¹ de ervilhaca, 100 kg ha⁻¹ de tremoço-branco, 20 kg ha⁻¹ de nabo forrageiro, 20 kg ha⁻¹ de azevém (cultivar Barjumbo) e 60 kg ha⁻¹ de aveia preta (cultivar IPR 61), todas sementes certificadas. As plantas de cobertura não leguminosas receberam adubação nitrogenada em cobertura, na dose de 40 kg ha⁻¹ de N (via ureia). O manejo das plantas de cobertura foi realizado conforme as recomendações para cada cultura. A dessecação sempre realizada uniformemente em área total em torno de 15-20 dias antes da semeadura das culturas de verão, com aplicação de glifosate [N- (fosfonometil) glicina] (2 L ia ha⁻¹).

A semeadura das culturas de verão (comerciais) foram realizadas sempre na segunda quinzena de outubro. No período, foram 7 safras cultivadas com milho, com ~65 mil plantas ha⁻¹, e 5 safras cultivadas com soja, com ~220 mil plantas ha⁻¹. No milho foram aplicados sempre 120 kg ha⁻¹ de N (via ureia, 44%) parcelado em três aplicações (semeadura, V4-V5 e V7-V8) e a soja inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*. Quanto à adubação potássica foram aplicados 40 kg ha⁻¹

ano⁻¹ de K₂O (via KCl, 60% K₂O) sempre no momento da semeadura do milho/soja em superfície, adubação considerada baixa visto que os níveis de K do solo no início do experimento eram muito altos (Tab. S1)).

3.2.2. Amostragem de solo

Amostras de solo foram coletadas em setembro de 2021 nas camadas de 0–5, 5–10, 10–15 e 15–30 cm de cada parcela, com seis subamostras que foram uniformemente misturadas para compor uma amostra composta (0,5 kg) de cada camada. Parte de cada amostra (0,2 kg) foi armazenada a -4 °C até a determinação do P_{mic} e fosfatase ácida. Além disto, foram amostrados solo intactos com anéis volumétricos (100 cm³), secos a 105 °C por 24 h e a densidade do solo foi calculada. Não houve diferença quando comparados pelo teste de Tukey.

3.2.3. Frações de P e especiação da solução ³¹P em RMN

As amostras de solos foram submetidas ao fracionamento químico sequencial de P proposto por (Hedley et al., 1982) com adaptações de Rodrigues et al. (2016). A extração de P foi na seguinte ordem: P inorgânico lábil foi extraído com resina de troca aniônica (P_{resina}); P lábil inorgânico (P_{BIC}) e orgânico (P_{O_{BIC}}) com 0,5 mol L⁻¹ NaHCO₃ em pH 8,5; P moderadamente lábil inorgânico (P_{NaOH-01}) e orgânico (P_{O_{NaOH-01}}) com 0,1 mol L⁻¹ NaOH; P inorgânico moderadamente lábil (P_{HCl}) com 1,0 mol L⁻¹ HCl; P não lábil inorgânico (P_{NaOH-05}) e orgânico (P_{O_{NaOH-05}}) com 0,5 mol L⁻¹ NaOH; e P residual (P_{residual}), extraído com H₂SO₄+H₂O₂.

A soma das frações de P orgânico (P_{O_{BIC}}, P_{O_{NaOH-01}} e P_{O_{NaOH-05}}) foi denominada P biológico; a soma das frações P inorgânico (P_{BIC}, P_{NaOH-01}, P_{HCl} e P_{NaOH-05}) P geoquímico; e a soma de todas as frações P_{total}. Mais detalhes metodológicos podem ser obtidos em (Rodrigues et al., 2016). Os estoques das frações de P foram calculados multiplicando o teor das frações pela densidade do solo e espessura de cada camada amostrada.

Foi determinada a especiação química do ³¹P em solução com espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ³¹P (³¹P RMN), na camada de 0-5 cm (onde houve maiores diferenças de P no fracionamento químico). A extração de P das amostras foi em duplicata usando 1,0 g de solo com 20 mL de 0,25 mol L⁻¹ NaOH + 0,05 mol L⁻¹ de Na₂EDTA durante 10 h a 25 °C e 33 rpm *over-end-over*, conforme descrito por Aleixo et al. (2020). No extrato foram determinados os teores de Fe e Mn por absorção atômica e o P total por colorimetria (azul de molibdato) após mineralização (H₂SO₄+H₂O₂) dos extratos (Cade-Menun, 2015).

Os espectros de solução ^{31}P RMN foram adquiridos sem desacoplamento de prótons e operando a 202,446 MHz usando um Bruker Avance DRX 600 MHz (Bruker, DE), com pulso de $6,0 \mu\text{s}$ (30°), com tempo de aquisição de 0,4 s, tempo de relaxamento de 0,5 s (T_1) a 21°C com ~ 15.000 varreduras por amostras. Os desvios químicos dos sinais (δ) foram determinados em partes por milhão (ppm) em relação a um padrão externo de H_2PO_4 a 85%.

Todas as áreas com processamento e pico espectral foram calculadas através de integração matemática com o programa TopSpin v.4.2.0. Os sinais atribuídos aos compostos de P foram baseados em relatos da literatura de extratos de solo NaOH-EDTA, e que com interpretações sugeridas por Cade-Menun (2015) e Doolette et al. (2011). As áreas dos picos foram transformadas em concentrações por multiplicação das proporções com o P total dos extratos de NaOH-EDTA.

3.2.4. Indicadores microbiológicos

A atividade da enzima fosfatase ácida (fosfomonoesterase, EC 3.1.3.2) foi avaliada conforme Tabatabai (1994), baseado na determinação colorimétrica do p-nitrofenol (coloração amarela) formado após a adição de p-nitrofenil fosfato (PNF). Estas análises foram realizadas em duplicatas, com um branco para cada amostra e as atividades expressas como $\text{mg p-nitrofenol kg}^{-1}$ de solo h^{-1} .

O P da biomassa microbiana (P_{mic}) foi determinado em três conjuntos de amostras de 5 g de solo armazenado. O primeiro conjunto foi fumigado com clorofórmio (24 h em vácuo) e ao terceiro foram adicionados 50 mg L^{-1} de P na solução extratora para uma correção de P_i adsorvido pelo solo do conjunto de amostras fumigadas. O P foi extraído simultaneamente com bicarbonato de sódio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,5) por 16 h a 33 rpm *over-end-over* (Brookes et al., 1984). A determinação dos teores de P foi o mesmo adotado no fracionamento de P.

3.2.5. Análise estatística

A normalidade (*Shapiro-Wilks*) e homoscedasticidade da variância (*Bartlett*) foram verificadas para cada atributos avaliados, quando não atendidos estes pressupostos foram transformação por Box-Cox. Em seguida, os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA, $p \leq 0,05$), e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), desdobrando os fatores quando houvesse interação significativa. Em seguida, foi aplicado a técnica de componentes principais para explorar a covariação principal das associações entre as variáveis e os tratamentos (Hair et al., 2009).

Todas as análises e gráficos foram realizados no programa R versão 4.0.5 (Team, 2022), com os pacotes *MASS* (Ripley et al., 2022), *ExpDes.pt* (Ferreira et al., 2021), *FactoMineR* (Husson et al., 2020) e *ggplot2* (Wickham et al., 2022).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Frações de P

Os estoques de todas as frações de P foram significativamente influenciados pelas fontes fosfatadas e plantas de cobertura. Os reservatórios de P lábil foram compostos em média de 83, 69 e 52% por Po lábil para Sem-P, SPS e FN, respectivamente (Fig. 1). Em Po lábil houve diferença das plantas de cobertura apenas sob Sem-P (12 anos explorando *legacy* P), onde ervilhaca, azevém e tremoço foram inferiores 24, 17 e 14% ao pousio. No geral, o Pi lábil de FN foi 4,5 vezes e SPS 2,3 vezes foram superiores ao Sem-P. Em relação ao Sem-P, houve aumento desta fração apenas quando tremoço-branco, aveia preta e nabo forrageiro foram associados com SPS.

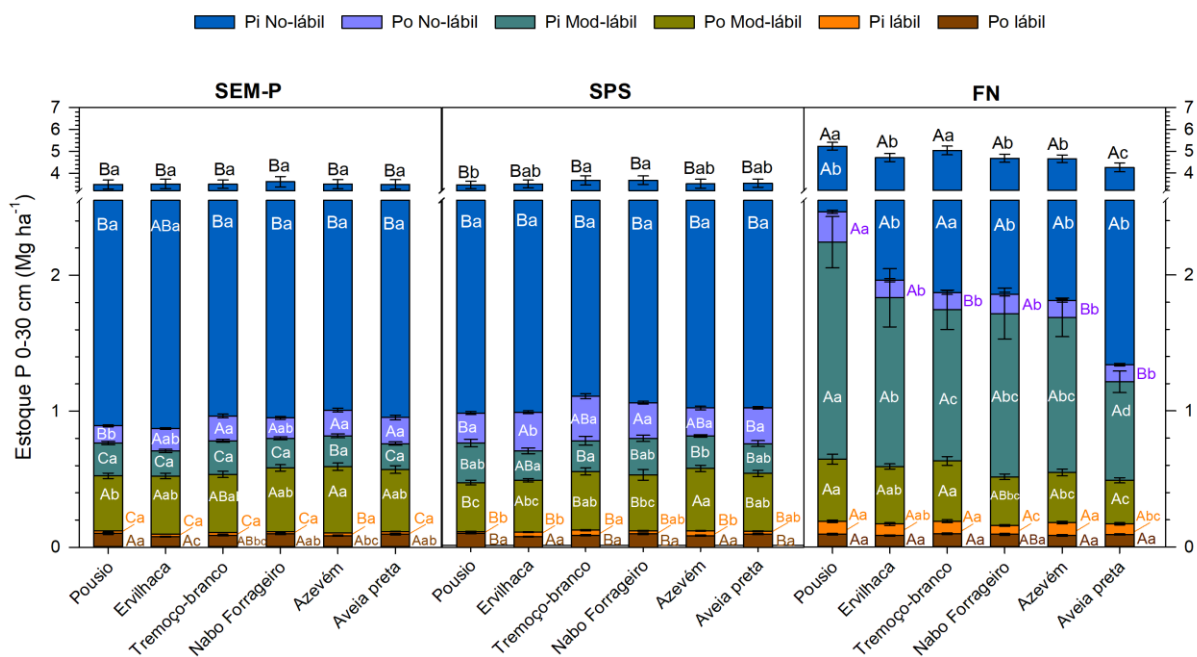


Figura 1. Estoque das frações de fósforo de 0 a 30 cm (Mg ha^{-1}) após 12 safras (últimas 5 explorando o P) sob efeito de plantas de cobertura e fontes fosfatadas. Sem-P: sem adubação fosfatada; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

Nas frações de P, as maiores diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) ocorreram nas camadas de 0-5 e 5-10 cm de profundidade (independente das frações) (Tab. S-1-2). As distribuições do P lábil

no solo foram fortemente influenciadas pelas fontes fosfatadas, onde FN apresentou sempre os maiores teores (Fig. 2-B), sendo que a 0-5 cm apresentou diferença de $54,9 \text{ mg kg}^{-1}$ com SPS e $72,8 \text{ mg kg}^{-1}$ com Sem-P. Respostas semelhantes foram observadas no P inorgânico total e, curiosamente, o P orgânico total apresentou maiores nos tratamentos sem adubação fosfatadas por 12 anos (Fig. 2-F e Tab. S-2).

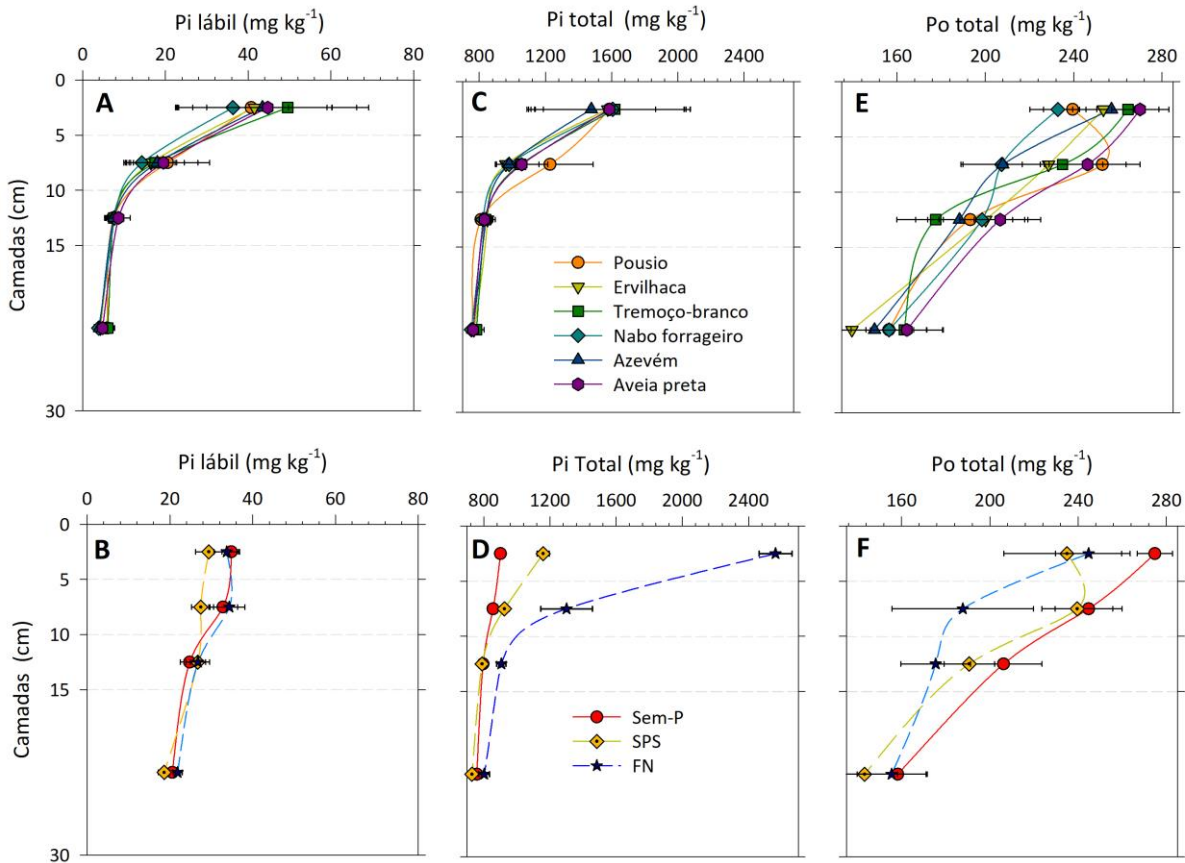


Figura 2. Distribuição dos teores de P lábil, Pi e Po total dos efeitos simples das plantas de cobertura (A e B) e fontes fosfatadas (C e D) após 12 safras (últimas 5 com supressão de P). Sem-P: sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfatadas natural.

As plantas de cobertura apresentaram efeitos semelhantes no P lábil (Fig. 2-A), isso indica que as fontes fosfatadas implicam em maiores diferenças para essa fração de P. Este mesmo efeito não ocorre para o Pi total (Fig. 2-C) e, principalmente, para o Po total (Fig. 2-E). No Po total, camada de 0-5 cm, apenas nabo forrageiro foi inferior ao pousio ($p = 0,04$), as outras plantas de cobertura apresentaram aumento médio de 22 mg kg^{-1} . Vale ressaltar que neste ano ocorreram fortes geadas que interromperam o ciclo do nabo forrageiro na fase de plântula, justificando estes resultados.

O P lábil foi tamponado pelas frações de P menos lábeis (Fig. 3), sendo que no pousio sem-P foi especialmente tamponado por frações de P orgânico. Já sob FN, foi por frações de Pi moderadamente lábil e sob SPS por ambas as frações de P. Após 15 ciclos sucessivos explorando o *legacy* P e com análise de caminho, Gatiboni et al. (2021) verificaram que o P lábil foi tamponado, principalmente pelas frações de P orgânico lábil e não lábil. Em solos sem fertilização prévia com P e sem taxas intermediárias de fertilizante, houve uma contribuição significativa das frações de Po para as frações de Pi moderadamente disponível para as plantas. Gatiboni et al. (2021) também relataram que as frações de P orgânico contribuíram significativamente para o Pi disponível para as plantas em solos naturais e frequentemente deficientes em P.

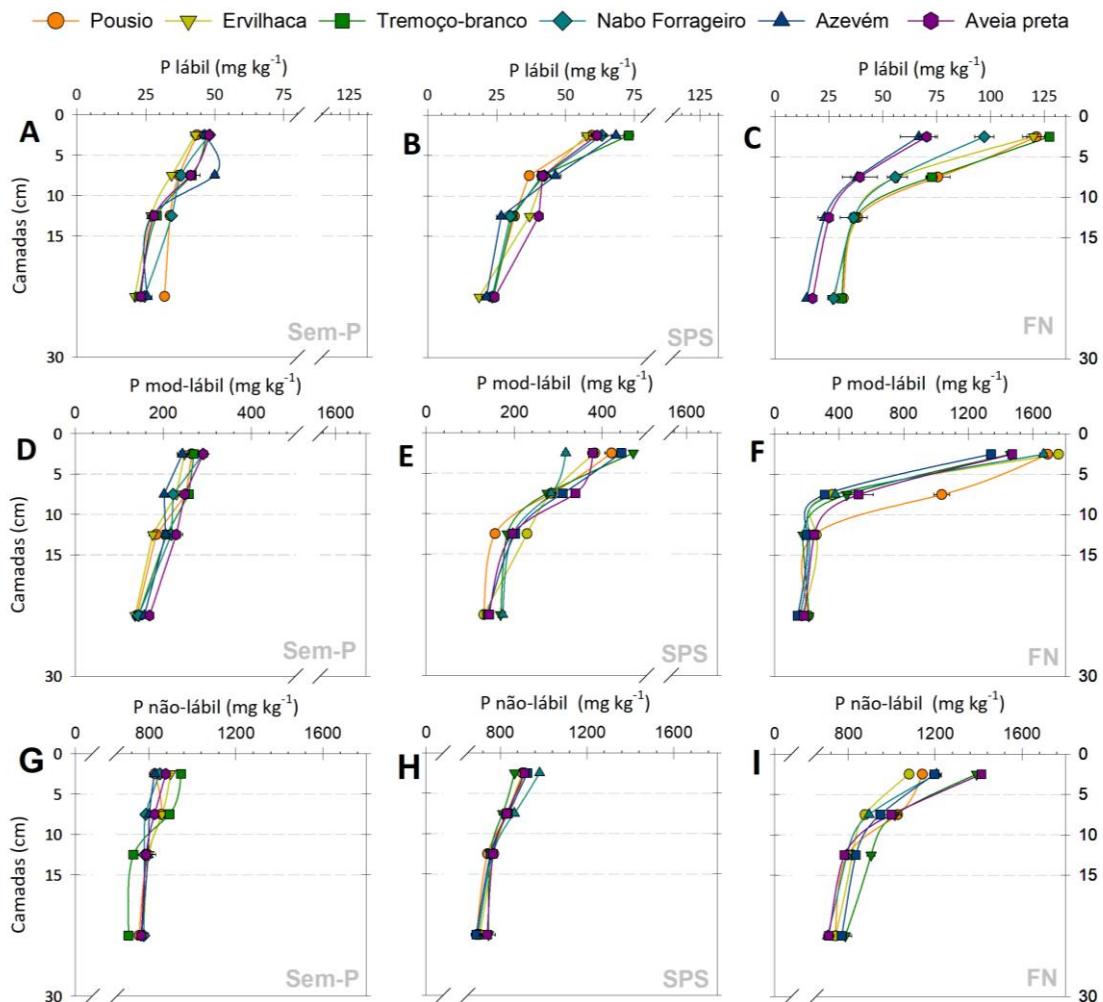


Figura 3. Frações de P lábil (A, B, C), moderadamente lábil (D, E e F) e não-lábil (G, H e I) das plantas de cobertura em função de Sem-P, SPS e FN, respectivamente. Sem-P: sem adubação fosfatada; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

O acúmulo de Po no solo com fertilização de P mineral geralmente ocorre onde o carbono se acumula, uma vez que as mudanças em Po e C orgânico são geralmente ligadas e correlacionadas devido às ligações C-P predominantes em Po (Liu et al., 2019). O Po do solo deriva principalmente de biomoléculas, incluindo nucleotídeos, fosfatos, coenzimas, fosfoproteínas, fosfatos de açúcar e fosfonatos, e o Po desempenha um papel essencial na ciclagem de P do solo (Tian et al., 2021). Porém, não é absorvido diretamente pelas plantas (Lambers, 2022). As enzimas responsáveis pela decomposição e mineralização de Po são liberadas pelas plantas e com maior potencial pelos microrganismos do solo. Elas catalisam a hidrólise de ésteres e anidridos de ácido fosfórico, e na maior parte são incorporadas às células dos microrganismos como P celular (Liu et al., 2019; Tian et al., 2021).

3.3.2. Especificação da solução de ^{31}P em RMN

O P total extraído com NaOH+Na₂EDTA acompanhou a variação do P total do solo (tabela 1), com taxa de recuperação média de ~35% (29 a 45%) (Tab. 1 e Fig. 4). Nos espectros da análise de ^{31}P -RNM no estado líquido foi possível identificar sete espécies ou grupos químicos de P do solo. Ortofosfato foi a forma química mais abundante, seguido de P-monoéster, independentes dos fatores. Pirofosfato e P-diéster apresentaram valores semelhantes, exceto em nabo forrageiro sob FN, onde houve redução de 44% do pirofosfato e aumento de 124% no P-diéster. O P-monoéster foi ligeiramente estável sob Sem-P e SPS, no entanto, em nabo forrageiro sob FN, o teor foi 191 mg kg⁻¹ (ou 126%) maior que as médias das outras plantas de cobertura.

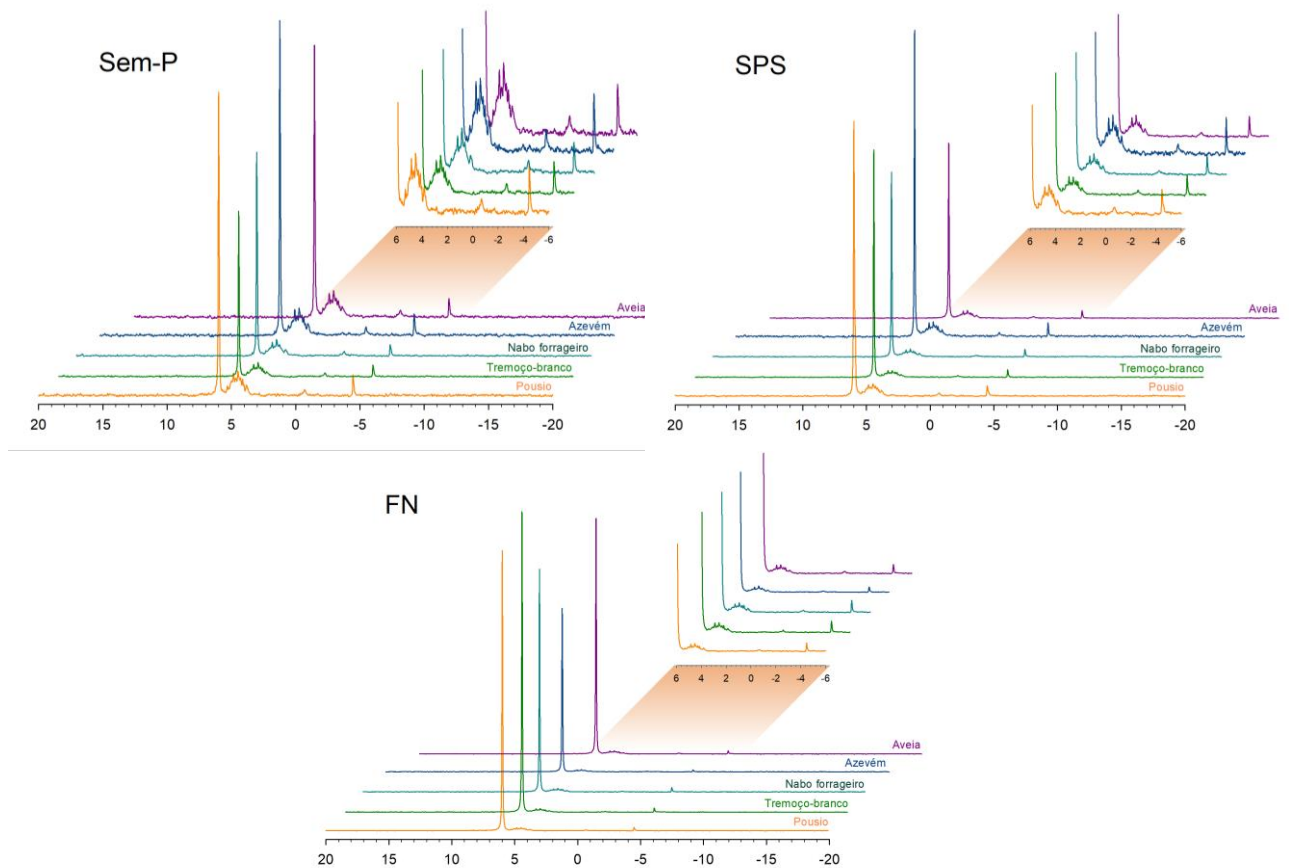


Figura 4. Espectro do ^{31}P RMN em estado líquido extraído com $\text{NaOH}+\text{Na}_2\text{EDTA}$ sob efeito de fontes fosfatadas e plantas de cobertura a longo prazo. Ervilhaca não foi analisada devido à baixa alterações em P frações e por limitações de recursos financeiros. O gráfico zoom evidencia deslocamento de espécies de P orgânico. Sem-P: sem adubação fosfatada; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural da Argélia.

Polifosfatos, Di-adenosina e Fosfanato foram os menos abundantes, principalmente sob Sem-P e SPS (Tab. 1), sendo que nestas fontes de P houve tendência de as plantas de cobertura reduzirem estas formas química de P comparado ao pousio (exceto azevém sob SPS). Sob FN o fosfanato foi ligeiramente aumentado em relação ao pousio, sendo que apenas com nabo forrageiro houve redução, mas com rápido aumento da forma Po monoéster.

Tabela 1. Espécies químicas P determinadas por solução de ^{31}P RMN extraídas com $\text{NaOH}+\text{Na}_2\text{EDTA}$ sob efeito de fontes fosfatadas e plantas de cobertura a longo prazo. Ervilhaca não foi analisada devido a baixas alterações em P frações e por limitações de recursos financeiros. Orto-P: ortofosfato; Piro-P: pirofosfato; Poli-P: polifosfato; Sem-P: sem adubação fosfatada; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural da Argélia.

Plantas de cobertura/Fontes P	P inorgânico (Pi mg kg ⁻¹)			P orgânico (Po mg kg ⁻¹)				P total extraído (mg kg ⁻¹)	Eficiência de extração (% do P total)
	Orto-P (δ 5.5 a 7)	Piro-P (δ -4 a -5,5)	Poli-P (δ -17 a 20)	Di-Adenosina (δ -9 a 10)	Fosfanato (δ 21-13)	Monoéster (δ 5.5-2.9)	Diéster (δ 2 a -1.3)		
Sem-P									
Pousio	208.7	15.6	<0.1	<0.1	4.6	136.0	14.7	379.7	33.5
Tremoço-branco	218.4	16.2	<0.1	<0.1	7.6	137.2	12.4	391.8	31.0
Nabo forrageiro	234.4	15.9	<0.1	0.3	1.8	141.6	20.3	414.3	34.9
Azevém	196.9	18.3	<0.1	<0.1	<0.1	156.9	23.1	395.3	35.5
Aveia preta	182.8	16.5	1.4	0.1	<0.1	134.3	22.0	357.1	29.4
Média	208.2	16.5	0.3	0.1	2.8	141.2	18.5	387.7	32.9
SPS									
Pousio	346.0	19.3	2.2	<0.1	2.7	128.8	14.1	513.2	36.9
Tremoço-branco	439.4	17.7	<0.1	1.1	5.9	132.5	18.9	615.5	43.7
Nabo forrageiro	361.3	19.1	2.0	2.8	<0.1	143.5	15.8	544.4	40.0
Azevém	295.5	14.5	1.8	0.4	16.0	111.4	12.9	452.5	31.5
Aveia preta	285.3	16.3	<0.1	0.3	<0.1	134.4	17.9	454.2	33.6
Média	345.5	17.4	1.2	0.9	4.9	130.1	15.9	515.9	37.2
FN									
Pousio	774.2	12.8	4.0	1.6	21.3	87.9	13.5	915.4	31.0
Tremoço-branco	937.6	20.1	5.2	1.1	36.5	109.7	16.7	1126.9	37.8
Nabo forrageiro	485.9	8.6	0.8	9.9	16.0	343.3	54.3	918.8	31.0
Azevém	969.8	21.2	8.7	0.9	36.9	128.1	20.2	1185.8	44.7
Aveia preta	752.8	14.1	7.0	2.1	36.9	91.6	16.1	920.6	30.6
Média	784.1	15.4	5.1	3.1	29.5	152.1	24.2	1013.5	35.0

3.3.3. Indicadores microbianos

A enzima fosfatase ácida, na camada de 0-5 cm, apresentou interação significativa, onde o tremoço-branco sobressaiu-se com as demais plantas de cobertura e superior sob SPS, com média de 1832,9 $\mu\text{g PNF}\cdot\text{g}^{-1}$ solo h^{-1} , 46% superior ao pousio (851,2 $\mu\text{mol PNF g}^{-1}$ solo h^{-1}) (Fig. 5-A). Já para as camadas de 5-10 e 10-15 cm não ocorreu interação e apenas efeito simples dos fatores. Logo, tremoço-branco apresentou maior atividade comparado aos demais tratamento sob Sem-P, com 1101,6, 1191,5 e 872,0 $\mu\text{mol PNF g}^{-1}$ solo h^{-1} para 0-5, 5-10 e 10-15 cm, respectivamente.

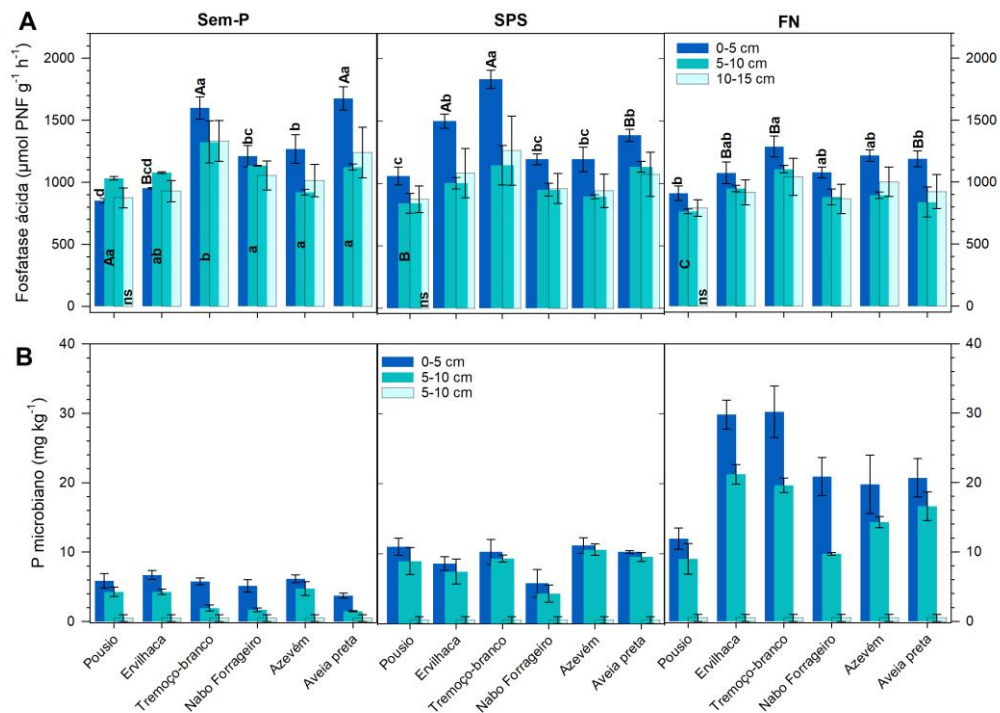


Figura 5. Atividade da fosfatase ácida (A) e P da biomassa microbiana (B) de três camadas do solo sob fontes fosfatadas e plantas de cobertura após 12 safras (últimas cinco explorando o legacy P). Médias seguidas da mesma letra nas linhas ou minúscula nas colunas não difere pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), ns: não significativo (teste F, $p \leq 0,05$). Sem-P: sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfatadas natural.

A enzima fosfatase ácida é importante na mineralização do P de compostos orgânicos e na disponibilidade às plantas, com papel fundamental no ciclo do P, correlacionadas com a deficiência de P e o crescimento das plantas. Ou seja, a atividade dessa enzima está relacionada com baixos teores de P inorgânico no solo (Janes-Bassett et al., 2022). Esta relação é explicada pela inibição direta promovida pelos altos teores de P em solução à atividade da fosfatase, ou indireta, quando a biomassa microbiana atinge homeostase estequiométrica de P e reduz a expressão de genes que codificam a enzima (phoD ou phoC). Esta resposta ocorreu do bioma à escala global (Nakayama et al., 2021).

O P da biomassa microbiana (P_{mic}) seguiu o gradiente dos teores de P lábil, porém apenas sob FN as plantas de cobertura foram superiores ao pousio (Fig. 5-B). Nesta condição, especialmente em ervilhaca e tremoço branco ocorreram as maiores respostas ($\sim 30 \text{ mg kg}^{-1}$) na superfície (0-5 cm). Quando comparados aos respectivos pousios, os demais tratamentos ou na subsuperfície as respostas foram nulas e para o nabo forrageiro negativa. Esta resposta no nabo forrageiro foi esperada devido a planta não ter completado o ciclo devido a fortes geadas no estabelecimento da cultura.

3.3.4. Análise de componentes principais

Ao todo foram gerados 21 componentes principais (PC). Esses componentes podem ser vistos como "super-variáveis", construídas pela combinação da correlação linear entre as variáveis e são extraídos em ordem decrescente de importância em termos de sua contribuição para a variação total dos dados.

O percentual mínimo de 80% da variância deve ser abordado para determinar o número adequado de componentes a ser utilizado (Hair et al., 2009). Porém, para alcançar esse percentual seria necessário abordar do PC1 ao PC3 (81,21%) (Fig. 6-A), o que dificultaria a interpretação dos resultados usando as três dimensões. Desse modo, apenas o PC1 e PC2, com 65,4% da variação total, foram utilizados para facilitar a interpretação do gráfico em duas dimensões do efeito das plantas de cobertura e fontes fosfatadas nas frações e espécies de P e indicadores microbianos com cultivo a longo prazo de soja/milho.

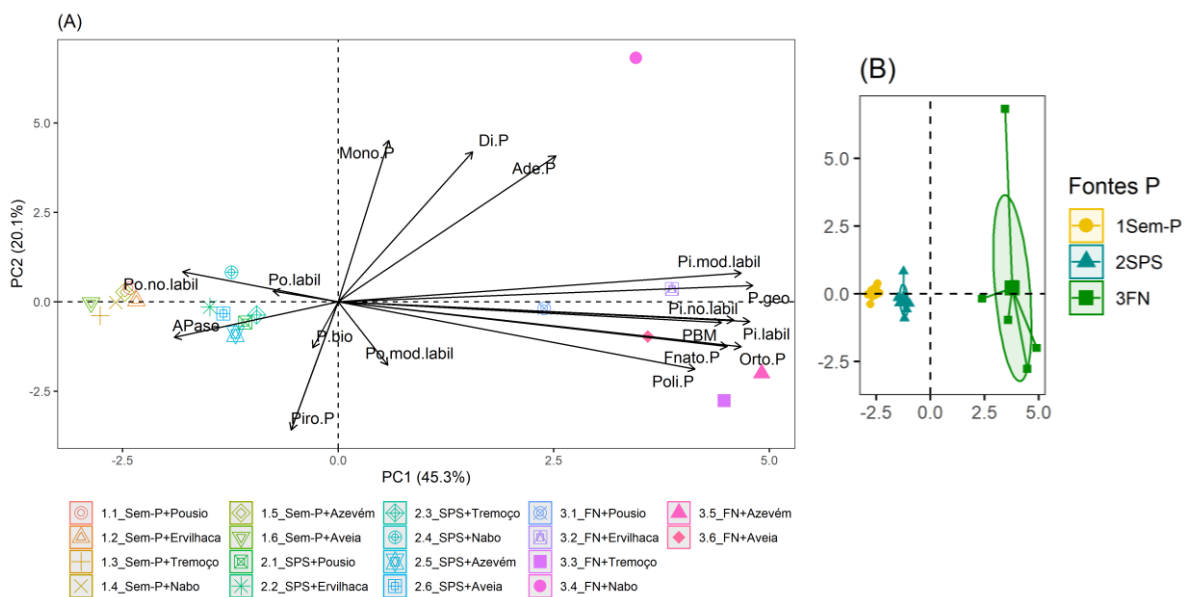


Figura 6. Biplot do primeiro e do segundo componentes principais obtidos a partir das características químicas, frações de P, atividade enzimática e produtividade da cultura da soja sob o efeito de longo prazo de fontes fosfatadas e plantas de cobertura. Variação de todos os tratamentos (A) e apenas das fontes fosfatadas (B). PC1: primeiro componente; PC2: segundo componente; Sem-P: sem adubação fosfatada; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural da Argélia.; Orto.P: ortofosfato; Piro.P: pirofosfato; Poli.P: polifosfato; Mono.P: monoéster; Di.P: monoéster; Ade.P: Di-adenosina; APase: fosfatase ácida; PBM: P associado a biomassa microbiana. P.geo: P geoquímico; P.bio: P biológico.

De modo geral, as plantas de coberturas associadas com FN apresentaram maior dissimilaridade que as demais fontes (SPS e Sem-P) (Fig. 6-A). Nesta condição, nabo apresentou a maior dissimilaridade, seguida de azévelem, tremoço-branco, aveia-preta e ervilhaca. Estes tratamentos foram principalmente relacionados com as frações (Pi lábil, mod., não-lábil e

geoquímico) e espécies (orto-P e Poli-P) de Pi no solo. Além disto, P imobilizado na biomassa microbiana (PBM) e fosfanato (Po) apresentaram resposta semelhante. Porém, foram negativamente correlacionados com a enzima fosfatase, frações de Po lábil e não-lábil. Esta variável foram associadas com os cenários de baixo P total (Sem-P e SPS), embora mais fortes com Sem-P, independente das plantas de cobertura. Pirofosfato, P biológico e Po mod-lábil não foram sensíveis aos tratamentos, e apenas as espécies químicas Di-adenosina, mono e diéster foram positivamente variadas com nabo forrageiro sob FN.

Para os efeitos simples, apenas ocorreu dissimilaridade nas fontes (Fig. 6-B), onde FN apresentou maior distância de Mahalanobis (7,04) do Sem-P quando comparado ao SPS (1,43). Isto sugere que após cinco anos de supressão de P, o FN mantém a sustentabilidade do sistema, porém, o mesmo não ocorre para SPS por se tornar ligeiramente semelhante ao Sem-P, onde ocorreu 12 anos de supressão de P. Devido esta grande diferença, os efeitos simples das plantas de cobertura foram condicionados às fontes aplicadas (Fig. 6-A).

3.4. Conclusão

O efeito das plantas de cobertura na dinâmica de P foi modulado principalmente pelas fontes fosfatadas devido as diferenças no P total aplicado. Maiores efeitos foram observados na camada de 0-5 cm, onde tremoço-branco, aveia preta e nabo forrageiro aumentaram o P lábil. Com fosfato natural, o P lábil foi tamponado por Pi moderadamente lábil e em superfosfato simples por Pi e Po, em ambos os casos nabo forrageiro e aveia preta foram as espécies que mais esgotaram estas frações de P.

A atividade da fosfatase ácida foi maior sem aplicação de P e, independente da fonte fosfatada, tremoço-branco, nabo forrageiro e aveia preta foram as plantas de cobertura que estimularam a atividade da enzima. P armazenado na biomassa microbiana seguiu a variação dos teores P, embora espécies leguminosas aumentaram fortemente o P_{mic} onde ocorreu alto P disponível (fosfato natural).

As plantas de cobertura alteraram as espécies químicas de P (^{31}P RNM). A variação das espécies inorgânica (ortofosfato, pirofosfato e polifosfato) seguiram a variação do P total. Nabo forrageiro e azevém aumentaram fortemente o acúmulo de P nas formas orgânicas de Mono e diésteres do solo sob fosfato natural.

Referências

- Almeida, D. S., & Rosolem, C. A. (2016). Ruzigrass Grown in Rotation with Soybean Increases Soil Labile Phosphorus. *Agronomy Journal*, 108(6), 2444–2452. <https://doi.org/10.2134/AGRONJ2015.0478>
- Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. L. M., & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6), 711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- Cordell, D., & White, S. (2014). Life's bottleneck: Sustaining the world's phosphorus for a food secure future. *Annual Review of Environment and Resources*, 39(1), 161–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-010213-113300>
- Dube, E., Chiduzza, C., & Muchaonyerwa, P. (2014). High biomass yielding winter cover crops can improve phosphorus availability in soil. *South African Journal of Science*, 110(3–4). <https://doi.org/10.1590/sajs.2014/20130135>
- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., & Nogueira, D. A. (2021). ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues). In CRAN (1.2.2; p. 62). R package. <https://doi.org/10.4236/am.2014.519280>
- Guedes, R. S., Alleoni, L. R. F., Correia, B. L., Alves, L. W. R., Ramos, S. J., & Fernandes, A. R. (2020). Tillage systems and cover plants change organic fractions of phosphorus in oxisol of eastern amazonia. *Bragantia*, 79(3), 434–446. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200047>
- Hair, J. F. Jr., Black, W. C., Badin, B. J., Anderson, R. E., & Tatham, R. L. (2009). *Análise multivariada de dados* (A. S. Sant'Anna & Consultoria, Eds.; 6th ed.). Bookman.
- Hallama, M., Pekrun, C., Lambers, H., & Kandeler, E. (2019). Hidden miners – the roles of cover crops and soil microorganisms in phosphorus cycling through agroecosystems. *Plant and Soil*, 434(1–2), 7–45. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3810-7>
- Hedley, M. J., Stewart, J. W. B., & Chauhan, B. S. (1982). Changes in Inorganic and Organic Soil Phosphorus Fractions Induced by Cultivation Practices and by Laboratory Incubations. *Soil Science Society of America Journal*, 46(5), 970–976. <https://doi.org/10.2136/sssaj1982.03615995004600050017x>
- Husson, F., Josse, J., Le, S., & Maintainer, J. M. (2020). Multivariate exploratory data analysis and data mining. In CRAN (2.3, Vol. 1, pp. 1–130).

- Lun, F., Sardans, J., Sun, D., Xiao, X., Liu, M., Li, Z., Wang, C., Hu, Q., Tang, J., Ciais, P., Janssens, I. A., Obersteiner, M., & Peñuelas, J. (2021). Influences of international agricultural trade on the global phosphorus cycle and its associated issues. *Global Environmental Change*, 69, 102282. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2021.102282>
- Mendes, I. C., Souza, L. V., Resck, D. V. S., & Gomes, A. C. (2003). Propriedades biológicas em agregados de um Latossolo Vermelho-Escuro sob plantio convencional e direto no Cerrado. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 27(3), 435–443. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832003000300005>
- Oliveira-Filho, J. de S., & Pereira, M. G. (2020). Analyzing the research on phosphorus fractions and phosphorus legacy in soil: a bibliometric analysis. *Journal of Soils and Sediments*, 20(9), 3394–3405. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02669-1>
- Pavinato, P. S., Cherubin, M. R., Soltangheisi, A., Rocha, G. C., Chadwick, D. R., & Jones, D. L. (2020). Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72302-1>
- Pavinato, P. S., Rodrigues, M., Soltangheisi, A., Sartor, L. R., & Withers, P. J. A. (2017). Effects of Cover Crops and Phosphorus Sources on Maize Yield, Phosphorus Uptake, and Phosphorus Use Efficiency. *Agronomy Journal*, 109(3), 1039–1047. <https://doi.org/10.2134/agronj2016.06.0323>
- Pavinato, P. S., Soltangheisi, A., Rocha, G. C., & Cherubin, M. R. (2021). Acúmulo de fósforo no solo em áreas agrícolas no Brasil: diagnóstico atual e potencialidades futuras. *Nutrição de Plantas Ciências e Tecnologia*, 9(1), 1–9.
- Raij, B. van, Cantarella, H., Quaggio, J. A., & Furlani, A. M. C. (1997). *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo (1st ed.)*. : IAC.
- Rheinheimer, D. dos S., Fornari, M. R., Bastos, M. C., Fernandes, G., Santanna, M. A., Calegari, A., dos Santos Canalli, L. B., Caner, L., Labanowski, J., & Tiecher, T. (2019). Phosphorus distribution after three decades of different soil management and cover crops in subtropical region. *Soil and Tillage Research*, 192, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.04.018>
- Ripley, B., Venables, B., Bates, D. M., Hornik, K., Gebhardt, A., & Firth, D. (2022). *MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS (7.3-57; p. 170)*. CRAN.
- Rodrigues, M., Pavinato, P. S., Withers, P. J. A., Teles, A. P. B., & Herrera, W. F. B. (2016). Legacy phosphorus and no tillage agriculture in tropical oxisols of the Brazilian savanna. *Science of the Total Environment*, 542, 1050–1061. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.118>

- Soltangheisi, A., Teles, A. P. B., Sartor, L. R., & Pavinato, P. S. (2020). Cover cropping may alter legacy phosphorus dynamics under long-term fertilizer addition. *Frontiers in Environmental Science*, 8, 13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00013>
- Tabatabai, M. A. (1994). Soil Enzymes. In R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdick, S. Smith, A. Tabatabai, & A. Wollum (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties* (Vol. 2, pp. 775–833). Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c37>
- TEAM, R. C. (2022). R: A language and environment for statistical computing. In R Foundation for Statistical Computing (4.2.0). CRAN.
- Teixeira, P. C., Donagemma, G. K., Fontana, A., & Teixeira, W. G. (2017). *Manual de métodos de análise de solo* (3rd ed.). Embrapa Solos.
- Teles, A. P. B., Rodrigues, M., Bejarano Herrera, W. F., Soltangheisi, A., Sartor, L. R., Withers, P. J. A., & Pavinato, P. S. (2017). Do cover crops change the lability of phosphorus in a clayey subtropical soil under different phosphate fertilizers? *Soil Use and Management*, 33(1), 34–44. <https://doi.org/10.1111/sum.12327>
- Weil, R. R., & Brady, N. C. (2017). *The nature and properties of soils* (15th ed., Vol. 1). Pearson .
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., & Dunnington, D. (2022). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (3.3.6; pp. 1–284). Springer-Verlag.
- Withers, P. J. A., Rodrigues, M., Soltangheisi, A., De Carvalho, T. S., Guilherme, L. R. G., Benites, V. D. M., Gatiboni, L. C., De Sousa, D. M. G., Nunes, R. D. S., Rosolem, C. A., Andreote, F. D., Oliveira, A. De, Coutinho, E. L. M., & Pavinato, P. S. (2018). Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20887-z>

Material suplementar

Tabela S9. Caracterização química e textural do solo no início do experimento em 2009.

Camada (cm)	pH	MO ¹	P-resina	Al ³⁺	H+Al	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	V ²	Argila	Silte	Areia
	CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	----- mmol _e dm ⁻³ -----					%	g kg ⁻¹		
0-5	5,4	40,2	8,1	0,0	34,2	54,0	26,9	5,0	71,5	701,4	259,3	39,3
5-10	5,2	40,2	9,7	0,0	36,8	56,2	29,8	2,8	70,7	739,0	243,2	17,8
10-20	5,0	26,8	4,8	0,8	39,7	43,2	21,3	1,3	62,4	751,5	231,5	17,0

¹Matéria orgânica; ²Saturação por bases.

Tabela S2. P lábil, Moderadamente lábil e Não lábil de quatro camadas do solo sob fontes fosfatadas e plantas de cobertura após 12 safras (últimas 5 com supressão de P).

Plantas de coberturas	P Lábil (mg kg ⁻¹)				P Moderadamente Lábil (mg kg ⁻¹)				P Não Lábil (mg kg ⁻¹)			
	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média
----- 0-5 cm -----												
Pousio	44 Ca	60 Bab	121 Aa	75	264 Ca	421 Ba	1691 Ac	792	826 Cc	910 Bb	1040 Ac	959
Ervilhaca	43 Ca	58 Bb	120 Aa	74	248 Ca	383 Bab	1785 Acd	796	898 Bab	902 Bb	1080 Ac	960
Tremoço-branco	47 Ca	73 Ba	127 Aa	82	269 Ca	470 Ba	1461 Ab	733	946 Ca	866 Bb	1390 Aa	1067
Nabo forrageiro	48 Ca	63 Bab	97 Ab	70	290 Ca	317 Bb	1665 Ad	757	849 Cbc	981 Ba	1206 Ab	1012
Azevém	48 Ca	62 Bab	122 Aa	77	291 Ca	378 Bab	1471 Aa	713	876 Babc	911 Bab	1412 Aa	1066
Aveia preta	46 Ca	68 Bab	116 Aa	77	243 Ca	443 Ba	1340 Ae	675	824 Cc	925 Bab	1197 Ab	982
Média	46	64	117		268	402	1564		870	916	1237	
----- 5-10 cm -----												
Pousio	37 Bab	37 Ba	76 Aa	50	251 Ba	284 Ba	1035 Aa	524	855 Bab	839 Ba	1026 Aa	907
Ervilhaca	34 Bb	42 Ba	57 Ab	44	230 Ba	283 ABa	357 Ac	290	859 Aab	831 Aa	876 Ab	855
Tremoço-branco	42 Bab	42 Ba	73 Aa	52	258 Ba	274 Ba	448 Ab	360	893 Ba	811 Ca	1014 Aa	906
Nabo forrageiro	38 Bab	42 Ba	56 Ab	45	222 Ba	283 ABa	376 Ac	294	784 Bb	864 Aa	895 Ab	848
Azevém	41 Bab	42 Ba	68 Aab	50	249 Ba	338 Ba	520 Ab	369	824 Bab	830 Ba	997 Aa	884
Aveia preta	50 Ba	46 Ba	66 Aab	54	202 Aa	310 Aa	310 Ac	274	801 Bb	835 Ba	946 Aab	861
Média	40	42	66		235	295	508		836	835	959	
----- 10-15 cm -----												
Pousio	34 ABa	31 Bbc	38 Aa	35	184 Bab	156 Bb	241 Aab	194	793 Aa	741 Aa	794 Ab	776
Ervilhaca	27 Ba	37 Aab	37 Aa	34	176 Bb	228 Aa	259 Aa	221	798 Aa	770 Aa	818 Ab	795
Tremoço-branco	29 Ba	31 Abc	37 Aa	32	207 Aab	184 Aab	176 Ac	189	727 Ba	754 Ba	904 Aa	795
Nabo forrageiro	34 ABa	30 Bbc	37 Aa	34	218 Aab	196 Aab	213 Aabc	209	778 Aa	764 Aa	792 Ab	778
Azevém	28 Ba	40 Aa	43 Aa	37	229 Aba	195 Aab	245 Aab	223	786 Aa	766 Aa	781 Ab	778
Aveia preta	27 Ba	27 Bc	40 Aa	31	205 Aab	202 Aab	201 Abc	203	794 ABa	755 Ba	834 Aab	795
Média	30	33	39		203	194	223		779	758	820	
----- 15-30 cm -----												
Pousio	32	23	32	29 a	140 Ba	130 Bb	211 Aa	160	753 Aa	690 Aa	739 Aa	727
Ervilhaca	21	19	27	22 c	136 Ba	130 Bb	169 Abc	145	773 Aa	706 Aa	741 Aa	740
Tremoço-branco	23	24	31	26 ab	144 Ba	169 Ba	213 Aa	175	705 Ba	746 BAa	785 Aa	745
Nabo forrageiro	24	23	27	25 bc	144 Aa	173 Aa	158 Abc	158	775 Aa	697 Ba	704 Ba	725
Azevém	23	24	30	26 ab	169 ABa	143 Bab	182 Aab	164	763 Aa	740 Aa	709 Aa	737
Aveia preta	25	21	26	24 bc	157 Aa	138 Aab	143 Ac	146	764 Aa	689 Ba	768 Aa	741
Média	25 B	22 C	29 A		148	147	179		755	711	741	

Sem-P: sem adubação fosfatada; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural. Médias seguidas da mesma letra nas linhas ou minúscula nas colunas não difere entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), ns: não significativo (teste F, $p \leq 0,05$).

Tabela S3. P geoquímico, biológico e P total de quatro camadas do solo sob fontes fosfatadas e plantas de cobertura após 12 safras (últimas 5 com supressão de P).

Plantas de coberturas	P geoquímico (mg kg ⁻¹)				P biológico (mg kg ⁻¹)				P total (mg kg ⁻¹)			
	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média
-----0-5 cm-----												
Pousio	902 Cab	1177 Ba	2679 Acd	1586	232 Bb	213 Bbc	274 Aab	240	1134 Cab	1390 Bb	2953 Acd	1826
Ervilhaca	906 Cab	1119 Bab	2703 Ade	1576	284 Aab	223 Bbc	254 Bab	253	1189 Cab	1342 Bb	2957 Ade	1830
Tremoço-branco	984 Ca	1204 Ba	2668 Ab	1619	279 Aab	205 Bbc	310 Aa	265	1263 Ca	1409 Bb	2978 Ab	1883
Nabo forrageiro	887 Cab	1194 Ba	2737 Ac	1606	301 Aa	167 Cc	231 Bb	233	1187 Cab	1361 Bb	2968 Ac	1839
Azevém	941 Cab	1036 Bb	2782 Aa	1586	274 Aab	314 Aa	223 Bb	270	1215 Cab	1350 Bb	3005 Aa	1857
Aveia preta	838 Cb	1184 Ba	2409 Ae	1477	276 Aab	252 Ab	243 Ab	257	1114 Cb	1436 Bb	2653 Ae	1734
Média	910	1152	2663		274	229	256		1184	1381	2919	
-----5-10 cm-----												
Pousio	906 Ba	915 Ba	1861 Aa	1227	238 Aab	245 Aab	277 Aa	253	1144 Ba	1160 Ba	2137 Aa	1480
Ervilhaca	856 Ba	943 ABa	1083 Ac	961	267 Aa	213 Bb	206 Bb	229	1123 Ba	1156 ABa	1289 Ac	1189
Tremoço-branco	941 Ba	889 Ba	1318 Ab	1049	251 Aab	238 Aab	216 Ab	235	1192 Ba	1126 Ba	1534 Ab	1284
Nabo forrageiro	828 Ba	950 Ba	1160 Ac	980	216 Ab	239 Aab	167 Bb	207	1044 Ba	1190 ABa	1326 Ac	1187
Azevém	835 Ba	933 Ba	1402 Ab	1057	280 Aa	276 Aa	183 Bb	246	1114 Ba	1209 Ba	1586 Ab	1303
Aveia preta	818 Ca	974 Ba	1150 Ac	981	234 Aab	217 Ab	173 Bb	208	1052 Ba	1191 ABa	1323 Ac	1189
Média	864	934	1329		247	238	204		1112	1172	1533	
-----10-15 cm-----												
Pousio	814 ABa	758 Ba	861 Ab	811	196 ABbc	170 Bb	213 Aa	193	1010 Aa	928 Bb	1074 Aa	1004
Ervilhaca	819 Ba	815 Ba	916 Aab	850	182 Bc	221 Aa	198 Aba	200	1001 Ba	1035 Ba	1113 Aa	1050
Tremoço-branco	768 Ba	771 Ba	976 Ab	839	195 Abc	197 Aab	141 Bb	177	963 Aa	968 Aab	1117 Aa	1016
Nabo forrageiro	798 Aa	805 Aa	864 Ab	823	232 Aab	185 Bab	178 Bab	198	1030 Ba	991 Bab	1042 Aa	1021
Azevém	799 Ba	807 Ba	889 Ab	832	244 Aa	195 Bab	181Bab	207	1044 Aa	1002 Aab	1070 Aa	1038
Aveia preta	804 Ba	791 Ba	924 Aab	840	222 Aabc	192 Aab	150 Bb	188	1027 ABa	984 Bab	1074 Aa	1028
Média	800	791	905		212	193	177		1012	985	1082	
-----15-30 cm-----												
Pousio	781 ABa	710 Bab	790 Aa	760	144 Bb	133 Bab	192 Aa	156	924 ABa	844 Ba	982 Aab	917
Ervilhaca	787 Aa	728 Aab	788 Aa	768	143 Ab	128 Ab	148 Ab	140	930 Aa	855 Aa	937 Aab	907
Tremoço-branco	711 Ba	769 Ba	868 Aa	783	160 Aab	169 Aa	161 Aab	163	871 Ba	938 Ba	1029 Aa	946
Nabo forrageiro	787 Aa	723 Ab	747 Aa	752	156 Aab	171 Aa	143 Ab	156	943 Aa	893 Aa	889 Ab	908
Azevém	769 Aa	747 Ab	773 Aa	763	186 Aa	160 ABab	148 Bb	164	955 Aa	907 Aa	921 Ab	927
Aveia preta	761 ABa	708 Bab	814 Aa	761	186 Aa	141 Bab	123 Bb	150	946 Aa	849 Ba	937 Aab	911
Média	766	731	797		162	150	152		928	881	949	

Sem-P: sem adubação fosfatada; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural. Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas ou minúscula nas colunas não difere entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), ns: não significativo (teste F, $p \leq 0,05$)

4. ESTEQUIOMETRIA ENZIMÁTICA E AQUISIÇÃO DE C, N E P MICROBIANO SÃO MODULADOS POR PLANTAS DE COBERTURA SOB MANEJO QUE EXPLORA O *LEGACY* P DO SOLO

Resumo

Plantas de cobertura em solos agrícolas melhora a funcionalidade do solo e pode refletir na limitação de nutrientes para o metabolismo microbiano previsto por estequiometria enzimática. No entanto, esta última permanece pouco explorada em solos agrícolas tropicais. O objetivo foi avaliar o efeito das plantas de cobertura na estequiometria enzimática e alívio da limitação de nutrientes para metabolismo microbiano em três cenários de exploração do *legacy* P. O estudo foi realizado em ensaio de campo de longo prazo, com cinco safras explorando o *legacy* P com plantas de cobertura na entressafra comercial, e cenários de P que favoreça um gradiente de P disponível no solo. Foram avaliadas a biomassa microbiana e atividades enzimáticas de aquisição de C, N e P, atributos do solo e absorção de N e P pelas plantas de cobertura. A modelagem da estequiometria enzimática do solo foi prevista por dois modelos. As plantas de coberturas regularam a homeostase microbiana prevista por estequiometria enzima em cenários de *legacy* P, e esta resposta podem ser falha conforme o modelo aplicado. Sempre ocorreu limitação de C pela microbiota, embora nabo forrageiro, aveia preta e centeio reduziram esta limitação. Mesmo sob alto teor de P disponível, ervilhaca manteve a homeostase de N/P e tremoço sempre favoreceu a limitação de P, com estímulos a atividade enzimática de P-aquisição. Isto não ocorreu para gramíneas, onde o gradiente de P disponível favoreceu a limitação de N, e resposta esta que ocorreu em todos os pousios.

Palavras-chaves: Limitações microbianas, Atividade de enzimas extracelulares, Modelagem microbiana, deficiência de P.

Abstract

The cover crops in agricultural soils improve soil functionality and may reflect on the limitation of nutrients for microbial metabolism predicted by enzymatic stoichiometry. However, the latter remains underexplored in tropical agricultural soils. The objective was to evaluate the effect of cover crops on enzymatic stoichiometry and relieve nutrient limitation for microbial metabolism in three legacy P exploration scenarios. The study was conducted in a long-term field trial, with five harvests exploring *legacy* P with cover crops in the commercial off-season, and P scenarios that favor an available P gradient in the soil. Microbial biomass and enzymatic activities of acquisition of C, N, and P, soil attributes, and N and P uptake by cover crops were evaluated. The modeling of soil enzymatic stoichiometry was predicted by two models. The cover crops regulated the microbial homeostasis predicted by enzyme stoichiometry in *legacy* P scenarios, and this response may be flawed according to the applied model. There has always been C limitation by the microbiota, although fodder radish, black oats, and rye have reduced this limitation. Even on high available P content, common vetch maintained N/P homeostasis and white lupin always favored P limitation, with stimuli to P-acquisition enzymatic activity. This did not occur for grasses, where the available P gradient favored N limitation, and response is occurring in all fallows.

Keywords: Microbial limitations, Extracellular enzyme activity, Microbial modeling, P deficiency.

4.1. Introdução

A diversidade de culturas tem repetidamente mostrado melhorias no funcionamento dos sistemas agrícolas, como no aumento da produtividade, estabilidade e eficiência no uso de nutrientes (Yu et al., 2022), consequentemente promove uma agricultura sustentável. Plantas de cobertura são essenciais para manutenção de palhada requerido no sistema de plantio direto, com isto promove benefícios na qualidade química (ciclagem de nutrientes, aumento do COS), biológica (aumento da atividade microbiana) e física (estruturação e retenção de água) do solo (Oburger et al., 2022).

Estes benefícios modificam o perfil do solo não apenas pelo acúmulo de resíduos orgânicos na superfície do solo, mas também por exsudações radiculares e renovação de raízes que estimulam a microbiota do solo, com aumento da abundância, diversidade e funcionalidade (Kim et al., 2020). A microbiota dos solos são os principais agentes que impulsionam os ciclos biogeoquímicos de C, N e P do solo. Um dos mecanismos que modula estes ciclos é produção de enzimas extracelulares, que são agentes próximos do metabolismo microbiano que catabolizam resíduos orgânicos, paredes celulares microbianas, despolimerizam macromoléculas e, finalmente, produzem substratos solúveis para assimilação microbiana (Moorhead et al., 2023; Sinsabaugh et al., 2009).

As principais enzimas extracelulares para aquisição de C, *e.g.* β -1,4-glicosidase (que está envolvida na degradação da celulose), enzimas de aquisição de N, *e.g.* Urease (que está envolvida na conversão de N-orgânico para NH_4^+) e enzimas que adquirem P, *e.g.* fosfatase ácida (que está envolvida na degradação do fósforo orgânico) (Mori, 2020). Estas enzimas-chave catalisam as reações hidrolíticas terminais dos polímeros C, N e P mais abundantes e, portanto, refletem na interface funcional entre a liberação e a aquisição do produto.

Desta forma, a limitação metabólica microbiana pode ser prevista pelos padrões de atividades enzimáticas baseado na teoria da estequiometria coenzimática. Esta teoria conecta a estequiometria elementar da microbiota da matéria orgânica detritica para prever a assimilação e crescimento de nutrientes microbianos (Sinsabaugh & Shah, 2012). Porém, a atividade enzimática e sua estequiometria ainda é pouco compreendida em solos agrícolas de clima tropical, principalmente usando plantas de cobertura em cenários de exploração do *legacy* P.

O objetivo foi avaliar o efeito das plantas de cobertura na estequiometria enzimática e alívio da limitação de nutrientes para metabolismo microbiano em três cenários de exploração do *legacy* P. Aqui testamos a hipótese que as plantas de cobertura, cultivadas na entressafra do milho, modulam o metabolismo microbiano via estequiometria enzimática conforme o cenário de P disponível no solo.

4.2. Material e Métodos

O estudo foi realizado em experimento de longa duração conduzido desde 2009 (na safra 2020/2021 completou 12 anos de condução) na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), município de Dois Vizinhos - PR (25 44' 05" S, 53 03' 31" W), a 509 m de altitude. A classificação climática, segundo Köppen, é subtropical úmido mesotérmico, tipo "Cfa" (Alvares et al., 2013). A temperatura média nos meses mais quentes é 22 °C e nos mais frios 13 °C, com pluviosidade média anual de 2100 mm.

O teor de P disponível no solo (resina de troca aniônica, RTA) no estabelecimento do experimento era baixos (8,1 mg kg⁻¹ para 0–5 cm, 9,7 mg kg⁻¹ para 5-10 cm e 4,8 mg kg⁻¹ para 10-15 cm) conforme boletins regionais (RAIJ et al., 1997).

4.2.1. Desenho experimental

O delineamento experimental foi estabelecido em blocos casualizados, com parcelas subdivididas, em esquema fatorial 3 x 6, com três repetições. O primeiro fator foi composto por fontes fosfatadas: fosfato natural da Argélia (FN, 9% de P₂O₅ solúvel e 29% de P₂O₅ total), superfosfato simples (SPS, 18% de P₂O₅ solúvel) e um controle (sem aplicação de fosfato). O segundo fator por plantas de coberturas de inverno (ervilhaca - *Vicia sativa*, tremoço-branco - *Lupinus albus*, nabo forrageiro - *Raphanus sativus*, azevém - *Lolium multiflorum* e aveia preta - *Avena strigosa*) e um pousio com dessecação frequente das plantas espontâneas. As fontes fosfatadas constituíram as parcelas, e as espécies de plantas de cobertura as subparcelas. Cada subparcela apresentava 5 x 5 m (25 m²).

A adubação fosfatada foi realizada anualmente ao longo das safras de 2009 até 2015, com dose média de 46 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de P solúvel, sendo aplicada a lanço e sem incorporação (total de 335 kg ha⁻¹ ano⁻¹ para SSP e 1078 kg ha⁻¹ ano⁻¹ para FN). Essa adubação foi interrompida a partir de 2016, pois o P-resina atingiu níveis muito altos (> 50 mg kg⁻¹) nas parcelas fertilizadas (Raij et al., 1997). Dessa forma, do ciclo 2016 em diante foi explorado o *legacy* P (residual) das fertilizações fosfatadas. Em síntese, foram fertilizados 7 anos e 5 anos sob supressão de P.

Anualmente foram aplicados 33 kg ha⁻¹ de K (KCl, 60% de K₂O) apenas nas safras comerciais. Nas plantas de cobertura não leguminosas foram aplicados 40 kg ha⁻¹ de N (via ureia) em cobertura. Nas safras principais, o milho recebeu 120 kg ha⁻¹ de N (via ureia) dividido em três estádios da cultura (40 kg ha⁻¹ na semeadura e a mesma dose em cada cobertura nos estádios V4-V5 e V7-V8) e a soja foi inoculada com cepas comerciais de *Bradyrhizobium japonicum*.

4.2.2. Amostragem de solo e planta

Após cinco safras explorando o *legacy* P, o solo foi amostrado nas 0–5 e 5–10 cm de cada parcela, com seis subamostras por amostra composta. Além disso, 0,2 kg de cada amostra foram armazenadas a -4 °C até a determinação das análises microbianas. A biomassa acima do solo das plantas de cobertura foi determinada após amostragem de 0,5 m² de cada parcela, e secas a 65 °C por 72 h. Os teores N e P extraídos foram estimados após determinação do N e P foliar (digestão sulfúrica, determinação por destilação e vanadato-molibdato (Teixeira et al., 2017) e multiplicado pela biomassa produzida pelas plantas de cobertura.

Os teores de C-orgânico total via úmida e fracionamento de P do solo foram recuperados dos capítulos anteriores para comparação com os resultados da modelagem de limitação de nutrientes para o metabolismo microbiano do solo. O N total do solo foi determinado pelo método de Kjeldahl (Teixeira et al., 2017).

4.2.3. Biomassa microbiana e atividades enzimáticas do solo

Os teores de C, N e P da biomassa microbiana foram determinados por fumigação-extração com clorofórmio, e os fatores de conversão foram 0,45, 0,54 e 0,40, respectivamente (Brookes et al., 1984; Vance et al., 1987). As atividades potenciais das enzimas fosfatase ácida (EC 3.1.3.2), β -glicosidase (EC 3.2.1.21) e urease (EC 3.5.1.1) foram analisadas conforme Tabatabai (1994), responsáveis pela aquisição de C, P e N pela microbiota do solo. C e P aquisição foram determinadas pela conversão de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (PNG) e p-nitrofenil fosfato (PNF) em p-nitrofenol após incubação a 37 °C e 1 h. A absorbância dos extratos foram determinadas por espectrometria a 410 nm.

A aquisição de N (urease) foi analisada após incubação de 5 g de solo com ureia (0,2 M), e os teores de N-NH₄⁺ produzidos foram determinados por destilação com MgO (Kandeler & Gerber, 1988). Os resultados das atividades enzimáticas foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de solo h⁻¹.

4.2.4. Estimativa da limitação metabólica microbiana

As limitações metabólicas microbianas foram quantificadas pelo modelo Vetor-REL desenvolvido recentemente por Cui et al. (2021), que pode fornecer previsões mais precisas das limitações metabólicas microbianas comparado ao modelo vetorial tradicional (D. L. Moorhead et al., 2016). A melhoria proposta por Cui et al. (2021) é a identificação de pontos de equilíbrio

enzimático quando os micróbios não são limitados por recursos, combinando o modelo de vetor e o modelo de razão de elemento limiar (REL) (Allen & Gillooly, 2009; D. L. Moorhead et al., 2016).

O REL é definido como as proporções elementares C:N ou C:P nas quais o controle do metabolismo microbiano muda do fluxo de energia (C) para o fluxo de nutrientes (N e/ou P) (Allen & Gillooly, 2009). Este desconsidera que o ponto de equilíbrio assumido em 1:1:1 como atividades ótimas das enzimas que adquirem C, N e P (D. L. Moorhead et al., 2016; Sinsabaugh et al., 2009). O REL foi calculado para os recursos C e N/P(X), que integra as atividades enzimáticas (AE) e biomassa microbiana (BM) (Equação 1). Em seguida, o valor ótimo da REL ($REL^0_{C:X}$) foi estimado pela segunda equação (2)

$$REL_{C:X} = (AE_{C:X} * BM_{C:X})/Z_0 \quad (1)$$

$$REL^0_{C:X} = (A^{max} * CU = EUC^{max}) * MB_{X:C} \quad (2)$$

Onde: $AE_{C:X}$ é a relação da aquisição de C com X (N ou P); $BM_{C:X}$ é a razão molar entre C e X (N ou P) da biomassa microbiana do solo; Z_0 representa as constantes de normalização adimensional para X (N ou P) que representa o valor da interceptação entre $\log(AAE_C)$ vs. $\log(AAE_X)$ obtido regressão de eixo principal padrão (SMA tipo II). A^{max} ou C^{max} representa a máxima eficiência de assimilação pela microbiota de N, P e C disponível. Estes valores foram fixados em 0,9 e 0,6, respectivamente, por serem empiricamente aceitos globalmente (Sinsabaugh et al., 2009).

O estado ótimo foi estimado por $\Delta REL_{C:X}$, equação 3. Os pontos de equilíbrio (x_0 , y_0) foram calculados pela equação 4, com modelo de regressão de eixo principal padrão (tipo II SMA). O ponto de equilíbrio estima quando o metabolismo microbiano não foi limitado por N ou P no qual as estimativas de $\Delta REL_{C:N}$ e $\Delta REL_{C:P}$ são ambas iguais a zero. Em seguida, as estimativas do ponto de equilíbrio foram utilizadas para ajustar o vetor para REL, determinando as limitações de nutrientes, para P, N (equação 7) e C (equação 6).

$$\Delta REL_{C:X} = (REL^0_{C:X} - REL_{C:X}) \quad (3)$$

$$x_0 \text{ ou } y_0 = \text{interceptação} \left(\frac{AE_C}{AE_{C+P}} \text{ vs. } \Delta REL_{C:P} \right), \text{ ou interceptação} \left(\frac{AE_C}{AE_{C+N}} \text{ vs. } \Delta REL_{C:N} \right) \quad (4)$$

$$VT_{N/P \text{ limitação}} = \text{GRAUS}(\text{ATAN2}(x, y)) - \text{DEGREES}(\text{ATAN2}(x_0, y_0)) \quad (5)$$

$$VT_{C \text{ limitação}} = \sqrt{(x^2 + y^2)} - \sqrt{(x_0^2 + y_0^2)} \quad (6)$$

Onde os valores de x são: $AE_C/(AE_C+AE_P)$; os valores de y são: $AE_C/(AE_C+AE_N)$. Para $VT_{N/P \text{ limitação}}$: valores > 0 representam limitações de P, enquanto valores < 0 representam limitações de N. Para $VT_{C \text{ limitação}}$: valores > 0 indicando uma limitação de C, não importa quanto N e P estejam disponíveis.

Devido esta abordagem ser recente e a baixa aplicação da estequiometria enzimática microbiana em solos agrícolas, o vetor tradicional de comprimentos e ângulos de Moorhead et al. (2016) foi aplicado para comparação de desempenho (este foram obtidos com as equações 7 e 8). Uma vez que o estudo foi conduzido para promover limitação de P no sistema, desta forma é esperado que os modelos reflitam estas limitações.

$$\text{Vetor ângulo } (^\circ) = \text{GRAUS}(\text{ATAN2}(x,y)) \quad (7)$$

$$\text{Vetor comprimento } (L) = \sqrt{(x^2 + y^2)} \quad (8)$$

4.2.5. Análise estatística

A normalidade (*Shapiro-Wilk's*) e homoscedasticidade da variância (*Bartlett*) foram verificadas para cada atributo avaliado, quando não atendidos houve transformação por Box-Cox. O pacote *smatr* foi usado para realizar as regressões SMA tipo II e estimar os pontos de equilíbrio (Warton et al., 2018). Após a modelagem, análise de variância de duas vias (ANOVA, $p \leq 0,05$) e *post hoc* Tukey (HSD, $p \leq 0,05$) foram usados para medir os efeitos das plantas de cobertura e fontes de P nas variáveis por camadas de solo. Nos vetores de limitação C e N/P, a comparação foi realizado com as médias das camadas, devido à baixa variabilidade de respostas entre camadas.

A relação da absorção de N e P pelas plantas de cobertura com os vetores de limitação C e N/P foi explorada com correlação de Pearson com estratificação dos efeitos simples dos fatores. A correlação em rede foi aplicada para verificar as conexões das variáveis micro-solo-planta conforme o cenário de P do solo. A análise de componentes principais foi aplicada para explorar a covariação principal das associações entre as variáveis e os tratamentos (Hair et al., 2009).

Todas as análises e gráficos foram realizados no programa R versão 4.0.5 (Team, 2022), com os pacotes *MASS* (Ripley et al., 2022), *smatr* (Warton et al., 2018), *ExpDes.pt* (Ferreira et al., 2021), *FactoMineR* (Husson et al., 2020), *qgraph* (Epskamp et al., 2023) e *ggplot2* (Wickham et al., 2022).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Biomassa e atividade microbiana do solo

As plantas de cobertura e o *legacy* P de fontes fosfatadas modularam todas as respostas microbianas nas duas camadas de solo (0-5 e 5-10 cm), embora maiores efeitos significativos foram observados na primeira camada de solo ($p < 0,05$). Especialmente no C_{mic} (carbono da biomassa

microbiana), as respostas foram maiores com fosfato natural FN (Fig. 1A), como esperado devido maiores teores de P disponível (Tab. 1S, ou resultados do 2º capítulo). Curiosamente, aveia preta e centeio sob SPS modularam o C_{mic} a teores semelhantes ao FN, e em ambos os casos as plantas de cobertura foram superiores aos pousios ($p = 0,0007$ e $p = 0,0001$). Em Sem-P, não houve efeitos das plantas de cobertura em 0-5 cm, diferente de 5-10 cm, onde azevém e centeio aumentaram 99 e 122% o C_{mic} comparado ao pousio.

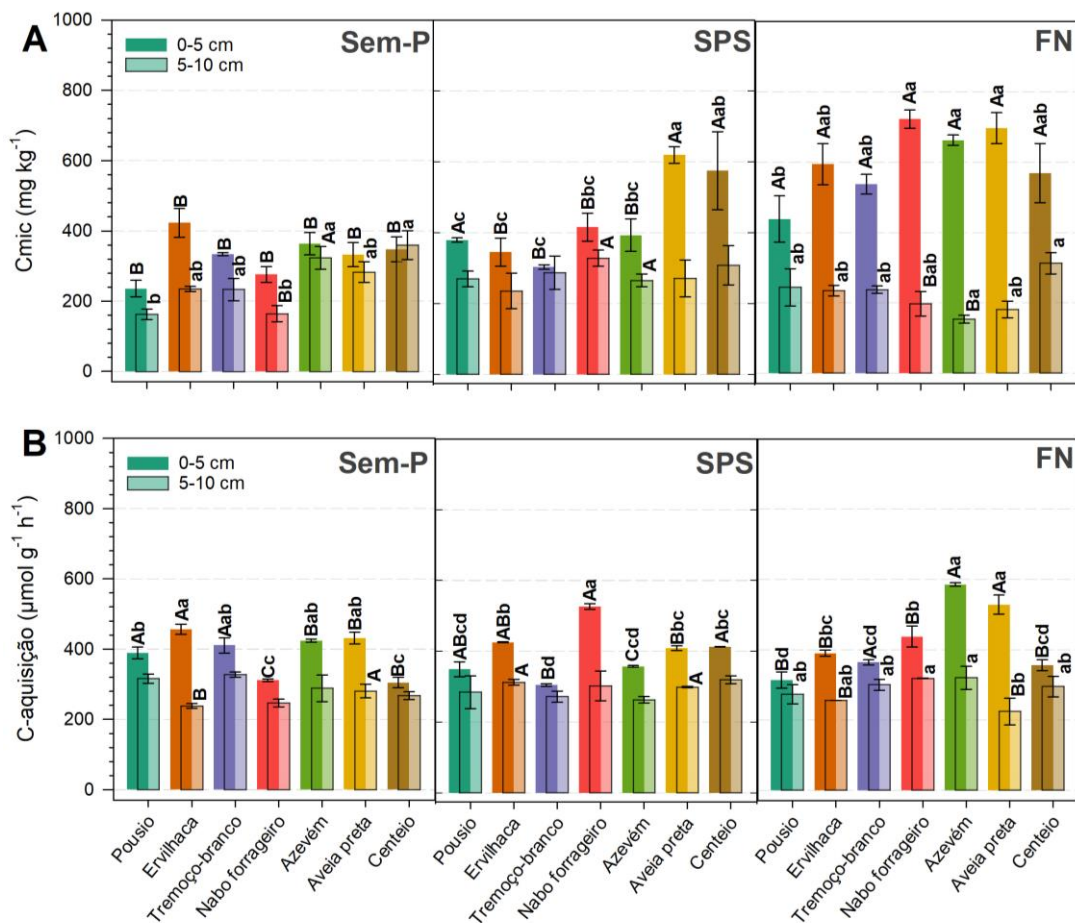


Figura 1. Teores de carbono da biomassa microbiana (C_{mic}) e atividade de enzima de C-aquisição do solo em ensaio de campo a longo prazo com plantas de coberturas e *legacy* P de fontes fosfatada por camada de solo (0-5 e 5-10 cm). Letras iguais, maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura, não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). Sem-P: sem adubação fosfatada; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

A atividade da enzima de C-aquisição foi modulada pelas plantas de cobertura, independente das fontes de P na primeira camada (0-5 cm) (Fig. 1B). Na segunda camada, esta resposta ocorreu apenas em FN ($p = 0,025$), onde aveia preta apresentou menor atividade ($223 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$) observada. Por outro lado, azevém e aveia preta sob FN ($p = 0,001$), nabo forrageiro

sob SPS ($p = 0,001$) e ervilhaca sob Sem-P ($p = 0,001$) apresentaram as maiores atividades de C-aquisição. Estes foram superiores em 87, 69, 54, e 17% aos seus respectivos pousios.

A combinação das plantas de cobertura e fontes de P influenciaram a resposta da atividade de N-aquisição pela microbiota ($p < 0,05$) em todas as camadas, exceto com ervilhaca ($p = 0,13$ e para 0-5 e $p = 0,084$ para 5-10 cm) com média geral de $\sim 157 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Fig. 2A). Maiores N-aquisição foram observadas de modo geral sob espécies gramíneas (família Poaceae) e para o nabo forrageiro onde houve adição de P (SSP e FN). Sob FN, azevém, nabo forrageiro e aveia preta aumentaram 48, 35 e 16% atividade de N-aquisição em 0-5 cm comparado ao pousio. Sob SPS, apenas nabo forrageiro e aveia preta foram superiores ao pousio. Já com forte limitação de P (12 safras sem adição de P), os efeitos das plantas de cobertura foram nulos ou houve redução para azevém e ervilhaca ($p = 0,0002$).

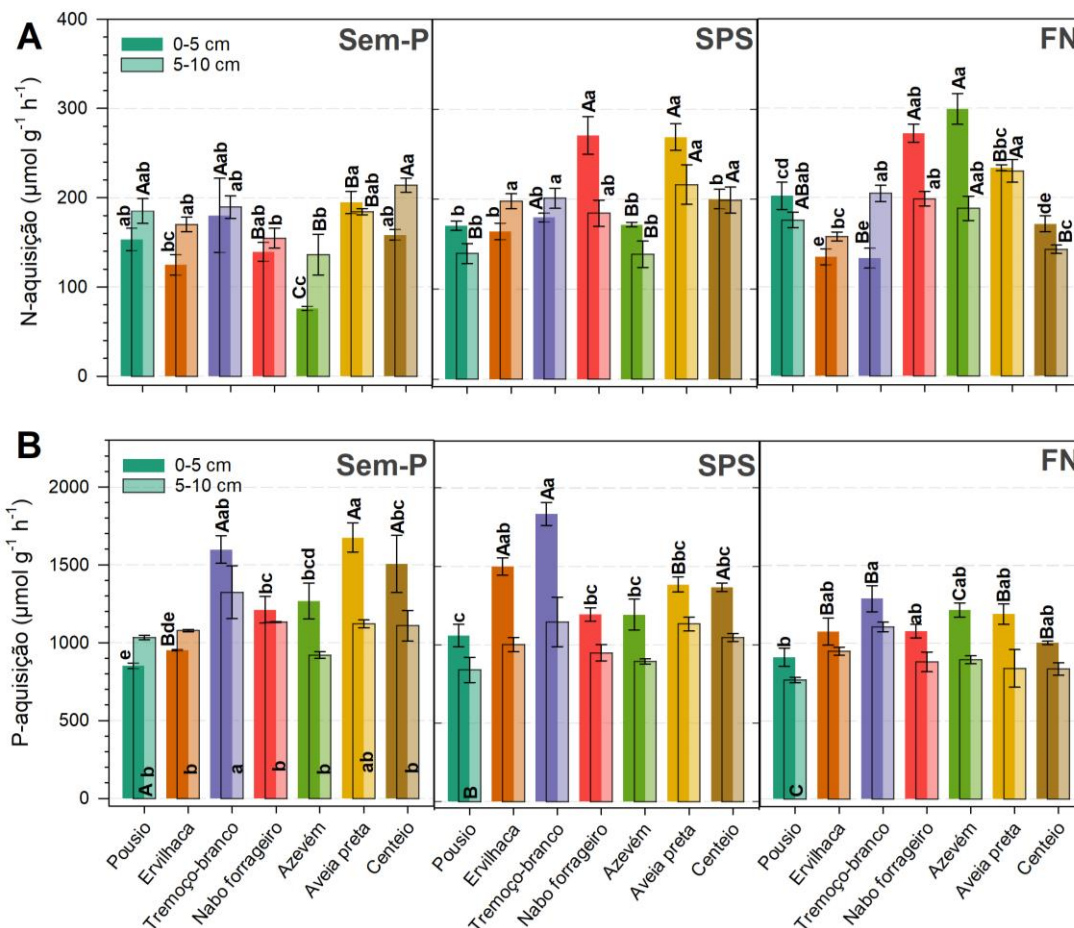


Figura 2. Enzimas de aquisição de N e P do solo em ensaio de campo a longo prazo com plantas de coberturas e *legacy* P de fontes fosfatada por camada de solo (0-5 e 5-10 cm). Letras iguais, maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura, não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. As barras de erro representam o erro padrão de média ($n = 3$). Sem-P: sem adubação fosfatada; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

Atividade enzimática de P-aquisição foi alterada pelas interações dos fatores (plantas de cobertura vs. fontes P, $p < 0,05$) apenas na primeira camada (0-5 cm) e na subcamada houve apenas efeito simples ($p < 0,05$) (Fig. 2B). Tremoço-branco e ervilhaca apresentaram respostas consistentes e superiores ao pousio (~67 e ~24%), independente da fonte, e estiveram entre as plantas com maiores respostas na primeira camada. Aveia preta e centeio, exceto sob FN, estimularam a P-aquisição pela microbiota, especialmente sob Sem-P. Na subcamada, cenários com mais P disponível reduziram a atividade enzimática de P-aquisição ($p=0.0001$), e apenas tremoço-branco e aveia preta foram superiores ao pousio.

Estes resultados eram esperados com maiores efeitos entre os cenários P, devido à atividade da fosfatase ser inibida pelo aumento do P disponível (Nakayama et al., 2021). No entanto, ao comparar com os nossos resultados anteriores (Soltangheisi et al., 2018), explorar o *legacy* P por cinco anos reduziu drasticamente o P disponível. Onde em SPS, 58% das frações de P estavam em reservatórios considerados não-lábil e para FN foi 96% do P total (Fig. 5), embora esta última apresentou 38% do P em frações moderadamente lábil (P-HCl) que pode ser solubilizada pela rizosfera ou microbiota (Geng et al., 2022). Porém, sob FN ocorreu aumento da comunidade microbiana (Fig. 1 A) logo a P-aquisição por unidade de C_{mic} ativa foi baixa (Tab. S3).

As maiores atividades enzimáticas na primeira camada (0-5 cm) são explicadas por esta camada ser a mais energética do solo, com maiores taxas de renovação de nutrientes (*turnover*) devido à aplicação de fertilizantes e deposição de biomassa ser na superfície. Este efeito é conhecido pela estratificação das camadas promovidas pelo manejo de revolvimento mínimo do solo (plantio direto). Em uma meta-análise recente de escala global, Liu et al. (2023) demonstraram que os resíduos da colheita aumentam o teor de C, N e P do solo, com maiores taxas de acúmulo para C e N total, em menor extensão para P.

4.3.2. Modelagem da estequiometria enzimática

Aqui apresentamos um dos primeiros estudos com modelagem da estequiometria microbiana para prevê limitações de nutrientes em solos agrícolas tropicais. A modelagem estequiométrica proposta por Cui et al. (2021) foi mais eficiente que o vetor tradicional de Moorhead et al. (2016) em prever limitações microbianas, uma vez que os resultados do vetor L (limitações de N ou P) superestimou fortes limitações de P em todos os tratamentos, e não previu limitação de N (Fig. 1S). A principal diferença entre os modelos é que Cui et al. (2021) estima pontos de equilíbrio em vez de considerar a relação de 1:1:1 como ótimas para aquisição de C, N e P pela microbiota (Allen & Gillooly, 2009; Sinsabaugh et al., 2009).

As plantas de cobertura direcionaram as limitações de N/P para o metabolismo microbiano conforme os cenários de *legacy* P ($p=0,00001$, Fig. 3B). Esta resposta não ocorreu no VT_C limitação, onde sempre ocorreu limitação de C independente dos fatores ($p=0,00011$, Fig. 3A), embora houve alívio quando tremoço-branco, nabo forrageiro, aveia preta e centeio foram cultivados sob Sem-P ($p = 0.0001$). Resposta semelhante ocorreu apenas com tremoço sob SPS ($p = 0.00001$) e aveia preta sob SPS e FN ($p = 0.0005$).

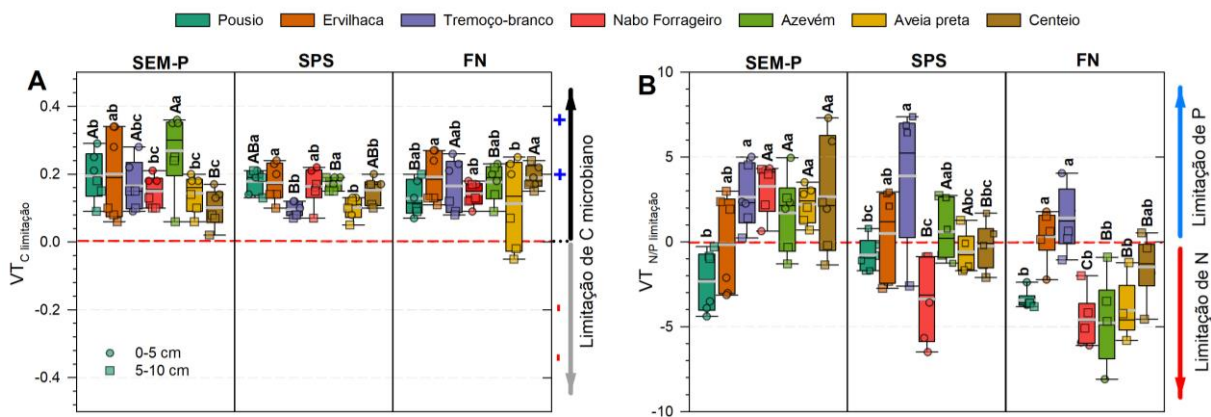


Figura 3. Efeitos plantas de coberturas e *legacy* P de fontes fosfatadas na limitação carbono (A), nitrogênio e fósforo (B) para o metabolismo microbiano do solo estimado pelo modelo Vetor-TER. Barras cinza dentro dos boxplot representam a médias das duas camadas (0-5 e 5-10 cm). Para VT_C -limitação: valores > 0 indicam que a limitação microbiana de C ocorre independentemente da quantidade de N e P disponíveis. $VT_{N/P}$ -limitação: valores > 0 são limitados por P, enquanto valores < 0 são limitados por N. Letras iguais, maiúsculas entre as fontes fosfatadas e minúsculas entre as plantas de cobertura, não diferem pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). P.S.: por estética, as letras foram apenas expostas onde ocorreu diferença pelo teste HSD. Sem-P: sem aplicação de fosfatadas; SPS: superfosfato simples; FN: fósforo natural.

De modo geral, as menores limitações de P microbiano foram observadas sob FN (como esperado por conter mais P disponível no solo, Fig. 5 e Tab. S1). Sob esta fonte, ocorreram fortes limitações de N nas espécies não leguminosas e estas foram semelhantes aos pousios ($p=0,00001$). Houve equilíbrio entre as limitações de N e P sob ervilhaca. Já o tremoço-branco foi sempre limitado por P, o pousio por N, estes tratamentos não foram influenciados pelo *legacy* P de fontes P ($p = 0,84, 0,12$ e $0,086$, respectivamente).

A correlação de Pearson (Fig. 4) evidenciou que o aumento da absorção de N em nabo forrageiro explicou 48% do aumento da limitação de N para o metabolismo microbiano (Fig. 4 A-B). No entanto, absorção de N pelas plantas de cobertura sob FN correlacionou em 58% com tendência de atingir o equilíbrio de N/P. Já para o P, efeito das fontes P não foram significativos, no entanto, as maiores absorções pelas plantas de cobertura correlacionaram com a redução da fome de P pela microbiota em -64% ($p<0,05$) apenas para espécies não leguminosas,

consequentemente aumentou a limitação de N (Fig. 4 C-D). Isto não ocorreu para ervilhaca e tremoço-branco devidos as entradas de N via fixação biológica são maximizadas por estas espécies (Kim et al., 2020).

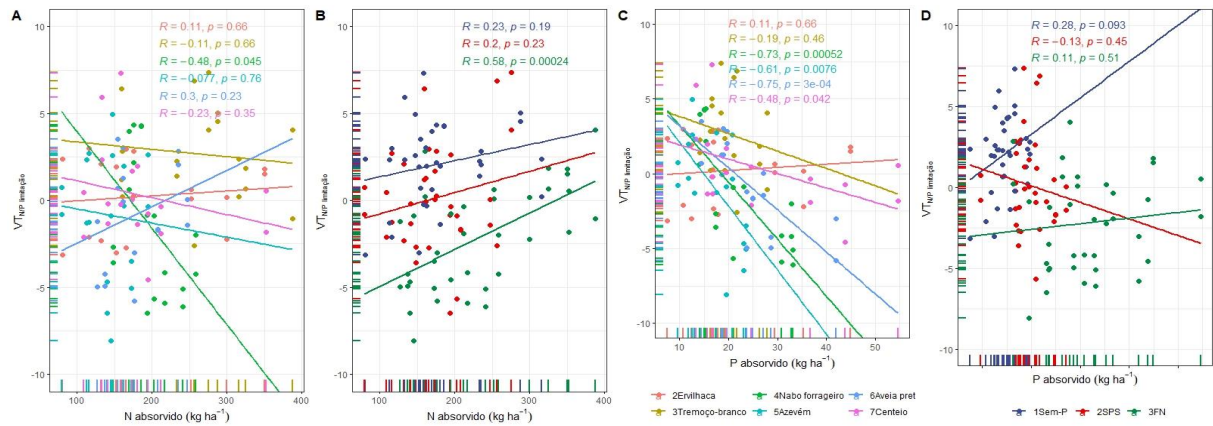


Figura 4. Correlação de Pearson dos vetores de limitação de N/P com o N (A e B) e P (C e D) absorvido pelas plantas de cobertura estratificado por espécies (A e C) e fontes fosfatadas (B e D). $VT_{N/P}$ -limitação: valores > 0 são limitados por P, enquanto valores < 0 são limitados por N. Sem-P: sem aplicação de fosfatadas; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

A análise de correlação em rede estratificada (Fig. 5) por fontes de P mostrou perdas de correlações fortes das variáveis microbianas com as de solo (FN vs. SSP vs. Sem-P). As características das plantas acima do solo apresentaram apenas correlações com atributos do solo em SPS e FN, onde absorção de N e P reduziu a relação C/N do solo. Sob Sem-P, a atividade de N-aquisição correlacionou negativamente com a limitação de C, e sob FN esta mesma enzima reduziu a limitação de P, consequentemente aumento da limitação de N (Fig. 5).

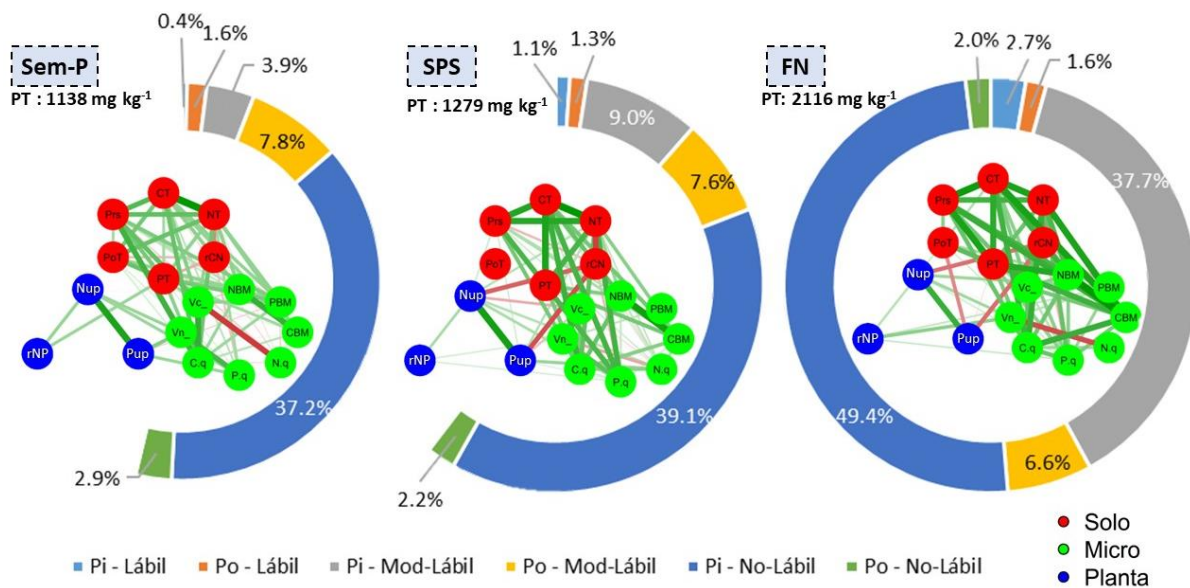


Figura 5. Análise de correlação em rede das variáveis de plantas, solo e microbiana estratificados por fontes fosfatadas e gráfico circular com a variação percentual das frações de P do solo relativizada com o P total de FN. ToP: fósforo orgânico total do solo; TP, CT, NT: fósforo, carbono e nitrogênio total do solo; rCN: relação de C e N total do solo); Prs: fósforo disponível do solo; Pi e Po: fósforo inorgânico e orgânico do solo; Mod-lábil: P moderadamente lábil; No-lábil: P não lábil; Nup e Pup: N e P absorvido pelas plantas; rNP relação de N e P absorvido pelas plantas; Vc: vetor de limitação de C; Vnp: vetor de limitação de N/P; CBM, NBM e PBM: C, N e P da biomassa microbiano; C.q, N.q e P.q: enzimas de aquisição de C, N e P do solo; . Sem-P: sem aplicação de fosfatadas; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

A redução da dimensionalidade com análise de componentes principais foi possível explicar 52,9% da variação total nos dois primeiros componentes (ver componentes gerados e variância associada na Fig. S2). Os pousios com FN e SPS apresentaram alta dissimilaridade dos demais tratamentos devido à alta relação C/N do solo, e sob Sem-P devido à alta associação com P orgânico total do solo. Este último não diferiu apenas com azevém sob SPS. As plantas de cobertura sob FN apresentaram alta similaridade entre si e dissimilaridade com os demais tratamentos. Nesta condição, todas as plantas de cobertura foram associadas positivamente com nutrientes da biomassa microbiana, P disponível e Ptotal. Por outro lado, negativamente correlacionadas com limitação de P e enzima de P aquisição (Fig. 6).

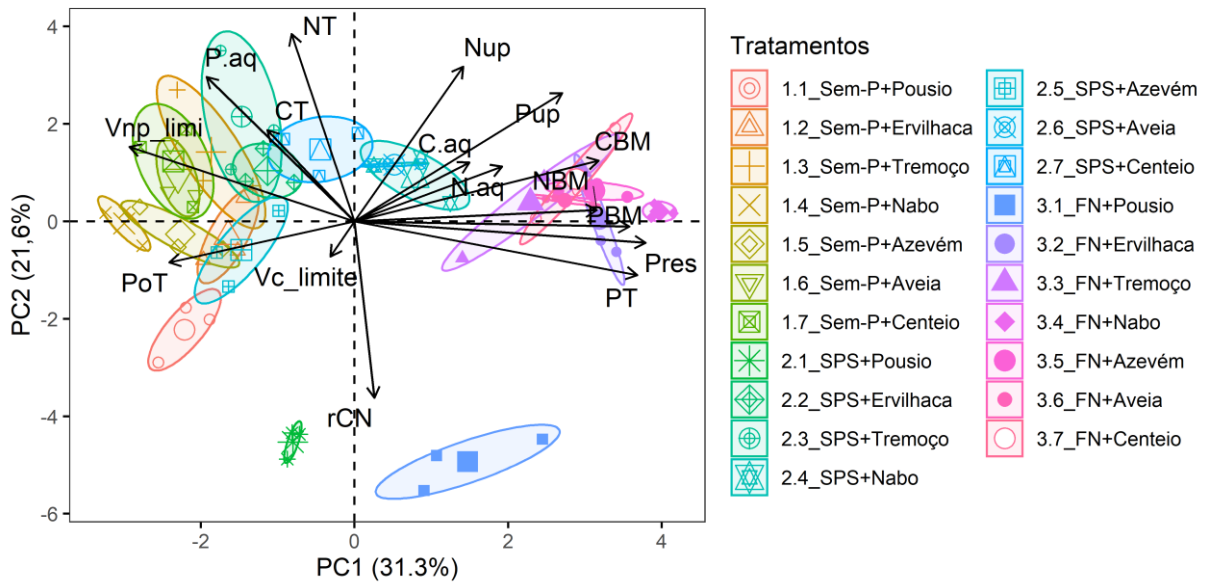


Figura 6. Biplot do primeiro e o segundo componentes principais derivados dos efeitos do legacy P de fontes fosfatadas e plantas de cobertura nas variáveis de microrganismos, solo e planta. Valores representam a médias das duas camadas (0-5 e 5-10 cm). ToP: fósforo orgânico total do solo; PT, CT, NT: fósforo, carbono e nitrogênio total do solo; rCN: relação de C e N total do solo; Pres: fósforo disponível do solo; Nup e Pup: N e P absorvido pelas plantas; Vc_limite: vetor de limitação de C; Vnp_limite: vetor de limitação de N/P; CBM, NBM e PBM: C, N e P da biomassa microbiano; C.q, N.q e P.q: enzimas de aquisição de C, N e P do solo; Sem-P: sem aplicação de fosfatadas; SPS: superfosfato simples; FN: fosfato natural.

4.4. Conclusão

As plantas de coberturas regularam a homeostase microbiana prevista por estequiometria enzima em cenários de *legacy* P, e esta resposta podem ser falha conforme o modelo aplicado. Mesmo sob alto teor de P disponível, ervilhaca manteve a homeostase de N/P e tremoço sempre favoreceu a limitação de P e estimulou a atividade enzimática de P-aquisição. Isto não ocorreu para gramíneas, onde o gradiente de P disponível favoreceu a limitação de N, resposta esta que ocorreu em todos os pousios. Esta resposta das gramíneas foi correlacionada com o aumento da absorção de P pelas plantas de cobertura e os cenários de P influenciaram as conexões dos atributos do solo e microrganismos.

Referências

Allen, A. P., & Gillooly, J. F. (2009). Towards an integration of ecological stoichiometry and the metabolic theory of ecology to better understand nutrient cycling. *Ecology Letters*, 12(5), 369–384. <https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2009.01302.X>

- Brookes, P. C., Powlson, D. S., & Jenkinson, D. S. (1984). Phosphorus in the soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 16(2), 169–175. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(84\)90108-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(84)90108-1)
- Cui, Y., Moorhead, D. L., Guo, X., Peng, S., Wang, Y., Zhang, X., & Fang, L. (2021). Stoichiometric models of microbial metabolic limitation in soil systems. *Global Ecology and Biogeography*, 30(11), 2297–2311. <https://doi.org/10.1111/GEB.13378>
- Epskamp, S., Cramer, A. O. J., Waldorp, L. J., Schmittmann, V. D., & Borsboom, D. (2023). qgraph: Network Visualizations of Relationships in Psychometric Data. *Journal of Statistical Software*, 48, 1–18. <https://doi.org/10.18637/JSS.V048.I04>
- Geng, Y., Pan, S., Zhang, L., Qiu, J., He, K., Gao, H., Li, Z., & Tian, D. (2022). Phosphorus biogeochemistry regulated by carbonates in soil. *Environmental Research*, 214, 113894. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.113894>
- Kandeler, E., & Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6(1), 68–72. <https://doi.org/10.1007/BF00257924>
- Kim, N., Zabaloy, M. C., Guan, K., & Villamil, M. B. (2020). Do cover crops benefit soil microbiome? A meta-analysis of current research. *Soil Biology and Biochemistry*, 142, 107701. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2019.107701>
- Liu, J., Qiu, T., Peñuelas, J., Sardans, J., Tan, W., Wei, X., Cui, Y., Cui, Q., Wu, C., Liu, L., Zhou, B., He, H., & Fang, L. (2023). Crop residue return sustains global soil ecological stoichiometry balance. *Global Change Biology*, 29(8), 2203–2226. <https://doi.org/10.1111/GCB.16584>
- Moorhead, D., Cui, Y., Sinsabaugh, R., & Schimel, J. (2023). Interpreting patterns of ecoenzymatic stoichiometry. *Soil Biology and Biochemistry*, 180, 108997. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2023.108997>
- Moorhead, D. L., Sinsabaugh, R. L., Hill, B. H., & Weintraub, M. N. (2016). Vector analysis of ecoenzyme activities reveal constraints on coupled C, N and P dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 93, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2015.10.019>
- Mori, T. (2020). Does ecoenzymatic stoichiometry really determine microbial nutrient limitations? *Soil Biology and Biochemistry*, 146, 107816. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2020.107816>

- Nakayama, Y., Wade, J., & Margenot, A. J. (2021). Does soil phosphomonoesterase activity reflect phosphorus pools estimated by Hedley phosphorus fractionation? *Geoderma*, 401, 115279. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2021.115279>
- Oburger, E., Schmidt, H., & Staudinger, C. (2022). Harnessing belowground processes for sustainable intensification of agricultural systems. *Plant and Soil* 2022 478:1, 478(1), 177–209. <https://doi.org/10.1007/S11104-022-05508-Z>
- Sinsabaugh, R. L., Hill, B. H., & Follstad Shah, J. J. (2009). Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature* 2009 462:7274, 462(7274), 795–798. <https://doi.org/10.1038/nature08632>
- Sinsabaugh, R. L., & Shah, J. J. F. (2012). Ecoenzymatic Stoichiometry and Ecological Theory. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Ecolsys-071112-124414>, 43, 313–343. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ECOLSYS-071112-124414>
- Soltangheisi, A., Rodrigues, M., Coelho, M. J. A., Gasperini, A. M., Sartor, L. R., & Pavinato, P. S. (2018). Changes in soil phosphorus lability promoted by phosphate sources and cover crops. *Soil and Tillage Research*, 179, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.01.006>
- Teixeira, P. C., Donagemma, G. K., Fontana, A., & Teixeira, W. G. (2017). *Manual de métodos de análise de solo* (3rd ed.). Embrapa Solos.
- Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6), 703–707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Warton, D. I., Duursma, R. A., Falster, D. S., & Taskinen, S. (2018). smatr 3– an R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(2), 257–259. <https://doi.org/10.1111/J.2041-210X.2011.00153.X>
- Yu, R.-P., Yang, H., Xing, Y., Zhang, W.-P., Lambers, H., Li, L., Yu, R.-P., Yang, H., Xing, Y., Zhang, W.-P., Li, L., & Lambers, H. (2022). Belowground processes and sustainability in agroecosystems with intercropping. *Plant and Soil* 2022 476:1, 476(1), 263–288. <https://doi.org/10.1007/S11104-022-05487-1>

Material suplementar

Tabela S1. Teores P da biomassa microbiana, P disponível e P orgânico total do solo sob efeito de plantas de cobertura e *legacy* P de fontes fosfatadas à 0-5 e 5-10 cm. Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfatadas natural. ¹ Determinação por resina em lâmina (2 cm²).

Plantas de coberturas	PBM (mg kg ⁻¹)				P resina ¹ (mg kg ⁻¹)				P orgânico total (mg kg ⁻¹)			
	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média
0-5 cm												
Pousio	5,9 ±1,8	11 ±2,1	11,9 ±2,6	9,6 ±2,2	5,4 ±0,7	5,3 ±0,9	47,8 ±5,8	19,5 ±2,5	231,7 ±2,1	213,2 ±34,1	273,7 ±57,4	239,5 ±31,2
Ervilhaca	6,7 ±1,1	8,6 ±1,7	29,8 ±3,6	15 ±2,1	5,7 ±0,6	14,7 ±1,8	54 ±9,3	24,8 ±3,9	283,5 ±33,3	222,7 ±20,8	254,3 ±7,6	253,5 ±20,6
Tremoço-branco	5,8 ±0,9	10,2 ±3,1	30,2 ±6,4	15,4 ±3,5	5,4 ±1	17,7 ±3,2	50,1 ±4,2	24,4 ±2,8	278,8 ±16,8	205 ±27,5	310 ±33,8	264,6 ±26
Nabo Forrageiro	5,1 ±1,5	5,8 ±3,4	20,9 ±4,8	10,6 ±3,2	4,2 ±0,3	17,6 ±4,7	34,8 ±4,7	18,9 ±3,2	300,8 ±11,2	167 ±29,5	230,9 ±1,3	232,9 ±14
Azevém	6,1 ±1	11,2 ±1,9	19,7 ±7,3	12,3 ±3,4	6,1 ±1,1	12,4 ±1,5	52,2 ±4,3	23,6 ±2,3	273,6 ±13,1	314,2 ±21,6	222,6 ±19,3	270,1 ±18
Aveia preta	3,7 ±0,6	10,2 ±0,3	20,7 ±4,8	11,5 ±1,9	5,7 ±0,6	14 ±2,5	45,7 ±7,6	21,8 ±3,6	276,2 ±16,3	252,1 ±13,5	243,2 ±28,2	257,2 ±19,3
Centeio	3,8 ±1,1	9,7 ±1,8	12,8 ±5,5	8,8 ±2,8	4,7 ±0,9	15,5 ±5	50,2 ±12	23,5 ±6	278,7 ±8,8	270,6 ±30,4	178,6 ±12,5	242,6 ±17,2
Média	5,3 ±1,5	9,5 ±2,6	20,9 ±8,1		5,3 ±0,9	13,9 ±4,8	47,8 ±8,6		274,7 ±24,5	235 ±50,7	244,8 ±46	
5-10 cm												
Pousio	4,3 ±1,2	8,9 ±3,4	9 ±3,8	7,4 ±2,8	4,6 ±0,8	4,2 ±1,8	26,5 ±10,3	11,8 ±4,3	237,5 ±20,3	244,7 ±23	276,8 ±40,8	253 ±28
Ervilhaca	4,3 ±0,6	7,4 ±3,1	21,2 ±2,4	11 ±2	3,7 ±0,4	5,1 ±0,3	12,2 ±1,2	7 ±0,6	266,8 ±10,1	213,4 ±20,2	205,9 ±6,7	228,7 ±12,3
Tremoço-branco	2 ±0,7	9,3 ±0,9	19,6 ±1,8	10,3 ±1,1	3,7 ±0,6	7,3 ±2,4	14,8 ±4,3	8,6 ±2,4	251,1 ±2,5	237,6 ±27,6	216,3 ±39,5	235 ±23,2
Nabo Forrageiro	1,7 ±0,5	4,3 ±2,1	9,7 ±0,3	5,2 ±1	2,8 ±0,3	5,9 ±0,7	10,8 ±0,9	6,5 ±0,6	216 ±16,2	239,5 ±21,1	166,7 ±20,8	207,4 ±19,4
Azevém	4,7 ±1,7	10,6 ±1,4	14,3 ±1,4	9,9 ±1,5	3,5 ± -	6,2 ±1,8	18,5 ±9,5	9,4 ±3,8	279,5 ±10,7	276 ±17,8	183,4 ±7,7	246,3 ±12,1
Aveia preta	1,5 ±0,2	9,5 ±1,1	16,6 ±3,6	9,2 ±1,6	3,3 ±0,7	8 ±3,9	14,5 ±0,9	8,6 ±1,8	234 ±9,9	216,7 ±19,6	173 ±4	207,9 ±11,2
Centeio	1,7 ±0,5	4,6 ±1,1	19,4 ±3,1	8,6 ±1,6	2,7 ±0,9	6,5 ±0,9	13,4 ±6,1	7,5 ±2,6	228,1 ±41,1	249,3 ±36,3	92,1 ±9,3	189,8 ±28,9
Média	2,9 ±1,6	7,8 ±2,9	15,7 ±5,1		3,5 ±0,8	6,2 ±2,1	15,8 ±7,1		244,7 ±26,8	239,6 ±28,6	187,8 ±56,8	

Tabela S2. Teores de P, C e N total do solo sob efeito de plantas de cobertura e *legacy* P de fontes fosfatadas à 0-5 e 5-10 cm. Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfatadas natural. ¹ Determinação por combustão úmida. ² Determinação por destilação.

Plantas de coberturas	P total (mg kg ⁻¹)				C total ¹ (g kg ⁻¹)				N total ² (g kg ⁻¹)			
	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média
0-5 cm												
Pousio	1134 ±55	1390,2 ±46,1	2952,6 ±73,9	1825,6 ±73,9	27,8 ±1,5	28,2 ±1,1	29 ±1,7	28,3 ±1,4	2,3 ±0,2	1,9 ±0,3	2 ±0,3	2,1 ±0,3
Ervilhaca	1189,3 ±55,1	1342,1 ±36,8	2957,3 ±28,9	1829,6 ±28,9	31,8 ±2,6	32,4 ±0,6	28,3 ±0,9	30,8 ±1,4	2,6 ±0,2	2,7 ±0,1	2,3 ±0,1	2,5 ±0,1
Tremoço-branco	1262,7 ±44,4	1408,6 ±19,8	2978,2 ±20,6	1883,2 ±20,6	28,5 ±0,7	30,8 ±1,2	29,5 ±0,6	29,6 ±0,8	2,5 ±0,1	2,7 ±0,2	2,6 ±0,2	2,6 ±0,2
Nabo Forrageiro	1187,4 ±53,9	1361 ±39,6	2967,5 ±44,7	1838,6 ±44,7	30,4 ±1,5	31,5 ±2,3	27,9 ±1,5	29,9 ±1,8	2,6 ±0,1	2,7 ±0,2	2,4 ±0,2	2,6 ±0,2
Azevém	1214,6 ±20,4	1350,5 ±30,7	3004,7 ±55,9	1856,6 ±55,9	30,3 ±2	29,2 ±1,3	31,8 ±1,2	30,4 ±1,5	2,6 ±0,2	2,5 ±0,1	2,8 ±0,1	2,6 ±0,1
Aveia preta	1113,8 ±28,6	1435,8 ±17,5	2219,4 ±28,6	1589,7 ±28,6	31 ±1,1	29,8 ±1,1	32,4 ±2,1	31,1 ±1,4	2,6 ±0,2	2,5 ±0,2	2,8 ±0,2	2,6 ±0,2
Centeio	1125,9 ±11,5	1466,2 ±19,6	2139,7 ±134,1	1577,3 ±134,1	33 ±1,4	33,1 ±1,9	28,8 ±1,1	31,6 ±1,5	2,9 ±0,1	2,9 ±0,2	2,5 ±0,1	2,8 ±0,1
Média	1175,4 ±62	1393,5 ±51,4	2745,6 ±372		30,4 ±2,2	30,7 ±2,1	29,7 ±2		2,6 ±0,2	2,6 ±0,3	2,5 ±0,3	
5-10 cm												
Pousio	1143,6 ±44,6	1159,8 ±37,8	2137,4 ±142,7	1480,3 ±53,7	22,5 ±1,7	21 ±0,8	23,6 ±1,4	22,4 ±1,3	1,8 ±0,3	1,1 ±0,1	1,2 ±0,1	1,4 ±0,2
Ervilhaca	1122,9 ±28,4	1156 ±44,3	1289,3 ±53,7	1189,4 ±37,8	23,4 ±0,9	24,3 ±1,1	20,5 ±1,2	22,7 ±1,1	1,9 ±0,1	2 ±0,1	1,7 ±0,1	1,9 ±0,1
Tremoço-branco	1192,4 ±30,7	1126,5 ±50,3	1534,3 ±37,8	1284,4 ±46,9	22,3 ±1,2	24,4 ±0,8	19,4 ±0,9	22 ±1	1,9 ±0,2	2 ±0,1	1,6 ±0,1	1,8 ±0,1
Nabo Forrageiro	1044,5 ±15,1	1189,9 ±26,3	1326,5 ±46,9	1187 ±243,2	21,6 ±1,2	22,8 ±1	20,7 ±1,3	21,7 ±1,2	1,7 ±0,1	1,8 ±0,1	1,7 ±0,1	1,7 ±0,1
Azevém	1114,1 ±7,1	1209,5 ±49	1585,7 ±243,2	1303,1 ±19,5	21,6 ±1,1	20,9 ±1,3	21,8 ±1,3	21,4 ±1,2	1,8 ±0,1	1,8 ±0,1	1,8 ±0,1	1,8 ±0,1
Aveia preta	1052,2 ±20,4	1190,5 ±53,9	1323,1 ±19,5	1188,6 ±89,3	22,9 ±1,4	23,7 ±1,1	22 ±1,2	22,9 ±1,2	1,7 ±0,1	1,7 ±0,1	1,6 ±0,1	1,7 ±0,1
Centeio	1033,8 ±62,6	1116,1 ±61,9	1216,8 ±89,3	1122,2 ±	21,7 ±1	23,4 ±1,8	22 ±0,7	22,4 ±1,2	1,8 ±0,1	1,9 ±0,1	1,8 ±0,1	1,8 ±0,1
Média	1100,5 ±63	1164 ±51,6	1487,6 ±315,3		22,3 ±1,2	22,9 ±1,7	21,4 ±1,6		1,8 ±0,1	1,8 ±0,3	1,6 ±0,2	

Tabela S3. Nitrogênio da biomassa microbiana, atividade de aquisição de C e P ativa pela microbiota do solo à 0-5 e 5-10 cm sob efeito de plantas de cobertura e *legacy* P de fontes fosfatadas. Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfatadas natural.

Plantas de coberturas	NBM (mg kg ⁻¹)				C-aquisição ativa (μmol mg ⁻¹)				P-aquisição ativa (μmol mg)			
	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média
0-5 cm					Acumulado acima do solo				Acumulado acima do solo			
Pousio	39,7 ±7	64,3 ±1,7	74,5 ±19,6	59,5 ±9,4	1,7 ±0,4	0,9 ±0,1	0,7 ±0,1	1,1 ±0,2	3,7 ±0,6	2,8 ±0,3	2,2 ±0,6	2,9 ±0,5
Ervilhaca	71,9 ±12,1	58,5 ±11,7	101,3 ±17,5	77,2 ±13,8	1,1 ±0,2	1,3 ±0,2	0,7 ±0,1	1 ±0,2	2,3 ±0,4	4,4 ±0,6	1,8 ±0,4	2,8 ±0,5
Tremoço-branco	56,6 ±1,2	51,3 ±1,9	91,6 ±8,4	66,5 ±3,9	1,2 ±0,1	1 ±0,1	0,7 ±0,1	1 ±0,1	4,8 ±0,4	6 ±0,3	2,4 ±0,3	4,4 ±0,3
Nabo Forrageiro	46,6 ±6,6	70,6 ±11,7	123,4 ±7,7	80,2 ±8,7	1,1 ±0,2	1,3 ±0,2	0,6 ±0,1	1 ±0,2	4,5 ±1,2	2,9 ±0,5	1,5 ±0,1	3 ±0,6
Azevém	43,2 ±6,6	46,7 ±9,6	79,2 ±3,1	56,4 ±6,4	1,2 ±0,2	0,9 ±0,2	0,9 ±0,1	1 ±0,1	3,5 ±0,2	3,1 ±0,3	1,8 ±0,1	2,8 ±0,2
Aveia preta	39,4 ±7,2	74 ±4,8	83,3 ±9,2	65,6 ±7,1	1,3 ±0,2	0,7 ±0,1	0,8 ±0,1	0,9 ±0,1	5,1 ±0,8	2,2 ±0,3	1,7 ±0,4	3 ±0,5
Centeio	41,3 ±7,5	68,6 ±23	67,9 ±17,6	59,3 ±16	0,9 ±0,2	0,8 ±0,3	0,6 ±0,1	0,8 ±0,2	4,4 ±0,9	2,6 ±1,1	1,9 ±0,5	3 ±0,8
Média	48,4 ±12,9	62 ±13,7	88,7 ±21		1,2 ±0,3	1 ±0,3	0,7 ±0,1		4 ±1,1	3,4 ±1,3	1,9 ±0,4	
5-10 cm												
Pousio	27,1 ±4,5	45,4 ±6,6	41,1 ±15,8	37,9 ±9	2 ±0,4	1,1 ±0,3	1,2 ±0,4	1,4 ±0,4	1,2 ±0,2	0,5 ±0,1	0,8 ±0,4	0,8 ±0,2
Ervilhaca	39,5 ±2,2	39,6 ±14,8	39,5 ±4,6	39,5 ±7,2	1 ±0,1	1,4 ±0,5	1,1 ±0,1	1,2 ±0,2	0,7 ± -	0,9 ±0,2	0,7 ±0,1	0,8 ±0,1
Tremoço-branco	39,2 ±9,5	48,5 ±14	39,9 ±3,1	42,5 ±8,9	1,5 ±0,3	1 ±0,2	1,3 ±0,2	1,3 ±0,2	0,8 ±0,1	0,7 ±0,2	0,9 ±0,1	0,8 ±0,1
Nabo Forrageiro	27,4 ±6,7	55,5 ±6,9	33 ±10,3	38,6 ±8	1,6 ±0,3	0,9 ±0,1	1,7 ±0,5	1,4 ±0,3	1 ±0,3	0,6 ± -	1,1 ±0,4	0,9 ±0,2
Azevém	38,3 ±6,8	31,3 ±3,8	17,8 ±2,3	29,1 ±4,3	0,9 ±0,3	1 ±0,1	2,1 ±0,7	1,3 ±0,4	0,4 ±0,1	0,5 ±0,1	1,2 ±0,2	0,7 ±0,1
Aveia preta	33,4 ±6,2	32 ±10,9	21,2 ±5	28,9 ±7,4	1 ±0,1	1,2 ±0,3	1,2 ±0,2	1,1 ±0,2	0,7 ±0,2	0,9 ±0,3	1,3 ±0,2	1 ±0,2
Centeio	42,7 ±8,5	36,4 ±11,5	37 ±6,2	38,7 ±8,8	0,8 ±0,1	1,1 ±0,3	1 ±0,3	1 ±0,2	0,6 ±0,1	0,7 ±0,2	0,5 ±0,1	0,6 ±0,1
Média	35,4 ±8,1	41,2 ±12,2	32,8 ±11,3		1,2 ±0,5	1,1 ±0,3	1,4 ±0,5		0,8 ±0,3	0,7 ±0,2	0,9 ±0,4	

Tabela S4. Biomassa seca, absorção de N e P pelas plantas de cobertura conforme o *legacy* P de fontes fosfatadas. Sem-P: Sem aplicação de P; SPS: superfosfato simples; FN: fosfatadas natural.

Plantas de coberturas	Biomassa seca (t kg ⁻¹)				Absorção de N (kg ha ⁻¹)				Absorção de P (kg há ⁻¹)			
	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média	Sem-P	SPS	FN	Média
Ervilhaca	3,2 ±0,6	3,9 ±0,3	6,6 ±1,5	6,6 ±0,8	116 ±36	157,6 ±23	300,6 ±48,9	191,4 ±36	10,2 ±2,6	17,2 ±0,6	36,5 ±7,8	21,29 ±3,7
Tremoço-branco	6,7 ±0,6	7,6 ±1,1	7,1 ±2,4	7,1 ±1,4	278,8 ±42	230 ±62,4	291,1 ±117,7	266,7 ±74,1	16,6 ±2,5	20,4 ±1,7	23,5 ±6,3	20,17 ±3,5
Nabo Forrageiro	5,2 ±0,2	6,4 ±0,9	7,6 ±0,3	7,6 ±0,5	176,8 ±8,1	181,6 ±29,3	238,9 ±20,7	199,1 ±19,3	14,9 ±0,6	20,5 ±2,9	32,3 ±1,2	22,56 ±1,6
Azevém	3,8 ±0,3	5 ±1,4	5,3 ±0,8	5,3 ±0,8	140,6 ±25,6	129,8 ±58,9	152,5 ±17,8	141 ±34,1	12,5 ±0,6	15,9 ±5,7	22,1 ±2,2	16,83 ±2,9
Aveia preta	6,5 ±0,6	8,1 ±0,7	7,3 ±1,6	7,3 ±1	183,6 ±45	205,7 ±43,3	146,6 ±26,4	178,6 ±38,2	17,6 ±2,8	23,6 ±4,4	31,4 ±9,5	24,22 ±5,6
Centeio	5,9 ±0,6	7,5 ±1,8	11,6 ±1	11,6 ±1,1	157 ±23,9	141,2 ±32,3	253 ±86,2	183,7 ±47,5	15,2 ±1,6	20,3 ±4	45 ±9	26,84 ±4,9
Média	5,2 ±0,5	6,4 ±1	7,6 ±1,3		175,5 ±30,1	174,3 ±41,5	230,5 ±53		14,5 ±1,7	19,65 ±3,2	31,8 ±6	

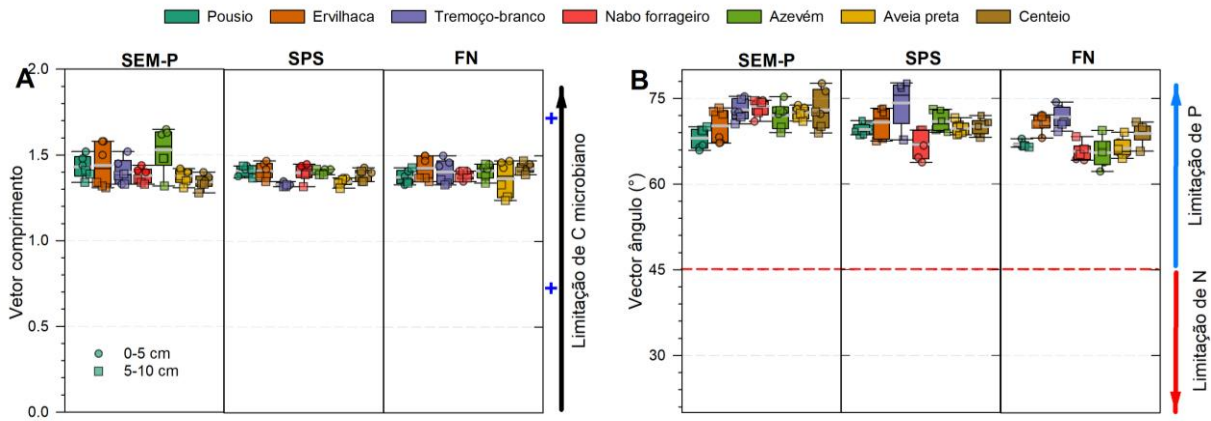


Figura S1. Os comprimentos e ângulos vetoriais quantificados pelo modelo vetorial tradicional de estequiometria enzimática, proposto por Moorhead et al. (2016). O vetor comprimento representa a limitação de C e o vetor angulo representa as limitações P versus N. Ângulo $>45^\circ$ indica limitação de P e $<45^\circ$ indica limitação de N.

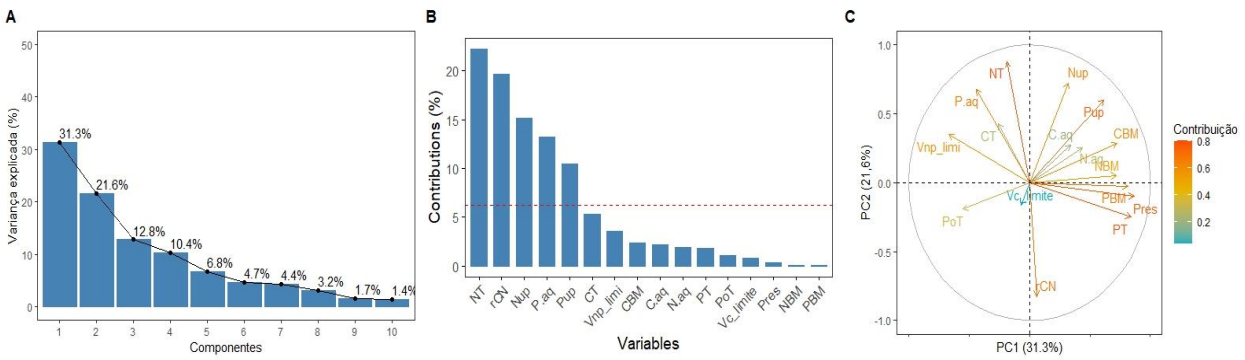


Figura S2. Variância explicados pelos componentes gerados (A), contribuição média (B) e representatividade das variáveis no PC1 e PC2 (C) dos efeitos de plantas de cobertura e fontes fosfatadas.